

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

**RESPOSTAS BIOQUÍMICAS E MOLECULARES NO PEIXE
Poecilia vivipara EXPOSTO À FRAÇÃO DE ÓLEO DIESEL
ACOMODADA EM ÁGUA**

JACÓ JOAQUIM MATTOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Afonso Celso Dias Bainy
Florianópolis 2010

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

M444r Mattos, Jacó Joaquim

Respostas bioquímicas e moleculares no peixe *Poecilia vivipara* exposto à fração de óleo diesel acomodada em água [dissertação] / Jacó Joaquim Mattos ; orientador, Afonso Celso Dias Bainy. - Florianópolis, SC, 2010.
120 p.: grafs., tabs.

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

Inclui referências

1. Bioquímica. 2. Barrigudinho - Metabolismo. 3. Combustíveis diesel. 4. Expressão gênica. I. Bainy, Afonso Celso Dias. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. III. Título.

CDU 577

Agradeço ao Fabio Daura Jorge (Fabão) pela disponibilidade e paciência em pescar Poecílias na Barra da Lagoa em diversas ocasiões. Ao seu apoio com a estatística multivariada na reta final do projeto.

Agradeço à Karim, Lila e Ninna. Sem elas não seria possível a realização deste e outros projetos no laboratório. Verdadeiras guerreiras que aceitavam todo tipo de trabalho (pescaria, trabalhos hidráulicos, elétricos e mecânicos para montar a sala de bioensaios e serviços administrativos), além disso, trabalhavam também nas análises enzimáticas moleculares e design de projetos. Está pouco ou quer mais?

Agradeço a todos por serem tolerantes quando eu estava de mau humor.

Ao Prof. Dr. Afonso por ter me aceitado no laboratório e fornecido o essencial para realização desse projeto. Pela confiança no meu trabalho e dedicação.

Agradeço ao Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, especialmente a Satie Taniguchi, pelas análises químicas das amostras de peixes.

Agradeço ao Prof. Dr. Alcir, Trevisan, Flesch, Marcela pela convivência e a possibilidade de participar de duas aventuras de campo.

Agradeço a Prof. Dr. Maria Risoleta Marques pela possibilidade de usar o equipamento de PCR em tempo real e pelas boas aulas de Toxicologia Molecular.

Agradeço à Patricia Hermes Stoco e ao Prof. Dr. Edmundo Carlos Grisard do Laboratório de Protozoologia da Universidade Federal de Santa Catarina pelos sequenciamentos.

Agradeço à CAPES pela bolsa e ao CNPq pelo auxílio financeiro ao projeto.

Agradeço antecipadamente à banca por ler e criticar construtivamente esse trabalho.

Agradeço ao monge tântrico Dada Jinanananda pelos sábios conselhos. Baba nam kevalam, Dada.

Agradeço a ADNI por ter me guiado silenciosamente desde o Princípio.

RESUMO

O óleo diesel é um potencial contaminante de estuários e mangues, especialmente porque ele é o principal combustível utilizado em embarcações. Além disso, a exploração de petróleo e transporte causam sérios riscos ao ambiente marinho. No capítulo 1, foram estudados aspectos químicos e bioquímicos no peixe *Poecilia vivipara* expostos a fração do óleo diesel acomodada em água (FAD). Os peixes expostos à concentração de 20% de FAD apresentaram um aumento na atividade GST, GR e EROD no fígado. As brânquias apresentaram um aumento na atividade GST nas concentrações de 10% e 20% da FAD, enquanto a atividade EROD aumentou nas concentrações de 2,5%, 10% e 20%. Esse aumento indica uma adaptação do sistema de biotransformação desses organismos para detoxificação dos hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos tipicamente encontrados no óleo diesel. No capítulo 2, foram estudados os aspectos moleculares e químicos no peixe *Poecilia vivipara* exposto a 10% FAD. Os resultados mostraram 27 genes diferencialmente expressos, sendo 12 induzidos e 15 reprimidos. Os resultados de qPCR confirmaram a indução dos genes *Citocromo P4501A (CYP1A)*, *Citocromo P4502P2 (CYP2P2)*, *Metiltransferase (MET)*, *Glutathione S-transferase (GST)*, *Uridina Difosfato Glicoronosil Transferase (UDPGT1B)* e a repressão do gene *Vitelogenina A (VgA)* em machos. A maioria dos genes induzidos validados por qPCR está envolvida nas duas primeiras etapas de biotransformação, enquanto o gene validado como reprimido, *VgA*, está envolvido com a vitelogênese. Juntos, os resultados mostram significativas mudanças bioquímicas e moleculares que são potenciais biomarcadores para compostos presentes na FAD.

Palavras-chave: biotransformação, óleo diesel, *Poecilia vivipara*, expressão gênica

ABSTRACT

Diesel oil is a potential contaminant of estuarine and mangrove areas, especially, because it is the main fuel used in vessels. In addition, offshore oil exploration, production and transport pose serious risks to the marine environment. In the chapter 1, biochemical and chemical aspects were studied in the fish *Poecilia vivipara* exposed to Diesel Oil Water Accommodated Fraction (FAD). Fish exposed to 20% of FAD showed an increase in the GST, GR and EROD enzymatic activity in liver. The gills showed an increase in GST activity in the 10% and 20% FAD concentrations, while EROD activity increased in the 2.5%, 10% e 20% FAD concentrations. These increases indicate a biotransformation system adaptation of these organisms to detoxify the aliphatic and aromatic hydrocarbons typically found in the diesel oil. In the chapter 2, molecular and chemical aspects were studied in the fish *Poecilia vivipara* exposed to 10% FAD. The SSH results showed 27 differentially expressed genes, 12 upregulated and 15 downregulated. The qPCR results confirmed the *Cytochrome P4501A (CYP1A)*, *Cytochrome P4502P2 (CYP2P2)*, *Methyltransferase (MET)*, *Glutathione S-transferase (GST)*, *Uridine Diphosphate Glucuronosil Transferase (UDPGT1B)* gene induction and *Vitelogenin A (VgA)* gene repression in male fish. The majority of the upregulated genes validated by qPCR is involved with the two biotransformation phases, while the gene validated as downregulated, VgA, is involved with vitellogenesis. Together, the results show significant biochemical and molecular changes that are potential biomarkers for FAD compounds.

Keywords: biotransformation, diesel oil, *Poecilia vivipara*, gene expression

LISTA DE ABREVIATURAS

ABCC4	ATP Binding Cassete C4 (família de glicoproteínas transmembranas)
ACBP	Proteína ligante de AcilCoA
AChE	Acetilcolinesterase
AHR	Aryl Hidrocarbon Receptor (receptor de hidrocarboneto aromático)
AMBP	Precursor da Alfa microglobulina/bicunina
ANOVA	Análise de variância (teste estatístico)
APOAI	Precursor da Apolipoproteína AI
ARE	Antioxidante response element (Elemento de resposta antioxidante)
ARNT	Translocador nuclear do receptor de hidrocarboneto aromático
α -NAC	Complexo associado ao polipeptídeo nascente alfa
ATP	Trifosfato de adenosina
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool (algoritmo para comparação de sequências biológicas utilizando alinhamento local)
BNF	Beta-naftoflavona
C1	Inibidor C1
C3	Proteína do sistema complemento
CAT	Catalase
COMT	Catecol-O-Metiltransferase
cDNA	Sequência nucleotídica complementar de DNA
CONAMA	Comissão Nacional do Meio Ambiente

COXI	Citocromo c oxidase subunidade I
CYP450	Citocromo P450
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ER	Estrogen receptor (receptor de estrógeno)
EROD	Etóxi-resorufina-O-deetilase
FAD	Fração do óleo diesel acomodada em água
G6PDH	Glicose-6-fosfato desidrogenase
GenBank	Banco de genes público que possui os dados produzidos pelo NCBI
GPx	Glutaciona peroxidase
GR	Glutaciona redutase
GSH	Glutaciona reduzida
GSSG	Glutaciona dissulfídica
GST	Glutaciona S-transferase
HPA	Hidrocarboneto policíclico aromático
HSP90	Proteína de choque térmico 90
ITM2B	Proteína integral de membrana 2B
MET	Metiltransferase
NADP+	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidada
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NCBI	National Center for Biotechnology Information (Centro Nacional de Informação Biotecnológica dos EUA)
NRF2	NF-E2-related factor 2
OATP2	Transportador de ânions orgânicos membro 1c1

PCR	Reação em cadeia da polimerase
PEN2	Presenilina 2
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
RNA	Ácido ribonucléico
RNA _m	RNA mensageiro
RNA _r	RNA ribossomal
SOD	Superóxido dismutase
SSH	Hibridação subtrativa supressiva
TCDD	Tetraclorodibenzodioxina
TF	Transferrina
UDPGP	Uridina difosfato glicose pirofosforilase
UDPGT	Uridina difosfato glicuronosil transferase
VgA	Vitelogenina A
VgB	Vitelogenina B
VgC	Vitelogenina C
XRE	Xenobiotic response element (elemento de resposta a xenobióticos)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	13
1.1	Contaminação Aquática	13
1.2	O óleo diesel	15
1.3	Os biomarcadores de contaminação aquática	17
1.4	Os programas de biomonitoramento	20
2	OBJETIVOS GERAIS	22
3	CAPÍTULO 1	23
4	INTRODUÇÃO	27
5	OBJETIVOS	31
6	MATERIAIS E MÉTODOS	32
6.1	Coleta dos Peixes <i>Poecilia vivipara</i>	32
6.2	Preparação da fração do óleo diesel acomodada em água (FAD)	33
6.3	Exposição dos peixes <i>Poecilia vivipara</i> a diversas concentrações da FAD	33
6.4	Análise Química	34
6.5	Biomarcadores bioquímicos	36
6.5.1	Preparação das amostras	36
6.5.2	Determinação da concentração de proteínas	37
6.5.3	Superóxido dismutase (SOD)	37
6.5.4	Catalase (CAT)	38
6.5.5	Glutathione redutase (GR)	38
6.5.6	Glutathione peroxidase (GPx)	38
6.5.7	Glutathione S-transferase (GST)	39
6.5.8	Glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH)	39
6.5.9	Etóxi-resorufina O-Deetilase (EROD)	39

6.5.10	<i>Análises estatísticas</i>	40
7	RESULTADOS	41
7.1	Análise química de hidrocarbonetos alifáticos em <i>P. vivipara</i>	41
7.2	Análise química de hidrocarbonetos aromáticos em <i>P. vivipara</i>	46
7.3	Biomarcadores bioquímicos em <i>P. vivipara</i>	48
8	DISCUSSÃO	52
8.1	Análise Química	52
8.2	Biomarcadores Bioquímicos em <i>P. vivipara</i>	53
9	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	61
10	CAPÍTULO 2	62
11	INTRODUÇÃO	67
12	OBJETIVOS	70
13	MATERIAIS E MÉTODOS	71
13.1	Exposição de peixes à FAD 10% para avaliação das respostas moleculares	71
13.2	Análise química	72
13.3	Extração de RNA total	74
13.4	Extração RNA mensageiro (mRNA)	74
13.5	Hibridização Subtrativa Supressiva (SSH)	75
13.6	Clonagem	75
13.7	PCR para seqüenciamento	76
13.8	Comparação de seqüências	76
13.9	Padronização das reações de PCR quantitativo (qPCR)	76
13.10	Validação de potenciais biomarcadores moleculares por PCR quantitativo (qPCR)	77

13.11	Quantificação Relativa por RT-PCR quantitativo (qPCR)	78
13.12	Análises estatísticas	80
14	RESULTADOS	81
14.1	Análise química	81
14.2	Biomarcadores moleculares em <i>P. vivipara</i>	83
15	DISCUSSÃO	88
15.1	Análise Química	88
15.2	Biomarcadores Moleculares em peixes <i>Poecilia vivipara</i>	89
15.2.1	<i>Sistema de Biotransformação Fase I e Vitelogênese</i>	89
15.2.2	<i>Sistema de Biotransformação Fase II e III</i>	92
15.2.3	<i>Genes Envolvidos no sistema Imune Inato e Metabolismo de Carboidratos e Lipídeos</i>	97
15.2.4	<i>Apoptose</i>	99
15.2.5	<i>Transporte de Oxigênio</i>	100
15.2.6	<i>Chaperonas e Coativadores da Transcrição</i>	100
15.2.7	<i>Proteínas ribossomais e Mitocondriais</i>	102
16	CONCLUSÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	103
17	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Contaminação Aquática

A indústria petrolífera é de fundamental importância na economia mundial, pois esse recurso pode ser utilizado como fonte de energia ou fonte de matéria-prima para outros tipos de indústria. Apesar de sua importância econômica, a atividade da indústria petrolífera pode gerar impactos ambientais seja por derramamentos acidentais de petróleo ou por descargas crônicas de combustíveis utilizados nas cidades (FILHO, 2006).

Acidentes ambientais, como derrames de petróleo e seus derivados, constituem a principal fonte de contaminação aguda e estão relacionados a danos na biota e nos ecossistemas como um todo (KENNISH, 1992). Em escala mundial, destaca-se o rompimento do tanque Prestige na costa da Espanha em 2002 derramando mais de 60.000 toneladas de óleo, cujos efeitos mais dramáticos foram observados na região da Galícia, afetando também a costa inglesa (CAJARAVILLE et al., 2006; CARRO; COBAS; MANEIRO, 2006; SORIANO et al., 2006). No Brasil, destacam-se: o derrame de 1,3 milhão de litros de óleo na Baía da Guanabara, Rio de Janeiro, em janeiro de 2000; o vazamento de 4 milhões de litros de óleo nos rios Barigüi e Iguçu, no estado do Paraná em julho do mesmo ano; e em novembro de 2004, o vazamento de mais de 6 milhões de litros de diferentes tipos de óleo em Paranaguá (PR). Em todos estes eventos foram observados impactos em diversos ecossistemas (MENICOM et al., 2002; FILHO, 2006).

Apesar dos efeitos tóxicos na biota serem aparentes nesse tipo de derrame, alguns ecossistemas aquáticos estão submetidos a uma contaminação crônica. Esses ecossistemas recebem um aporte contínuo de efluentes do petróleo como resultado do consumo de combustíveis ou por lixiviação do solo em áreas urbanas. (KENNISH, 1992; FILHO, 2006). De acordo com Filho (2006), a contaminação crônica provocada pelo consumo de petróleo e seus derivados, seja por carros, barcos, navios, lixiviação de solo em áreas urbanas, vazamentos em postos de combustível corresponde a maior parcela de petróleo introduzida no mar.

No Brasil, de acordo com a Resolução nº. 273 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA, 2000), toda instalação e sistemas de armazenamento de derivados de petróleo e outros combustíveis configuram-se como empreendimentos potencialmente ou parcialmente poluidores e geradores de acidentes ambientais.

No Estado de São Paulo, no período 1984 a 2001, os vazamentos em postos de combustíveis foram responsáveis por cerca de 10% de todas as emergências ambientais atendidas. Sobre as causas desses acidentes, constatou-se que 25% estavam relacionadas a vazamentos em tanques, 20% a vazamentos nas tubulações e 10% devido a uma contaminação de solo ou água subterrânea remanescente de outros eventos.

Entretanto, esses números não refletem a realidade dos vazamentos ocorridos, pois muitos casos não são comunicados à Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB, 2005).

1.2O óleo diesel

Dentre os derivados do petróleo, o óleo diesel merece destaque em termos de risco ambiental por ser continuamente lançado nos ambientes costeiros em função de seu uso como combustível de embarcações, veículos rodoviários e máquinas em geral (KENNISH, 1992; FILHO, 2006). No Brasil, o óleo diesel é o derivado propulsor do refino e corresponde a 34% do volume do barril de petróleo. Na maioria dos outros países do mundo, esta demanda situa-se entre 15 e 25% do volume do barril de petróleo (Portal BR, 2005).

De acordo com Neff (2002), o óleo diesel, também chamado de óleo nº 2, é considerado um óleo de densidade média, composto basicamente por hidrocarbonetos alifáticos (HAs), principalmente parafinas, além de apresentar uma pequena porcentagem de hidrocarbonetos aromáticos. Dentre os aromáticos, os monocíclicos, que apresentam apenas um anel benzeno, são os mais abundantes, seguidos pelos policíclicos (HPAs), principalmente os compostos por 2 a 4 anéis (WANG et al., 2003; NEFF; STOUT; GUNSTER, 2005). Dentre os HPAs, o naftaleno e seus derivados metilados são os mais frequentemente encontrados no óleo diesel (VANZELLA; MARTINEZ; CÓLUS, 2007).

Embora pouco representativos em relação aos HAs, os HPAs têm sido identificados como os principais componentes do óleo que apresentam elevado risco ao ambiente, sendo diretamente relacionados a processos carcinogênicos (AAS et al., 2000), dentre outros efeitos em organismos marinhos (GAGNON; HOLDWAY, 1999; AKCHA et al., 2000; MACHELLA; REGOLI; SANTELLA, 2005; BARŠIENĖ et al., 2006; CARAJVILLE et al., 2006; FROUIN et al., 2007).

Estudos realizados em *Prochilodus lineatus* expostos à fração do óleo diesel acomodada em água mostrou a ocorrência de lesões em brânquias e fígado, redução na hemoglobina e anormalidades nos eritrócitos como micronúcleos e quebras no DNA (SIMONATO; GUEDES; MARTINEZ, 2008; VANZELLA; MARTINEZ; CÓLUS, 2007). Um outro estudo, realizado com *Carassius auratus* expostos à fração acomodada em água do óleo diesel, mostrou um aumento nas defesas antioxidantes (ZHANG et al., 2004). Essas pesquisas foram realizadas em laboratório com espécies de peixes dulciaquícolas, contudo a literatura carece de informações a respeito dos efeitos biológicos da fração do óleo diesel acomodada em água em espécies nativas que ocorrem no ambiente estuarino e marinho.

Os peixes da família Poeciliidae, conhecidos popularmente como barrigudinho, são abundantes e habitam regiões dulciaquícolas e estuarinas desde os Estados Unidos até a Argentina (NEVES; MONTEIRO, 2003). Além disso, muitas espécies desta família são conhecidas por sua resistência à contaminação orgânica, sendo comumente encontradas em regiões limpas e em córregos contendo resíduos de esgotos domésticos e pluviais (ARAÚJO et al., 2009). A espécie *Poecilia vivipara* foi utilizada em experimentos que visavam avaliar os efeitos do cádmio e a tolerância térmica (AMARAL; BONECKER; ORTIZ, 2001) e efeitos da salinidade nas proteínas sódio-potássio ATPase e magnésio ATPase (AMARAL; BONECKER; ORTIZ, 2001).

Kraus e colaboradores (1998) sugeriram o uso da *Poecilia vivipara* em testes de toxicidade após experimentos que verificavam a sensibilidade desta espécie às substâncias dicromato de potássio, duodecilsulfato de sódio, cobre e zinco. Além disso, *P. vivipara* é uma espécie filogeneticamente próxima ao *Fundulus heteroclitus*, estabelecido há aproximadamente três décadas como o primeiro peixe modelo para estudos ambientais

na América do Norte, o que possibilita a realização de estudos comparativos com esta espécie (ZANETTE, 2009). Devido a estes fatos, o peixe *P. vivipara* é um bom candidato a peixe modelo para estudos ecotoxicológicos no Brasil, podendo ser utilizado em estudos que visem a determinação dos efeitos do óleo diesel.

Tendo em vista o potencial do óleo diesel em causar danos ao ambiente aquático e a necessidade de estudos com organismos nativos, é imprescindível o desenvolvimento de metodologias que possibilitem a avaliação e previsão dos efeitos biológicos nos organismos aquáticos expostos ao óleo diesel ou outros derivados do petróleo.

1.3 Os biomarcadores de contaminação aquática

Técnicas bioquímicas clássicas associadas à técnicas de biologia molecular vêm auxiliando na descoberta de ferramentas promissoras para o biomonitoramento ambiental em ecossistemas contaminados por efluentes da indústria de petróleo (BOUTET; TANGUY; MORAGA, 2004; CAJARAVILLE et al., 2006). No entanto, existe uma carência de informações sobre os efeitos biológicos destes contaminantes na biota, especialmente quando se trata de misturas complexas como o óleo diesel (SINGER et al., 2000).

Uma das técnicas de biologia molecular aplicada em organismos monitores, cujo genoma permanece desconhecido, é a de hibridação subtrativa supressiva (SSH). Essa técnica possibilita a construção de bibliotecas subtrativas de cDNAs que podem ser comparadas às disponíveis em bancos de genes. Os genes, após a identificação, podem ter sua expressão avaliada

quantitativamente por reação em cadeia da polimerase (PCR). Dessa forma, a análise da expressão do RNA mensageiro de diferentes genes em organismos expostos a um determinado contaminante pode ser utilizada em estudos mecanísticos e servir como um potencial marcador dos efeitos tóxicos (SEWALL et al., 1999).

Os biomarcadores são definidos por Walker (1996) como alterações biológicas em nível molecular, celular ou fisiológico que expressam os efeitos tóxicos causados pelos contaminantes nos organismos expostos. Os biomarcadores podem indicar tanto a exposição dos organismos aos contaminantes (biomarcadores de exposição), como a magnitude da perturbação causada em resposta a poluentes (biomarcadores de efeito) (CAJARAVILLE et al., 2000). Dentre os biomarcadores de exposição, estão: as enzimas de biotransformação de xenobióticos, as metalotioneínas e as defesas antioxidantes (enzimáticas e não enzimáticas) entre outros; Dentre os biomarcadores de efeito estão: os níveis de dano no DNA e de oxidação de lipídios e proteínas (RAND et al., 1995; CAJARAVILLE et al., 2000).

As defesas antioxidantes atuam protegendo as células contra os efeitos deletérios de espécies reativas de oxigênio (EROs), que podem ser geradas pelos contaminantes ou no processo de biotransformação desses contaminantes. As defesas antioxidantes podem ser não enzimáticas como por exemplo, o tripeptídeo glutationa reduzida (GSH), ou enzimáticas, como as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutationa peroxidase (GPx), glutationa redutase (GR) e glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH) (BRAY; LEVY, 2000).

O processo de biotransformação de fase I (reações de oxidação) de compostos orgânicos, tais como os hidrocarbonetos planares encontrados no petróleo, é realizado pelo sistema de oxigenases de função mista (MFO), constituído pelo sistema

citocromo P450 (NIYOGI et al., 2001). Este sistema desempenha papel central no metabolismo de muitos xenobióticos, catalisando tanto reações de detoxificação quanto de bioativação (TERAMITSU et al., 2000). Após as reações mediadas pelos Citocromos P450, os produtos lipofílicos podem ser conjugados com o tripeptídeo endógeno glutationa reduzida (GSH) através da atividade da enzima glutationa S-transferase (GST), formando produtos mais solúveis e, portanto, mais fáceis de serem excretados (FITZPATRICK et al., 1997). Além da GST, outras enzimas como as Uridina Difosfato glicoronosil Transferases (UDPGT), Sulfotransferases (SULT) e Metiltransferases (MET) são importantes no processo de biotransformação de fase II, que é caracterizada por reações de conjugação (ZAMEK-GLISZCZYNSKI et al., 2006).

A indução da síntese das proteínas de estresse ou proteínas de choque térmico (*Heat Shock Protein*, HSP) também está incluída entre os biomarcadores bioquímicos para avaliação de contaminação. Sob condições normais na célula, as HSPs podem atuar como chaperonas, estabilizando os intermediários de polipeptídeos recém sintetizados. Estas proteínas atuam contra o efeito proteotóxico causado por uma grande variedade de contaminantes, incluindo o petróleo e seus derivados (WERNER; KLINE; HOLLIBAUGH, 1998; WOLFE et al., 1999; BIERKENS, 2000; SNYDER; GIRVETZ; MULDER, 2001).

1.4 Os programas de biomonitoramento

Os biomarcadores bioquímicos e moleculares atuam como sinalizadores da degradação ambiental causada pelos contaminantes, antecipando possíveis danos nas populações e comunidades biológicas (RAND, 1995). A inclusão dos biomarcadores nos programas de biomonitoramento ambiental possui a vantagem de representar um menor custo, maior facilidade e rapidez do que as análises químicas convencionais (GALLOWAY et al., 2004). Apesar destas vantagens, na maioria das vezes a especificidade das respostas dos biomarcadores para as diferentes classes de contaminantes não é muito clara (GALLOWAY et al., 2004).

Em razão da necessidade de métodos mais precisos e sensíveis na avaliação do risco ambiental das atividades antrópicas, o *International Council for the Exploration of the Sea* (ICES, 2004) aconselha que programas de biomonitoramento ambiental sejam realizados com o intuito de alertar e prevenir impactos irreversíveis nos ecossistemas. Nestes programas, recomenda-se: o uso de organismos sentinela, bioindicadores e monitores de contaminação; a realização de análises químicas, que determinam analiticamente a concentração dos contaminantes; a utilização dos biomarcadores de contaminação aquática, que refletem os impactos destes contaminantes nos organismos (ICES, 2004). Além desses monitoramentos em campo, pesquisas em laboratório são realizadas com o intuito de entender a toxicidade de diferentes hidrocarbonetos presentes no petróleo (BADO-NILLES et al., 2009).

Seguindo essa nova tendência nos programas de biomonitoramento, o uso de biomarcadores foi incorporado em diversos programas de monitoramento de poluição na Europa e

EUA, como o *North Sea Task Force Monitoring Master Plan* e o *NOAA's National Status and Trends Program* (CAJARAVILLE et al., 2000). Na região costeira do Brasil, podem ser citados o projeto MOMAM (Monitoramento do Ambiente Marinho) estabelecido em 1997 e coordenado pelo Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira (IEAPM – Ministério da Marinha) (VENTURA et al., 2004) e o projeto RECOS (Uso adequado dos Recursos Costeiros Qualidade Ambiental e Biodiversidade; Institutos do Milênio, Ministério da Ciência e Tecnologia) (ZANETTE; MONSERRAT; BIANCHINI, 2006).

A *Norwegian Oil Industry Association* (OLF, 2005) sugere o uso de biomarcadores bioquímicos na determinação dos efeitos biológicos em organismos aquáticos expostos a derivados de petróleo. Dentre alguns biomarcadores de uso freqüente destacam-se: as enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), pertencentes ao sistema de defesa antioxidante; a enzima de fase I de biotransformação Etóxi-resorufina-O-deetilase (EROD) e de fase II de biotransformação glutaciona S-transferase (GST).

Tendo em vista o risco ambiental associado à atividade da indústria petrolífera e a necessidade de programas de biomonitoramento eficazes na avaliação da qualidade ambiental, o presente estudo identificou biomarcadores bioquímicos e moleculares sensíveis aos contaminantes provenientes da atuação da indústria petrolífera em peixes *Poecilia vivipara* expostos à fração do óleo diesel acomodada em água.

2 OBJETIVOS GERAIS

1. Avaliar a bioacumulação de hidrocarbonetos nos tecidos de *Poecilia vivipara* expostas à fração do óleo diesel acomodada em água (FAD);

2. Analisar a atividade de enzimas pertencentes a defesa antioxidante e as fases I, II de biotransformação de xenobóticos no fígado e brânquias de peixes *Poecilia vivipara* expostos a FAD;

3. Construir uma biblioteca subtrativa de *Poecilia vivipara* com genes diferencialmente expressos para a FAD;

4. Relacionar os resultados da bioacumulação com as respostas bioquímicas e moleculares encontradas em *Poecilia vivipara*.

3 CAPÍTULO 1

**RESPOSTAS BIOQUÍMICAS NO PEIXE *Poecilia vivipara*
(BARRIGUDINHO) EXPOSTO À FRAÇÃO DE ÓLEO DIESEL
ACOMODADA EM ÁGUA**

RESUMO

O óleo diesel é um potencial contaminante de estuários e mangues, especialmente porque ele é o principal combustível utilizado em embarcações. Além disso, a exploração de petróleo e transporte causam sérios riscos ao ambiente marinho. O objetivo desse estudo foi identificar os efeitos de diferentes concentrações da fração do óleo diesel acomodada em água (FAD) no sistema de biotransformação e no sistema de defesa antioxidante enzimático de peixes *Poecilia vivipara*. Para verificar os efeitos nas enzimas de biotransformação e antioxidantes, os peixes foram separados em 5 grupos; um deles foi mantido como grupo controle e os demais expostos a 2,5%, 5%, 10%, e 20% da FAD. Após 96 horas, todos os peixes foram dissecados e tiveram seus fígados e brânquias removidos para análises da atividade enzimática da CYP1A (EROD), glutathione S-transferase (GST), glutathione reductase (GR), glutathione peroxidase (GPx), glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT). Os peixes expostos à concentração de 20% de FAD apresentaram um aumento na atividade GST, GR e EROD no fígado. As brânquias apresentaram um aumento na atividade GST nas concentrações de 10% e 20% da FAD, enquanto a atividade EROD aumentou nas concentrações de 2,5%, 10% e 20%. Esse aumento indica uma adaptação do sistema de biotransformação desses organismos para detoxificação dos hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos tipicamente encontrados no óleo diesel. O aumento da atividade EROD concomitante com atividade GST sugere um sinergismo entre a fase I e II de biotransformação para detoxificar os hidrocarbonetos. O aumento da atividade GR no fígado pode ser um mecanismo compensatório devido a um estado pró – oxidante promovido durante fase I de biotransformação. Entretanto, as enzimas SOD e CAT, que podem indicar um possível estresse oxidativo, não apresentaram mudanças na atividade enzimática.

Palavras-chave: biotransformação, óleo diesel, *Poecilia vivipara*

ABSTRACT

Diesel oil is a potential contaminant of estuarine and mangrove areas, especially, because it is the main fuel used in vessels. In addition, offshore oil exploration, production and transport pose serious risks to the marine environment. The aim of this study was identify the effects of different concentrations of Diesel Oil Water Accommodated Fraction (FAD) in the biotransformation and enzymatic antioxidant defense system in the fish *Poecilia vivipara*. To verify the effects in the biotransformation and antioxidant enzymes, the fishes were separated in five groups; one group was maintained as control e the others were exposed to 2,5%, 5%, 10% e 20% of FAD. After 96 hours, all fishes were dissected and livers and gills were separated for analysis of CYP1A (EROD), Glutathione S-transferase (GST), Glutathione Reductase (GR), Glutathione Peroxidase (GPx), Glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PDH), Superoxide dismutase (SOD), Catalase (CAT) enzymatic activity. Fish exposed to 20% of FAD showed an increase in the GST, GR and EROD enzymatic activity in liver. The gills showed an increase in GST activity in the 10% and 20% FAD concentrations, while EROD activity increased in the 2.5%, 10% e 20% FAD concentrations. These increases indicate a biotransformation system adaptation of these organisms to detoxify the aliphatic and aromatic hydrocarbons typically found in the diesel oil. The concomitant increase in EROD and GST activity suggest a synergism between phase I and II of biotransformation to detoxify the hydrocarbons. The GR activity in the liver can be a compensatory mechanism against a pro-oxidant state promoted by the first step of biotransformation. However, the enzymes SOD and CAT, that can indicate oxidative stress, did not show any change in enzymatic activity.

Keywords: biotransformation, diesel oil, *Poecilia vivipara*

4 INTRODUÇÃO

A poluição marinha é definida como a introdução de substâncias tóxicas ou de energia oriundos da atividade antrópica em um ambiente marinho, incluindo estuários, resultando em um efeito deletério para os recursos vivos e danos para a saúde humana (GESAMP, 1991).

As substâncias tóxicas, por não comporem a bioquímica usual de um organismo, são também denominadas xenobióticos. Os xenobióticos estão em constante aumento no ambiente, tanto em sua quantidade, quanto em sua variedade (LIVINGSTONE, 1993; WALKER et al., 1996).

Dentre os diferentes tipos de xenobióticos, os derivados de petróleo são alguns dos mais relevantes para a ecotoxicologia aquática (PACHECO; SANTOS, 2001a) e têm causado bastante preocupação, tanto pela frequência dos eventos de contaminação como pelo elevado potencial poluidor dos seus compostos. Embora grandes vazamentos de petróleo sejam preocupantes e ocupem grande espaço na mídia, estima-se que a principal fonte de contaminação por petróleo e seus derivados seja causada por pequenos e contínuos vazamentos de combustíveis em postos de distribuição devido ao envelhecimento dos tanques de combustíveis (TIBURTIUS et al., 2005).

Dentre os derivados do petróleo, o óleo diesel merece destaque em termos de risco ambiental por ser continuamente lançado nos ambientes costeiros em função de seu uso como combustível de embarcações, veículos rodoviários e máquinas em geral (KENNISH, 1992; FILHO, 2006).

O óleo diesel é composto basicamente por hidrocarbonetos alifáticos (HAs), principalmente parafinas, além de apresentar

uma pequena porcentagem de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) (NEFF, 2002). Embora pouco representativos em relação aos HAs, os HPAs têm sido identificados como os componentes do óleo que apresentam elevado risco ao ambiente, sendo diretamente relacionados a processos carcinogênicos (AAS et al., 2000). Estudos realizados em *Prochilodus lineatus* expostos à Fração do óleo diesel acomodada em água mostraram a ocorrência de lesões em brânquias e fígado, redução na hemoglobina e anormalidades nos eritrócitos como micronúcleos e quebras no DNA (SIMONATO; GUEDES; MARTINEZ, 2008; VANZELLA; MARTINEZ; CÓLUS, 2007). Um outro estudo, realizado com *Carassius auratus* expostos à fração acomodada em água do óleo diesel, mostrou mudanças na atividade de enzimas pertencentes às defesas antioxidantes e na enzima glutathione S-transferase (GST) (ZHANG et al., 2004).

Em peixes, a biotransformação de HPAs ocorre principalmente no fígado e envolve enzimas do retículo endoplasmático como as oxigenases de função mista (MFOs) e Citocromos P450 (CYPs) associados a atividade Etoxirosorufina O-deetilase (EROD). Os metabólitos resultantes da fase I de biotransformação se tornam substratos mais adequados para reações de conjugação com sulfato, ácido glicorônico, glutathione ou aminoácidos que compõem a fase II de biotransformação (INSAUSTI et al., 2009; ZAMEK-GLISZCZYNSKI et al., 2006). Essas reações de conjugação aumentam a hidrosolubilidade, a carga negativa e o peso molecular dos xenobióticos, reduzindo sua permeabilidade a membrana plasmática. Dessa forma, é necessário a existência de proteínas carreadoras de membrana que transportem essas substâncias para o sangue sinosoidal, para posterior excreção via urina, ou para os canalículos (excreção via bile) (ZAMEK-GLISZCZYNSKI et al., 2006). O processo de transporte de xenobióticos pelas proteínas de

membrana é denominado como fase III de biotransformação (KEPPLER; RINGWOOD, 2001).

Além das fases I, II, III de biotransformação, existe um importante conjunto de enzimas e moléculas responsáveis pelas defesas antioxidantes celulares. As defesas antioxidantes atuam protegendo as células contra os efeitos deletérios de espécies reativas de oxigênio (EROs), que podem ser geradas pelos contaminantes ou no processo de biotransformação desses contaminantes. As defesas antioxidantes podem ser não enzimáticas como por exemplo, o tripeptídeo glutaciona reduzida (GSH), ou enzimáticas, como as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutaciona peroxidase (GPx), glutaciona redutase (GR) e glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH) (BRAY; LEVY, 2000).

A atividade enzimática e expressão gênica das enzimas do sistema de biotransformação e antioxidantes podem ser utilizadas como biomarcadores. Os biomarcadores são definidos por Walker et al. (1996) como alterações biológicas em nível molecular, celular ou fisiológico que expressam os efeitos tóxicos causados pelos contaminantes nos organismos expostos.

A inclusão dos biomarcadores nos programas de biomonitoramento ambiental possui a vantagem de representar um menor custo, maior facilidade e rapidez do que as análises químicas convencionais (GALLOWAY et al., 2004). Nestes programas, recomenda-se o uso de organismos sentinela, bioindicadores e monitores de contaminação; a realização de análises químicas, que determinam analiticamente a concentração dos contaminantes; a utilização dos biomarcadores de contaminação aquática, que refletem os impactos destes contaminantes nos organismos (ICES, 2004).

Entre os programas de biomonitoramento realizados na região costeira do Brasil podem ser citados: o projeto MOMAM (Monitoramento do Ambiente Marinho) estabelecido em 1997 e

coordenado pelo Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira (IEAPM – Ministério da Marinha) (VENTURA et al., 2004) e o projeto RECOS-QIABO (Recursos Costeiros – Qualidade Ambiental; Institutos do Milênio, Ministério da Ciência e Tecnologia) (ZANETTE et al., 2006).

Apesar das vantagens no uso de biomarcadores nos programas de biomonitoramento, na maioria das vezes a especificidade das respostas dos biomarcadores para as diferentes classes de contaminantes não é muito clara (GALLOWAY et al., 2004). Desta forma, são necessários mais estudos para definir a especificidade dos biomarcadores, bem como elucidar os mecanismos de toxicidade de diferentes classes de contaminantes em espécies nativas para seu uso em programas de biomonitoramento.

Tendo em vista o risco ambiental associado à atividade da indústria petrolífera e a necessidade de programas de monitoramento eficazes na avaliação da qualidade ambiental, esse estudo avaliou biomarcadores bioquímicos clássicos para verificar os efeitos biológicos no peixe *Poecilia vivipara* expostos à fração do óleo diesel acomodada em água (FAD).

5 OBJETIVOS

1. Avaliar a bioacumulação de hidrocarbonetos no peixe *Poecilia vivipara* exposto à fração do óleo diesel acomodada em água (FAD).

2. Analisar a atividade de enzimas pertencentes a defesa antioxidante e as fases I, II de biotransformação no fígado e brânquias de peixes *Poecilia vivipara* expostos a FAD.

3. Relacionar os resultados da bioacumulação nos tecidos com as respostas bioquímicas encontradas no peixe *Poecilia vivipara* exposto a FAD.

6 MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 Coleta dos Peixes *Poecilia vivipara*

Os exemplares de *P. vivipara* (Bloch; Schneider, 1801) foram coletados nos tanques de cultivo de peixes do laboratório de Piscicultura Marinha, Departamento de Aqüicultura, localizado na Barra da Lagoa, Florianópolis, SC, em local onde foram encontrados em grande abundância. Para a coleta dos animais, foi utilizada uma armadilha (Minnowtrap™) utilizando ração para peixe como atrativo.

Os peixes foram transportados ao Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica (LABCAI), CCB, UFSC. Neste laboratório, os animais foram aclimatados por 60 dias em água do mar filtrada (0,45µm), a 21°C, com salinidade 25, com aeração constante e submetidos a um fotoperíodo de 12:12 horas. Durante este período, os peixes receberam ração peletizada para peixes duas vezes ao dia e 50% da água dos aquários foi renovada diariamente. Os procedimentos adotados para coleta, transporte e aclimação dos peixes seguiu protocolo CEUA PP00266 no qual está anexada a autorização do IBAMA.

6.2 Preparação da fração do óleo diesel acomodada em água (FAD)

Amostras de óleo diesel comercial foram obtidas junto a postos de abastecimento de combustíveis.

A Fração do óleo diesel acomodada em água (FAD) foi obtida conforme metodologia descrita por Singer e colaboradores (2000). Em um frasco de vidro (mariote) com capacidade para 14 litros foi preparada uma solução óleo diesel:água do mar filtrada na proporção de 1:9. Ao frasco foi acoplado um homogeneizador de tecidos (Glas-Col) modificado, no qual um pistilo de aço inoxidável de 47cm de altura atuou como uma “pá homogeneizadora”. Para obtenção da FAD, este frasco foi envolto com papel alumínio para evitar a penetração de luz e a rotação do homogeneizador foi ajustada para 140rpm durante 23 horas a 21°C. Depois de cessar a agitação, o frasco foi deixado pelo período de 1 hora para estabilização.

A solução aquosa obtida foi imediatamente utilizada nos testes de exposição à Fração do óleo diesel acomodada em água (FAD).

6.3 Exposição dos peixes *Poecilia vivipara* a diversas concentrações da FAD

Após a obtenção da FAD, foi conduzido um teste de toxicidade aguda por 96 horas a fim de selecionar as concentrações da FAD que apresentassem efeitos na atividade das enzimas analisadas neste estudo. Após selecionada essa

concentração, uma nova exposição foi realizada para obtenção de tecidos visando à identificação de novos biomarcadores moleculares de contaminação em *P. vivipara* (Capítulo 2).

Os testes foram realizados em aquários de vidro com capacidade para 15 litros, em duplicata, com 10 animais em cada aquário (um peixe por litro de água). Foram testadas quatro concentrações de FAD: 2,5%, 5%, 10% e 20%, conforme sugerido pelo Prof. Dr. Charrid Resgalla (Univali).

Um grupo controle também foi utilizado, no qual os animais foram expostos somente à água do mar. Durante o teste, os animais foram mantidos em jejum com temperatura e aeração constantes e com um fotoperíodo de 12:12 horas.

Ao término das 96 horas de exposição, não foi observada letalidade para os peixes em nenhuma das concentrações utilizadas. Dessa forma, amostras de fígados e brânquias de todos os animais foram dissecadas e armazenadas. O restante dos tecidos foi acondicionado em papel alumínio e armazenado em freezer -80°C para análise química.

6.4 Análise Química

O procedimento metodológico descrito a seguir foi baseado em Macleod et al. (1986) com algumas modificações. Aproximadamente 5 g das amostras dos peixes inteiros foram secos e macerados com sulfato de sódio anidro (J.T. Baker), que foi calcinado por 4 h a uma temperatura de 440°C. Esse homogenato foi colocado em cartucho de vidro com placa sinterizada e extraído em soxhlet durante 8 h com n-hexano e diclorometano 50% (v/v). O grau de pureza dos solventes utilizado foi “grau para análise de resíduos orgânicos”, ambos da

J. T. Baker (Estados Unidos). Antes da extração foram adicionados 100 μL de uma mistura de naftaleno- d_8 , acenafteno- d_{10} , fenantreno- d_{10} , criseno- d_{12} e perileno- d_{12} ($5 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$) e n-hexadeceno e n-eicoseno ($50 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$) como padrões internos em cada uma das amostras e no branco.

O extrato evaporado foi submetido a uma coluna cromatográfica contendo 8 gramas de sílica gel sobre 16 g de alumina (ambas da Merck), 5% desativadas com água pré-extraída 5 vezes com n-hexano, e 1 g de sulfato de sódio. A eluição foi feita com 40 mL de n-hexano para análise dos hidrocarbonetos alifáticos e uma mistura de n-hexano e diclorometano (50%) para análise dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs). Para purificação complementar, o eluato da F2 foi concentrado a 0,5 mL e injetado no cromatógrafo líquido de alto desempenho (HPLC) (Perkin Elmer) equipado com duas colunas de exclusão (permeação em gel). A fase móvel utilizada foi o diclorometano. Os padrões internos tetradeceno e benzo(b)fluoranteno- d_{12} foram adicionados nos eluatos concentrados F1 e F2 com volume de 1 mL, respectivamente.

Uma alíquota da F1 foi injetada no cromatógrafo a gás equipado com detector de ionização de chama (GC-FID), (Agilent Technologies) para hidrocarbonetos alifáticos. Os HPAs foram analisados no cromatógrafo a gás equipado com espectrômetro de massas (GC-MS), 6890/5973N (Agilent Technologies).

As temperaturas do injetor e detector do GC-FID foram de 300°C e 325°C , respectivamente. O gás de arraste foi o hidrogênio ultrapuro e o gás auxiliar foi o nitrogênio. A coluna cromatográfica era de 30 metros de comprimento, diâmetro interno de 0,25 mm e espessura do filme de 5% fenilmetilsiloxana de 0,5 μm (J&W Scientific). As temperaturas do GC-MS foram de 280, 280 e 300°C no injetor e na interface e na fonte de íons, respectivamente. A coluna cromatográfica utilizada foi da J&W Scientific com 30 metros de comprimento, 0,25 mm de diâmetro

interno e 0,25 μm de espessura de filme de 5% fenilmetilsiloxana. O modo de aquisição foi o SIM (monitoramento seletivo de íons). A rampa de temperatura para PCBs foi: início a 75°C durante 3 min, aumento a uma taxa de 15°C até 150°C e a 2°C até 260°C e a 20°C até 300°C permanecendo constante durante 1 min. A rampa tanto para os AHs quanto para os HPAs teve início em 40°C com aumento a taxa de 20°C até 60°C e a 5°C min até 290°C onde permaneceu por 5 min e aumento a 10°C até 300°C onde permaneceu constante durante 10 min.

A identificação AHs e HPAs foi feita por comparação dos tempos de retenção com padrões de referência da Accustandard, EUA. Os compostos analisados no GC-MS também foram identificados através do espectro de massas. A quantificação foi feita por razões entre os padrões internos e os compostos de interesse, baseada nas curvas analíticas montadas com pelo menos 05 concentrações diferentes de cada grupo de compostos.

6.5 Biomarcadores bioquímicos

6.5.1 *Preparação das amostras*

As amostras de fígados e brânquias de peixes expostos às diferentes concentrações de FAD foram descongeladas sobre gelo, pesadas e homogeneizadas em quatro vezes o volume de tampão de homogeneização, utilizando o homogeneizador tipo *Potter* (Glas-Col), e centrifugadas a 9.000 x g a 4°C por 30 min. O sobrenadante foi então submetido a uma nova centrifugação a

39.000g por 90 min. O sobrenadante (fração citosólica), resultante dessa última centrifugação, foi separado em alíquotas e congelado em -80°C para análise dos biomarcadores bioquímicos, enquanto o pellet contendo as microssomas (fração microssomal) foi ressuspenso em tampão para microssoma (citrato de sódio 0,1M pH 7,6 contendo KCl 0,1M, glicerol 30% (v/v) e ditioneitol 1mM), separado em alíquotas e estocado em freezer -80°C , para a análise da atividade EROD.

6.5.2 Determinação da concentração de proteínas

A concentração de proteínas totais presentes na fração citosólica e microssomal foi determinada de acordo com Lowry modificado por Peterson (1977), utilizando-se soro albumina bovina como padrão. O ensaio foi realizado em microplaca. Os resultados dessa análise foram utilizados para normalizar os dados da atividade enzimática.

6.5.3 Superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi determinada segundo a metodologia descrita por Mccord e Fridovich (1969), que se baseia na inibição da redução do citocromo c pelo $\text{O}_2^{\cdot-}$, produzida pelo sistema xantina/xantina oxidase. Esta inibição é medida através do aumento de absorvância em 550nm, a 25°C .

6.5.4 Catalase (CAT)

A atividade da catalase foi analisada de acordo com o método descrito por Beutler (1975). Nesta metodologia, o decréscimo de absorbância associado à velocidade de degradação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água e oxigênio molecular foi registrado a 240 nm.

6.5.5 Glutathione reductase (GR)

A atividade da glutathione reductase baseou-se no método descrito por Carlberg e Mannervik (1985). Ao reduzir o substrato glutathione dissulfidica (GSSG), a GR oxida NADPH, que pode ser monitorado pelo decréscimo de absorbância no comprimento de onda de 340nm. Assim, a velocidade de consumo de NADPH expressa a atividade desta enzima.

6.5.6 Glutathione peroxidase (GPx)

A atividade desta enzima foi acompanhada indiretamente pelo desaparecimento do NADPH. A GPx utiliza glutathione reduzida (GSH) para reduzir um peróxido orgânico, como o peróxido de cumeno (Cu-OOH), originando glutathione dissulfidica (GSSG) no final da reação. A GSSG é reduzida pela enzima glutathione reductase (GR) utilizando elétrons doados pelo

NADPH. A taxa de oxidação de NADPH foi acompanhada espectrofotometricamente a 340nm (WENDEL, 1981).

6.5.7 *Glutathione S-transferase (GST)*

A atividade de GST foi determinada de acordo com Keen, Habig e Jakoby (1976) por um ensaio que utiliza o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) como substrato. O CDNB, após a glutathionação, sofre uma mudança nas suas propriedades espectrofotométricas que foi monitorado em 340nm por 2 minutos.

6.5.8 *Glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH)*

A atividade da G6PDH foi determinada através do aumento de absorvância em 340nm provocado pela redução de NADP^+ a NADPH (GLOCK; MCLEAN, 1953).

6.5.9 *Etóxi-resorufina O-Deetilase (EROD)*

A atividade da EROD foi analisada espectrofluorimetricamente medindo o aumento da fluorescência da resorufina (Ex/Em 530/585). As concentrações no ensaio foram: NADPH 1,67 mM; Etóxi-resorufina 2 μM ; TRIS 50 mM,

pH7,8. A atividade da EROD foi analisada na fração microsomal.

6.5.10 Análises estatísticas

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente quanto a normalidade dos dados e homocedacidade das variâncias. O teste de hipótese utilizado foi o teste paramétrico One-way ANOVA (5%), seguido do pós teste de Dunett (5%), quando necessário. Todas as análises estatísticas foram realizadas com os *software Statistica 6.1.* e para a apresentação dos gráficos foi utilizado o *software GraphPad Prism 5.0.* Todos os dados estão apresentados na forma de média e desvio padrão.

7 RESULTADOS

7.1 Análise química de hidrocarbonetos alifáticos em *P. vivipara*

A Tabela 1 mostra as concentrações de hidrocarbonetos alifáticos em amostras de *P.vivipara* submetidas a diferentes porcentagens da FAD durante 96 horas. As concentrações de hidrocarbonetos alifáticos variaram de 3,91 a 390 $\mu\text{g.g}^{-1}$ (Tabela 1). A interpretação da presença de hidrocarbonetos alifáticos requer o auxílio de alguns parâmetros úteis para distinguir se são provenientes de origem biogênica ou antropogênica. Os parâmetros estão apresentados na Tabela 1; são eles: n-alcenos totais, razão pristano/fitano e mistura complexa não resolvida (MCNR).

As concentrações de n-alcenos totais nos peixes expostos apresentaram um intervalo de 1,55 a 14,3 $\mu\text{g g}^{-1}$ e uma amostra controle com 1,10 $\mu\text{g g}^{-1}$. A amostra exposta a 5% da FAD apresentou uma contaminação que impossibilitou a análise de hidrocarbonetos (Tabela 1).

As Figuras 1 e 2 mostram semelhanças quando se compara o perfil de distribuição de n-alcenos da amostra controle e da amostra exposta 2,5% da FAD. Apesar das baixas concentrações, é possível observar que existe uma predominância de n-alcenos ímpares tanto leves (n-C₁₅ e n-C₁₇) quanto pesados (n-C₂₃, n-C₂₅, n-C₂₇, n-C₂₉, n-C₃₁).

Tabela 1. Concentração de hidrocarbonetos alifáticos ($\mu\text{g.g}^{-1}$ peso seco): n-alcenos, pristano e fitano, Alifáticos totais e resolvidos, alcenos totais, razão pristano/fitano e MCNR em amostras de *Poecilia vivipara* expostas por a fração do óleo diesel acomodada em água (FAD). Legenda: n.d.(não detectado); n.c. (não foi possível medir devido a contaminação).

HAs	Controle	2,5%	5,0%	10%	20%
C12	n.d.	n.d.	n.c.	n.d.	0,369
C13	n.d.	n.d.	n.c.	0,171	0,919
C14	n.d.	0,184	n.c.	0,32	1,264
C15	0,105	0,143	n.c.	0,447	1,578
C16	n.d.	0,362	n.c.	0,525	1,416
C17	0,137	0,145	n.c.	0,343	1,462
C18	n.d.	n.d.	n.c.	0,096	1,021
C19	n.d.	n.d.	n.c.	0,21	1,095
C20	n.d.	0,261	n.c.	0,355	0,855
C21	n.d.	n.d.	n.c.	0,145	0,888
C22	n.d.	n.d.	n.c.	0,121	0,702
C23	n.d.	n.d.	n.c.	0,093	0,507
C24	n.d.	n.d.	n.c.	n.d.	0,417
C25	0,181	0,117	n.c.	n.d.	0,306
C26	n.d.	n.d.	n.c.	n.d.	0,288
C27	n.d.	n.d.	n.c.	0,109	0,29
C28	n.d.	n.d.	n.c.	n.d.	0,214
C29	0,191	0,158	n.c.	0,274	0,378
C30	n.d.	n.d.	n.c.	n.d.	n.d.
C31	0,272	0,181	n.c.	0,249	0,244
C32	n.d.	n.d.	n.c.	n.d.	n.d.
C33	0,215	n.d.	n.c.	0,161	0,131
C34	n.d.	n.d.	n.c.	n.d.	n.d.
Pristano	0,271	0,825	n.c.	1,71	4,22
Fitano	0,241	0,487	n.c.	0,972	2,42
Alifáticos Totais	3,91	9,05	n.c.	29,1	390
Alifáticos Resolvidos	3,91	9,05	n.c.	29,1	88,8
Alcenos Totais	1,1	1,55	n.c.	3,62	14,3
pristano/fitano	1,1	1,7	n.c.	1,8	1,7
MCNR	n.d.	n.d.	n.c.	n.d.	301

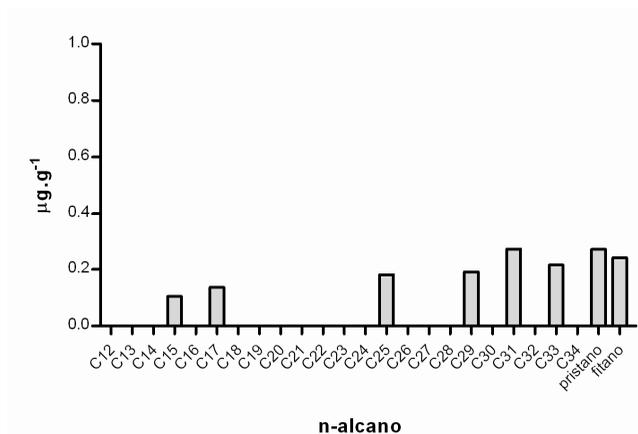


Figura 1. Perfil de distribuição dos n-alcenos em peixes *Poecilia vivipara* controle. O gráfico mostra a presença de n-alcenos ímpares de cadeia leve (n-C₁₅ e n-C₁₇) e pesada (n-C₂₃, n-C₂₅, n-C₂₇, n-C₂₉, n-C₃₁).

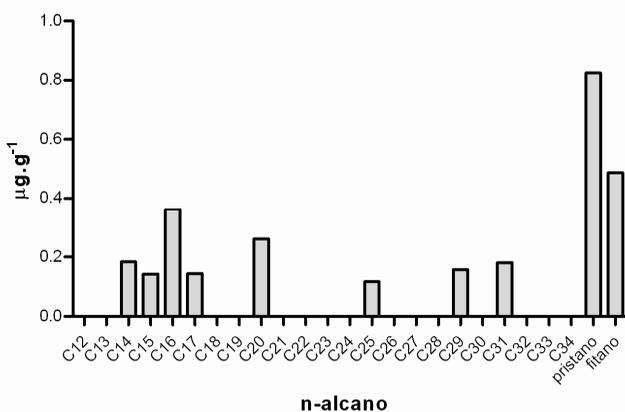


Figura 2. Perfil de distribuição dos n-alcenos em amostra de peixes *Poecilia vivipara* expostos durante 96 horas a 2,5% da FAD. O gráfico mostra a presença de n-alcenos ímpares de cadeia leve (n-C₁₅ e n-C₁₇), pesada (n-C₂₃, n-C₂₅, n-C₂₇, n-C₂₉, n-C₃₁) e alcenos pares n-C₁₄, n-C₁₆ e n-C₂₀.

Os peixes expostos a 10 e 20% da FAD mostraram ausência de predominância de n-alcenos de cadeia par ou ímpar (Figura 3 e 4).

Além dos n-alcenos, pode-se avaliar a presença individual de alguns hidrocarbonetos alifáticos ramificados como o pristano e fitano. As amostras expostas durante 96 horas apresentaram razões pristano/fitano de 1,1 (controle), 1,7 (2,5%), 1,8 (10%) e 1,7 (20%) (Tabela 1).

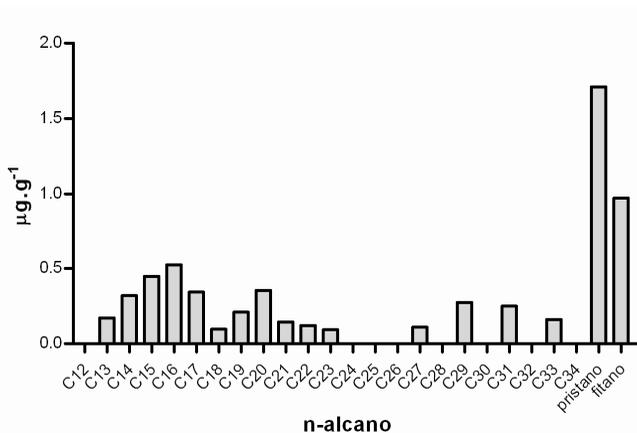


Figura 3. Perfil de distribuição dos n-alcenos em amostra de peixes *Poecilia vivipara* expostos durante 96 horas a 10% da FAD. O gráfico mostra ausência de predominância de n-alcenos de cadeia par ou ímpar.

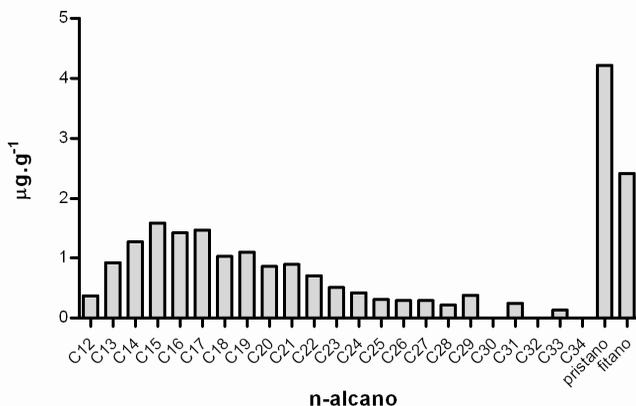


Figura 4. Perfil de distribuição dos n-alcenos em amostra de peixes *Poecilia vivipara* expostos durante 96 horas a 20% da FAD. O gráfico mostra ausência de predominância de n-alcenos de cadeia par ou ímpar.

Um indicador muito importante da presença de hidrocarbonetos do petróleo na análise por cromatografia em fase gasosa é a elevação na linha de base do cromatograma causada pela Mistura Complexa Não Resolvida (MCNR) (FARRINGTON et al., 1977). Foi detectada a presença de Mistura Complexa Não Resolvida (MCNR) somente na amostra exposta a 20% da FAD (Figura 5), que se apresenta diferente da amostra controle (Figura 6)

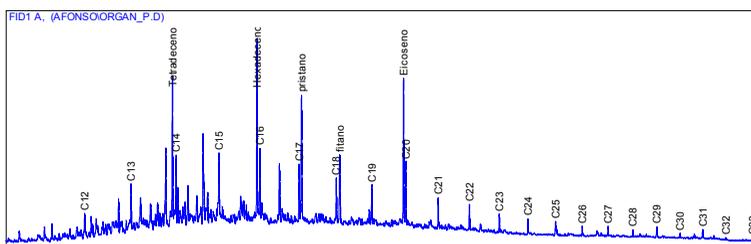


Figura 5. Cromatograma da amostra de peixe *Poecilia vivipara* exposto durante 96 horas a uma concentração contendo 20% da FAD. O gráfico mostra uma elevação na linha base do cromatograma.

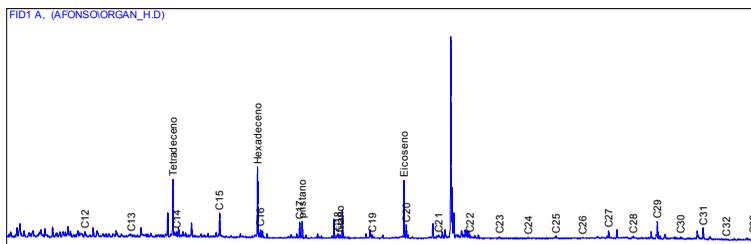


Figura 6. Cromatograma da amostra de peixe *Poecilia vivipara* controle. O gráfico mostra a estabilidade da linha base do cromatograma.

7.2 Análise química de hidrocarbonetos aromáticos em *P. vivipara*

A Tabela 2 mostra as concentrações de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) nas amostras de peixes expostos a diversas concentrações da FAD. O controle do experimento apresentou uma concentração mais alta de HPAs totais do que os peixes expostos a 2,5% da FAD (tabela 2). Considerando todas as concentrações da FAD, os HPAs mais abundantes no tecido de peixes *P. vivipara* continham 2 ou 3 anéis aromáticos, sendo representados pelas formas metiladas e etiladas do naftaleno, seguidas pelo bifenil, fluoreno e fenantreno. A análise de correlação (tabela 3) mostrou correlações entre a FAD e as enzimas EROD, GST no fígado e GST na brânquia. Além disso, existe correlação entre a FAD e os HPA total.

Tabela 2. Concentração de hidrocarbonetos aromáticos (ng.g^{-1} peso seco) em amostras de *Poecilia vivipara* expostos durante 96 horas a diferentes concentrações da fração do óleo diesel acomodada em água (FAD). Legenda: n.d (não detectado).

HPAs	Controle	2,5%	5,0%	10%	20%
Naftaleno	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Σ metilnaftalenos	198,3	67	213	656	1883
Bifenil	n.d.	11,1	34,8	229	487
Σ etilnaftalenos	8,49	37,9	118	404,9	924
Σ dimetilnaftalenos	117	52,5	368	1631	3784
Acenaftileno	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Acenafteno	n.d.	n.d.	9,86	30,8	73,5
Σ trimetilnaftalenos	16,5	65,7	218	689	914
Fluoreno	9,89	n.d.	17,2	64,3	185
Σ metilfluorenos	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Dibenzotiofeno	2,67	n.d.	n.d.	11,5	34,3
Fenantreno	10,8	n.d.	5,03	26,4	108
Antraceno	n.d.	n.d.	n.d.	7,8	n.d.
Σ dimetilfluorenos	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Σ metildibenzotiofenos	n.d.	n.d.	3,14	6,86	17
Σ dimetilfenantrenos	n.d.	n.d.	n.d.	25,8	90
Σ metilfenantrenos	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Fluoranteno	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Pireno	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Σ metilfluorantenos	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Reteno	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Σ metilpireno	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Benzo(c) Fenantreno	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Benzo(a)Antraceno	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Criseno	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Σ metilcriseno	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Dimetilcriseno	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Benzo(b)fluoranteno	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Benzo(j)fluoranteno	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Benzo(k)fluoranteno	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Benzo(e)pireno	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Benzo(a)pireno	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Perileno	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Indeno [1,2,3-c,d]pireno	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Dibenzo(a,h)antraceno	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Benzo(b)criseno	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Benzo(g,h,i)perileno	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Σ HPAs	364	234	986	3783	8499

Tabela 3. Correlação entre a FAD, HPA total e as análises bioquímicas em peixes *Poecilia vivipara* expostos durante 96 horas a diferentes concentrações da fração do óleo diesel acomodada em água (FAD). Os valores em negrito mostram o coeficiente de Pearson com significância de $p < 0,05$. Os parâmetros bioquímicos ausentes não atingiram a significância estatística de $p < 0,05$.

	FAD	HPA	GST fig	GST bra	EROD fig
FAD		0,99	0,97	0,93	0,92
HPA	0,99		0,96	0,89	0,89
GST fig	0,97	0,96		0,89	0,98
GST bra	0,93	0,89	0,89		0,86
EROD fig	0,92	0,89	0,98	0,86	

7.3 Biomarcadores bioquímicos em peixe *P. vivipara*

Peixes da espécie *P. vivipara* foram expostos a quatro diferentes concentrações de FAD (2,5%, 5%, 10% e 20%) por 96 horas e nenhuma letalidade foi observada. Dessa forma, 10 amostras de peixes de cada concentração foram utilizadas para avaliação dos biomarcadores bioquímicos. Nesses ensaios foram analisadas a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutationa peroxidase (GPx), glutationa redutase (GR), glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), glutationa S-transferase (GST) e Etóxi-resorufina O-deetilase (EROD) na brânquia e fígado dos peixes.

Na brânquia a atividade das enzimas GST e EROD foram as únicas que apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo controle (Figura 8). A atividade da GST apresentou um aumento nos grupos expostos a 10% e 20% da FAD (Figura 8), enquanto a atividade EROD aumentou nas concentrações de 2,5% 10% e 20% da FAD (Figura 9).

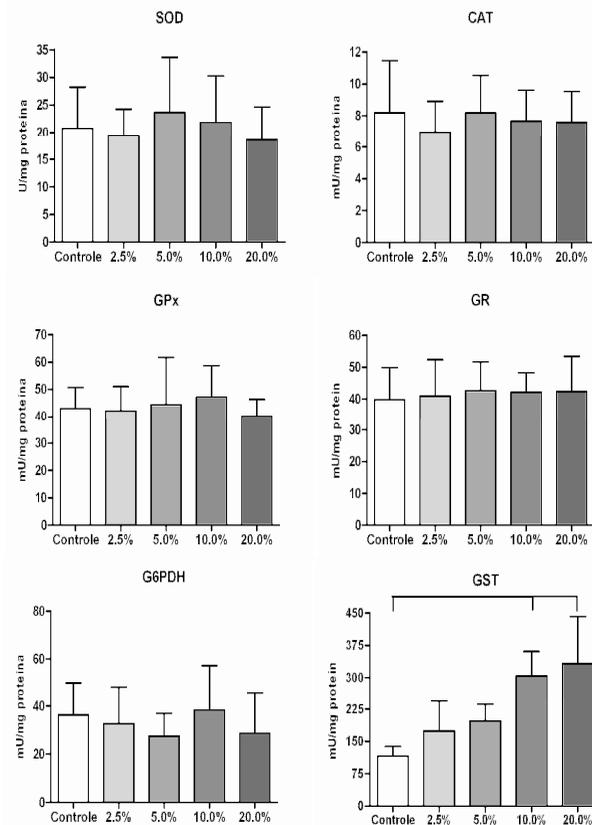


Figura 7. Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona peroxidase (GPx), glutatona redutase (GR), glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) e glutatona S-transferase (GST) em brânquias de peixes *Poecilia vivipara* expostos a diferentes concentrações da fração do óleo diesel acomodada em água (FAD) por 96 h. As barras demonstram diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle e os dados estão apresentados na forma de média e desvio padrão.

No fígado, a atividade GR, GST e EROD apresentou um aumento significativo na concentração de 20% da FAD em relação ao grupo controle (Figura 8 e 10).

As demais enzimas não apresentaram alterações significativas na atividade enzimática.

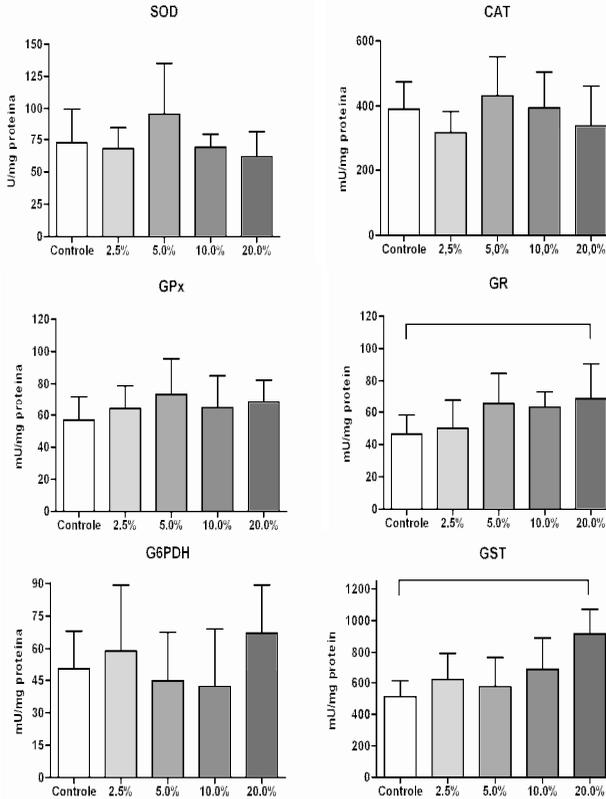


Figura 8. Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutaciona peroxidase (GPx), glutaciona redutase (GR), glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) e glutaciona S-transferase (GST) em fígado de peixes *Poecilia vivipara* expostos a diferentes concentrações da fração do óleo diesel acomodada em água (FAD) por 96 h. As barras demonstram diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle e os dados estão apresentados na forma de média e desvio padrão.

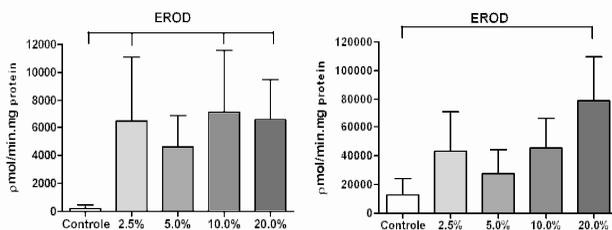


Figura 9. Atividade EROD na brânquia (esquerda) e fígado (direita) de peixes *Poecilia vivipara* expostos a diferentes concentrações da fração do óleo diesel acomodada em água (FAD) por 96 h. As barras demonstram diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle e os dados estão apresentados na forma de média e desvio padrão.

8 DISCUSSÃO

8.1 Análise Química

Os diferentes tipos de petróleo apresentam em sua composição uma gama de n-alcenos variando de 1 a 40 átomos de carbono, caracterizados pela ausência de uma dominância ímpar ou par no número de carbonos nas cadeias moleculares (SIMONEIT, 1993). Segundo Bishop (1983), os produtos derivados do petróleo caracterizam-se pela presença de n-alcenos dentro de uma faixa mais restrita de peso molecular, em decorrência dos processos de refino.

A predominância de n-alcenos ímpares leves e pesados nas amostras controle e exposta a 2,5% da FAD (Figura 2) sugere que *P. vivipara* pode ter ingerido fitoplâncton (n-C₁₅ e n-C₁₇), bem como de plantas superiores (n-C₂₃, n-C₂₅, n-C₂₇, n-C₂₉, n-C₃₁) do ambiente onde foram coletadas (VOLKMAN et al., 1992).

Os peixes expostos a 10 e 20% da FAD mostraram perfis típicos da influência do óleo diesel. A ausência de predominância de hidrocarbonetos alifáticos de cadeia par ou ímpar nas amostras de peixe mostra que houve acumulação da FAD nos peixes expostos a 10 e 20% da FAD (Figura 3 e 4).

Quanto a Mistura Complexa Não Resolvida (MCNR), a amostra exposta a 20% da FAD apresentou um aumento na linha base do cromatograma em relação ao controle (Figura 5 e 6), mostrando que os organismos expostos acumularam os hidrocarbonetos dessa mistura. Essa elevação é caracterizada por uma mistura de compostos ramificados e cíclicos presentes

no petróleo e que não podem ser separados pela técnica utilizada nesse estudo. A MCNR está associada a compostos do óleo que são resistentes à degradação. Enquanto os compostos com estruturas mais simples degradam-se mais facilmente, essa mistura tende a acumular-se principalmente nos sedimentos (VOLKMAN et al., 1992), mas já foi observado também em alguns organismos como macrófitas e bivalves.

O pristano e o fitano são os isoprenóides mais abundantes no óleo diesel e podem ser encontrados em sedimentos contaminados, pois são mais resistentes a biodegradação que os alcanos lineares correspondentes (ROSA, 2001). As concentrações de pristano e fitano aumentaram conforme aumentava a concentração de FAD utilizada (Tabela 1), indicando que os peixes bioacumularam esses compostos. Além disso, a amostra controle também apresentou contaminação por esses isoprenóides, mostrando que o ambiente onde os peixes foram coletados apresentava a presença desses compostos, mesmo que em baixa concentração.

A correlação positiva entre a concentração de HPAs totais no tecido dos peixes e concentração de FAD utilizada no tratamento (Tabela 3), indica que houve acumulação de HPAs pelos peixes. A amostra controle apresentou níveis de HPAs similares às dos peixes do grupo exposto a 2,5%, o que sugere que o ambiente onde os peixes foram coletados possivelmente possuía um aporte destes compostos.

8.2 Biomarcadores Bioquímicos em *P. vivipara*

A natureza lipofílica dos hidrocarbonetos encontrados no óleo diesel possibilita uma rápida absorção destes pelos

organismos aquáticos através das membranas lipídicas das brânquias, pele e trato digestivo. Após a absorção, a ação destes compostos vai depender de sua susceptibilidade à biotransformação (ZANETTE, 2009).

Compostos dificilmente biotransformados tendem a ser acumulados nos tecidos, em especial o tecido adiposo. Aqueles passíveis de biotransformação serão convertidos a um metabólito mais hidrossolúvel que o parental, facilitando assim o processo de excreção (NEBERT; KARP, 2008). Embora o processo de biotransformação geralmente resulte em detoxificação do contaminante, a ação das enzimas do complexo Citocromo P450 (CYP450) também podem gerar metabólitos tóxicos que contribuem para o aumento do risco de câncer, deformações embrionárias e outros efeitos tóxicos (NEBERT; KARP, 2008). Esse é o caso de alguns HPAs como o benzo(a)pireno, que após ser biotransformado pelo CYP450, principalmente CYP1A, gera metabólitos reativos potencialmente mutagênicos. O HPA Naftaleno, após o processo de biotransformação de fase I pelo CYP1A, gera intermediários reativos (naftoquinonas), podendo causar estresse oxidativo, danos a DNA e lipoperoxidação no cérebro e no fígado em mamíferos (BAGCHI et al., 2002). Em peixes, a atividade catalítica do CYP1A (EROD) tem sido amplamente utilizada como um marcador da exposição a contaminantes há mais de três décadas (ZANETTE, 2009).

Neste estudo, a brânquia apresentou um aumento na atividade EROD nas concentrações de 2,5% 10% e 20% da FAD (Figura 9), enquanto no fígado o aumento foi significativo apenas na concentração de 20% da FAD (Figura 9). Esse resultado foi semelhante ao aumento na atividade EROD observado no fígado de enguias (*Anguilla anguilla*) expostas a FAD (PACHECO; SANTOS, 2001a).

O aumento na atividade EROD possivelmente está relacionado com a modulação transcricional do gene *CYP1A* pelo

Receptor de Hidrocarboneto Aromático (AHR) ativado pelos HPAs encontrados na FAD. Resumidamente, a via de ativação do AHR pode ser descrita assim: 1) a ativação do AHR por um agonista (HPAs); 2) interação com o translocador nuclear do receptor AHR (ARNT); 3) translocação do AHR para o núcleo; 4) ligação nos elementos de resposta a xenobióticos (XRE); 5) a iniciação da transcrição de inúmeros genes das fases de biotransformação I (*CYPs450*) e II (TIMME-LARAGY et al., 2007). Os HPAs encontrados na FAD deste estudo que podem se ligar ao receptor AHR são derivados metilados do fenantreno (VONDRACEK et al., 2007; BARRON; HEINTZ; RICE, 2004).

Outro resultado encontrado nesta dissertação (Capítulo 2), que corrobora para hipótese de indução da expressão do gene *CYP1A*, é a evidência direta da ativação transcricional do gene *CYP1A* verificada por Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa (Q-PCR). Contudo, nada impede que mecanismos pós-traducionais também estejam envolvidos na modificação da atividade catalítica do *CYP1A* (EROD). Esses resultados reforçam a utilização da atividade EROD e expressão de *CYP1A* em programas de biomonitoramento, uma vez que esses parâmetros já são amplamente utilizados como biomarcadores da contaminação ambiental por 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina (TCDD), bifenilas policloradas coplanares (PCBs) e HPAs (GOKSØYR; FÖRLIN, 1992).

O receptor AHR, além de modular a expressão de diversos genes da fase I de biotransformação, também modula genes da fase II como a *Glutathione S-transferase (GST)* e *Uridina difosfato glicoronosil transferase (UDPGT)* (ARUKWE; NORDBØ, 2008). Neste estudo, a atividade GST aumentou em ambos tecidos (Figura 7 e 8). Outros estudos em peixes dulciaquícolas expostos a FAD mostraram um aumento na atividade GST no fígado (ZHANG et al., 2004; SIMONATO; GUEDES; MARTINEZ, 2008). Além disso, a GST foi considerada um bom biomarcador para os

compostos presentes no óleo diesel (SIMONATO, GUEDES, MARTINEZ, 2008). A hipótese de modulação de genes de biotransformação de fase II pelo receptor AHR pode ser utilizada para explicar o aumento da atividade GST. Isso porque no presente estudo também foi encontrado um aumento na expressão gênica de uma isoforma de *GST* e de *UDPGT* após 24 h de exposição a uma concentração de 10% da FAD (Capítulo 2). Apesar da expressão gênica nem sempre significar um aumento na expressão e atividade de proteínas, os resultados obtidos sugerem fortemente a modulação da expressão gênica pelo receptor AHR. O aumento na atividade das enzimas EROD e GST, inclusive mostrando uma correlação entre essas enzimas e a concentração de HPA total (Tabela 3), indica uma maior capacidade de biotransformação das células contra os HPAs presentes no tecido dos peixes expostos a FAD, uma vez que estes compostos são potenciais substratos dessas enzimas (PACHECO; SANTOS, 2001b; ZHANG et al., 2004; SIMONATO; GUEDES; MARTINEZ, 2008; ARUKWE; NORDBØ, 2008; NAHRGANG et al., 2009).

O CYP1A durante o processo de biotransformação de xenobióticos pode produzir espécies reativas de oxigênio e, dependendo da situação, pode gerar uma situação de estresse oxidativo (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Alguns HPAs encontrados neste estudo, como o naftaleno, após ser biotransformado pelo CYP1A forma naftoquinonas. As quinonas são uma classe de moléculas capazes de doar ou receber elétrons facilmente. Dessa forma, as quinonas podem participar de reações de oxidoredução, ou seja, são capazes de se modificar entre uma forma oxidada e outra reduzida em um ciclo redox. Durante o ciclo redox as quinonas podem receber elétrons do NADPH e doar esses elétrons para o oxigênio, formando ânion superóxido. Assim, as quinonas são capazes de estabelecer um estado pró- oxidativo (FORMAN; ZHANG;

RINNA, 2009). A avaliação de enzimas do sistema de defesa antioxidante como a Catalase (CAT), Glutathione Peroxidase (GPx) e Superóxido Dismutase (SOD) é comum em programas de monitoramento (NAHRGANG et al., 2009).

Neste estudo as atividades das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx não foram alteradas pela exposição a FAD (Figura 7 e 8). Os estudos com peixes expostos a FAD durante 96 horas encontrados na literatura são contraditórios quanto as alterações na atividade das enzimas antioxidantes. Um estudo realizado com peixes *Carassius auratus* expostos a FAD mostrou um aumento na atividade SOD e diminuição na atividade CAT no fígado (ZHANG et al., 2004), enquanto outro trabalho realizado com o peixe *Prochilodus lineatus* mostrou ausência de alteração na atividade CAT (SIMONATO; GUEDES; MARTINEZ, 2008). A discrepância entre esses estudos pode ser atribuída às diferenças nas concentrações de FAD utilizadas, ou ao uso de espécies diferentes, sendo *P. vivipara* uma espécie estuarina e os demais peixes (*Carassius auratus* e *Prochilodus lineatus*) espécies dulciaquícolas.

Apesar da ausência de alteração na atividade da enzima SOD, CAT e GPx, a atividade de outra enzima antioxidante, a Glutathione Redutase (GR), aumentou no fígado na concentração de 20% da FAD (Figura 9). Embora a GR não esteja diretamente envolvida na defesa antioxidante, como as enzimas previamente descritas (CAT, GPx e SOD), essa enzima é responsável pela manutenção da homeostase do balanço entre glutathione reduzida e dissulfídica (GSH/GSSG) em situações normais e de estresse oxidativo. A GR catalisa a transformação da glutathione dissulfídica (GSSG) para sua forma reduzida (GSH) com a concomitante oxidação do NADPH para NADP (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Quando há deficiência no suprimento de NADPH, a função antioxidante da glutathione também é comprometida, pois a GSSG não pode ser

regenerada, causando sérios danos ao metabolismo celular. Neste sentido, a G6PDH também pode ser considerada uma enzima antioxidante co-adjuvante, pois produz NADPH na via das pentose fosfato (SLEKAR; KOSMAN; CULOTTA, 1996). Entretanto, neste experimento a atividade G6PDH não foi alterada com o tratamento em ambos tecidos (Figura 7 e 8).

O aumento na atividade GR é um potencial biomarcador para estresse oxidativo (STEPHENSEN; STURVE; FÖRLIN, 2002). Contudo, a hipótese de estresse oxidativo não pôde ser confirmada nem refutada, pois nenhum método foi utilizado para medir a produção de espécies reativas de oxigênio, níveis de glutathiona total, reduzida e dissulfídica, que poderiam indicar um possível estado pró-oxidante. Além disso, as atividades das enzimas antioxidantes CAT e SOD não foram alteradas em relação ao grupo controle como poderia ocorrer em um estado de estresse oxidativo.

Por outro lado, as atividades EROD e GST, neste estudo, foram de 3 a 10 vezes maiores no fígado do que na brânquia. Dessa forma, o fígado se torna um órgão mais suscetível do que a brânquia ao estresse oxidativo, tanto pela maior produção de espécies reativas de oxigênio devido à atividade EROD, quanto pela depleção de glutathiona promovida pela atividade GST. Sendo assim, o aumento da atividade GR no fígado poderia ser um mecanismo compensatório para restabelecer a razão GSH/GSSG alterada por um potencial estresse oxidativo hepático.

O mecanismo pelo qual a atividade GR aumentou pode envolver modulação gênica. Em mamíferos, a modulação do gene da *Glutathiona redutase* envolve a interação do fator de transcrição NRF2 com o elemento de resposta antioxidante (ARE) localizado na região promotora deste gene. O fator de transcrição NRF2, ao contrário do AHR, não é ativado por ligantes. Sob condições normais o NRF2 está associado a uma

proteína inibitória KEAP1. Na presença de endo ou xenobióticos que reagem com tióis ou aumentam a formação espécies reativas de oxigênio (por exemplo, quinonas) a KEAP1 é inativada. Uma vez livre de KEAP1, o NRF2 é translocado para o núcleo onde pode ativar a transcrição de vários genes que possuem ARE em suas regiões promotoras como: *Glutamato-cisteína ligase*, *glutathione redutase*, *glutathione peroxidase*, *tioredoxina redutase* (HAYES; DINKOVA-KOSTOVA; McMAHON, 2009).

Um trabalho realizado com *Carassius auratus* expostos a fenantreno mostrou um aumento na produção de radicais hidroxil e uma redução nos níveis de glutathione reduzida (YIN et al., 2007). Um estudo em células epiteliais e macrófagos humanos expostos a partículas de óleo diesel após a combustão mostrou que o NRF2 foi ativado (principalmente devido às quinonas), conduzindo a expressão de seus genes alvo (LI et al., 2004). Juntos, esses estudos sugerem que os HPAs e quinonas são capazes de gerar estresse oxidativo e promover a ativação de NRF2, culminando no aumento da expressão de seus genes alvo, entre eles a GR.

Em resumo, este estudo mostra uma modificação na fase I e II do sistema de biotransformação e, em menor grau, no sistema de defesa antioxidante. Essas modificações podem ser atribuídas, em parte, aos efeitos dos hidrocarbonetos aromáticos da FAD. O mecanismo proposto para o aumento da atividade EROD e GST envolve a modulação gênica do *CYP1A* e *GST* pelo AHR. O aumento na atividade GR pode estar associado à modulação gênica exercida pelo NRF2 na região promotora deste gene. Contudo, mais estudos são necessários para confirmar a hipótese de estresse oxidativo e modulação do gene *GR* pelo NRF2 em peixes *Poecilia vivipara*.

Baseado nos resultados encontrados nesse estudo, pode-se sugerir o uso de uma metodologia abrangente que envolva a

análise da atividade de enzimas pertencentes ao sistema de defesa antioxidante e das fases I e II de biotransformação no planejamento de programas de monitoramento ambiental. Sugere-se ainda a utilização de mais de um tecido nas análises, pois nesse estudo a brânquia foi mais sensível que o fígado para detectar alterações na atividade GST e EROD. Os resultados dos biomarcadores bioquímicos e o comportamento dos peixes nos aquários durante a exposição permitiram a escolha da concentração de 10% da FAD para os próximos experimentos. Nessa concentração os peixes no aquário estavam comportamentalmente saudáveis, enquanto na concentração de 20% os peixes estavam letárgicos e com dificuldades de natação, além disso os resultados da atividade enzimática na brânquia e no fígado mostram que a concentração mais baixa que mostra efeitos na atividade enzimática é 10% da FAD.

9 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

- Este estudo mostrou que peixes expostos a FAD apresentaram um aumento na atividade das enzimas envolvidas nas fase I e II de biotransformação. No entanto, somente algumas alterações foram observadas nas enzimas envolvidas no sistema de defesa antioxidante.

- Os HPAs mais abundantes nos tecidos de peixes *P. vivipara* continham 2 ou 3 anéis aromáticos, sendo representados pelas formas metiladas e etiladas do naftaleno, seguidas pelo bifenil, fluoreno e fenantreno. As formas metiladas do fenantreno são ligantes do AHR e possivelmente estão relacionadas ao aumento na atividade das enzimas EROD e GST observado na brânquia e fígado desses peixes. Estas enzimas se mostraram bons biomarcadores de exposição a FAD, assim como observado em outros estudos.

- Nesse estudo a brânquia foi mais sensível que o fígado para detectar alterações na atividade GST e EROD.

- Estudos avaliando parâmetros que permitem evidenciar o estresse oxidativo (GSH total, reduzida, dissulfídica, tióis proteicos, tióis não proteicos, Caspase 3, Carbonilação de proteínas, Ensaio do cometa) deverão ser conduzidos para confirmar ou rejeitar a hipótese de um estado pró oxidante em peixes expostos a FAD.

10 CAPÍTULO 2

**RESPOSTAS MOLECULARES NO PEIXE *Poecilia vivipara*
(BARRIGUDINHO) EXPOSTO À FRAÇÃO DE ÓLEO DIESEL
ACOMODADA EM ÁGUA**

RESUMO

O óleo diesel é um potencial contaminante de estuários e mangues, especialmente, porque ele é o principal combustível utilizado em embarcações. Além disso, a exploração de petróleo e transporte causam sérios riscos ao ambiente marinho. O objetivo desse estudo foi identificar as mudanças na expressão gênica hepática de peixes *Poecilia vivipara* expostos a 10% da Fração do óleo diesel acomodada em água (FAD) através da técnica de hidridização subtrativa supressiva (SSH) e PCR quantitativo (qPCR). Os resultados da SSH mostraram 27 genes diferencialmente expressos, sendo 12 induzidos e 15 reprimidos. Os resultados de qPCR confirmaram a indução dos genes *Citocromo P4501A (CYP1A)*, *Citocromo P4502P2 (CYP2P2)*, *Metiltransferase (MET)*, *Glutathione S-transferase (GST)*, *Uridina Difosfato Glicoronosil Transferase (UDPGT1B)* e a repressão do gene *Vitelogenina A (VgA)* em machos. A maioria dos genes induzidos validados por qPCR está envolvida nas duas primeiras etapas de biotransformação, enquanto o gene validado como reprimido, *VgA*, está envolvido com a vitelogênese. Os demais genes não foram validados e desempenham múltiplas funções biológicas como: sistema imune, apoptose, metabolismo de lípidos e carboidratos, transporte de oxigênio, Vitelogênese e fase III de biotransformação. A maioria dos genes induzidos pode ter sido modulada através da ativação do Receptor Aril Hidrocarboneto (AHR) pelos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) identificados nos tecidos dos peixes. A repressão do gene *VgA* pode estar relacionada a um mecanismo de sinalização cruzada entre AHR e Receptor de Estrógeno (ER). Uma análise integrada destes resultados mostra uma resposta molecular no sentido de detoxificar os hidrocarbonetos presentes no óleo diesel, por outro lado, algumas respostas moleculares a longo prazo podem aumentar suscetibilidade dos organismos a patógenos ou mesmo afetar a reprodução. Além disso, os genes

diferencialmente expressos apresentados nesse estudo são candidatos a biomarcadores de ativadores do receptor AHR.

Palavras-chave: biotransformação, expressão gênica, óleo diesel, *Poecilia vivipara*

ABSTRACT

Diesel fuel is a potential contaminant of estuarine and mangrove areas, specially, because it is the main fuel used in vessels. In addition, offshore oil exploration, production and transport pose serious risks to the marine environment. The aim of this work was identify changes in hepatic gene expression of *Poecilia vivipara* fishes exposed to 10% of diesel fuel water accommodated fraction (FAD), employing the subtractive suppressive hybridization (SSH) and quantitative PCR (qPCR) method. The SSH results showed 27 differentially expressed genes, 12 upregulated and 15 downregulated. The qPCR results confirmed the *Cytochrome P4501A (CYP1A)*, *Cytochrome P4502P2 (CYP2P2)*, *Methyltransferase (MET)*, *Glutathione S-transferase (GST)*, *Uridine Diphosphate Glucuronosil Transferase (UDPGT1B)* gene induction and *Vitelogenin A (VgA)* gene repression in male fish. The majority of the upregulated genes validated by qPCR is involved with the two biotransformation phases, while the gene validated as downregulated, VgA, is involved with vitellogenesis. The remaining genes were not validated and play several functions like: immune system, apoptosis, carbohydrate and lipid metabolism, oxygen transport, vitellogenesis and biotransformation phase III. The modulation mechanism proposed for the upregulated genes can involve the activation of aryl hydrocarbon receptor (AHR) by the polycyclic aromatic hydrocarbons (HPAs) identified in fish tissue. The VgA downregulation can be associated to a cross-talk mechanism between AHR and the Estrogen Receptor (ER). An integrated analysis of these results show a molecular response to detoxify the hydrocarbons found in diesel oil, in the other hand, some long term molecular responses can increase the pathogen susceptibility or affect the reproduction. In addition, the differentially expressed genes found in this study are candidates to biomarkers of AHR activators.

Keywords: biotransformation, diesel oil, gene expression, *Poecilia vivipara*

11 INTRODUÇÃO

A poluição marinha é definida como a introdução de substâncias tóxicas ou de energia oriundos da atividade antrópica em um ambiente marinho, incluindo estuários, resultando em um efeito deletério para os organismos e danos para a saúde humana (GESAMP, 1991). As substâncias tóxicas, também denominadas xenobióticos, estão em constante aumento no ambiente, tanto em sua quantidade, quanto em sua variedade (WALKER et al., 1996; LIVINGSTONE, 1993).

Dentre os diferentes tipos de xenobióticos, os derivados de petróleo são um dos mais relevantes para a ecotoxicologia aquática e têm causado bastante preocupação, tanto pela frequência dos eventos de contaminação como pelo elevado potencial poluidor dos seus compostos (PACHECO; SANTOS, 2001a). Embora grandes vazamentos de petróleo sejam preocupantes e ocupem grande espaço na mídia, estima-se que a principal fonte de contaminação por petróleo e seus derivados é resultado de contínuos vazamentos em postos de distribuição de combustíveis, causados pelo envelhecimento dos tanques de combustíveis (TIBURTIUS et al., 2005).

Nesse contexto de crescente preocupação com os efeitos de xenobióticos no ambiente surgiu a ecotoxicologia, uma ciência multidisciplinar que lida com as interações entre contaminantes lançados no ambiente e a biota, analisando os efeitos adversos causados nos diferentes níveis de organização biológica (FENT, 2004). Entre os efeitos adversos no nível bioquímico estão alterações na atividade de enzimas pertencentes ao sistema de biotransformação e ao sistema de defesas antioxidante (RAND 1995).

Essas alterações bioquímicas têm sido muito utilizadas como biomarcadores para indicar a exposição e os efeitos de poluentes ambientais (BURGEOT et al., 1996). Dessa forma, os biomarcadores moleculares e bioquímicos servem como sinais precoces da degradação ambiental causadas pelos contaminantes (RAND, 1995).

A principal vantagem do uso de biomarcadores na avaliação ambiental sobre as análises químicas se deve ao fato de serem obtidas informações a respeito dos efeitos biológicos causados pelas substâncias tóxicas. Na maioria dos casos a análise destes biomarcadores apresenta menor custo, maior facilidade e rapidez do que as análises químicas convencionais (GALLOWAY et al., 2004).

Apesar das vantagens no uso de biomarcadores nos programas de biomonitoramento, na maioria das vezes a especificidade das respostas dos biomarcadores para as diferentes classes de contaminantes não é muito clara (GALLOWAY et al., 2004). Desta forma, são necessários mais estudos na tentativa de descobrir novos biomarcadores, bem como elucidar os mecanismos de toxicidade de diferentes classes de contaminantes.

O uso de técnicas de biologia molecular na ecotoxicologia permitiu ampliar o conhecimento dos mecanismos de ação dos contaminantes nos organismos, pois os padrões de expressão gênica podem fornecer informações sobre a interação entre os estressores ambientais e o genoma (BRULLE et al., 2008).

A pesquisa contemporânea no campo da ecotoxicologia tenta elucidar de que maneira a regulação gênica é modulada pelos estímulos ambientais e estabelecer as diferenças nos níveis de expressão gênica nos diferentes tipos celulares e estágios de desenvolvimento. Considerando que a transcrição é um dos passos iniciais na regulação gênica, a determinação dos níveis de abundância dos transcritos em resposta aos

contaminantes representa uma informação necessária para responder tais questões. As tecnologias que permitem estudar a expressão gênica diferencial são relativamente recentes na genômica funcional e visam a compreensão das mudanças globais no padrão de expressão dos organismos expostos a variados estressores e poluentes ambientais. Assim, no esforço de interpretar tais resultados, foi desenvolvido um novo campo da ciência denominado toxicogenômica (KOSKINEN et al., 2004).

Os estudos de expressão gênica diferencial podem ser divididos basicamente em duas tecnologias: sistemas abertos e fechados. Para a utilização de sistemas fechados é necessário que seja conhecido o genoma ou os genes de estudo da espécie em questão; como exemplo de sistema fechado temos os microarranjos. Por outro lado, as técnicas de sistema aberto, como por exemplo as técnicas *differential display* e hibridização subtrativa supressiva (SSH), apresentam a vantagem de dispensarem a necessidade de conhecimento prévio do genoma da espécie (BULTELLE et al., 2002). A SSH é um dos mais poderosos métodos para isolar transcritos diferencialmente expressos (HE; LI; XU, 2004) e vem sendo utilizada nos mais variados campos da ciência moderna (WINSTANLEY, 2008).

Tendo em vista o risco ambiental associado à atividade da indústria petrolífera e a necessidade de programas de monitoramento ambiental eficazes na avaliação da qualidade dos ecossistemas, esse estudo avaliou a expressão diferencial de genes através da técnica da SSH, a fim de descobrir novos biomarcadores sensíveis aos contaminantes provenientes da atuação da indústria petrolífera em peixes *P. vivipara* expostos à fração do óleo diesel acomodada em água (FAD).

12 OBJETIVOS

1. Clonar e seqüenciar fragmentos de cDNA expressos diferencialmente no fígado de peixes *P. vivipara* expostos à fração do óleo diesel acomodada em água (FAD);

2. A partir das seqüências de cDNA identificadas, desenhar e validar o uso de pares de iniciadores, através da técnica de PCR quantitativo, para avaliar alterações na expressão gênica no fígado de peixes *P. vivipara* expostas FAD;

3. Identificar, através de análises químicas, os componentes da FAD mais abundantes nos tecidos dos peixes após exposição a FAD;

4. Relacionar as mudanças na expressão gênica com os hidrocarbonetos bioacumulados nos tecidos de peixes *P. vivipara* expostos a 10% da FAD;

5. Construir uma biblioteca subtrativa de *P. vivipara* com genes diferencialmente expressos após exposição a FAD;

13 MATERIAIS E MÉTODOS

13.1 Exposição de peixes à FAD 10% para avaliação das respostas moleculares

A exposição foi realizada em duplicata, em aquários com capacidade para 40 litros, com 40 peixes em cada aquário, durante 24 horas sob as mesmas condições de temperatura, salinidade e fotoperíodo apresentadas anteriormente (Capítulo 1). Um grupo controle também foi utilizado, no qual os animais foram expostos somente à água do mar (salinidade 25ppm). A concentração escolhida para esse experimento já foi devidamente justificada no capítulo 1 dessa dissertação.

Após o período de exposição, os fígados de 30 peixes de cada réplica foram coletados e agrupados por sexo em pools de 2 fígados por microtubo (n=15 por réplica) e imediatamente congelados em nitrogênio líquido, para posterior análise de biomarcadores moleculares. Outro grupo de 10 peixes foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado em freezer -80°C até a sua utilização nas análises químicas. Estes procedimentos foram aplicados para o grupo controle e exposto.

13.2 Análise química

O procedimento metodológico descrito a seguir foi baseado em Macleod et al. (1986) com algumas modificações. Aproximadamente 5 g das amostras dos peixes inteiros foram secos e macerados com sulfato de sódio anidro (J.T. Baker), que foi calcinado por 4 h a uma temperatura de 440°C. Esse homogenato foi colocado em cartucho de vidro com placa sinterizada e extraído em soxhlet durante 8 h com n-hexano e diclorometano 50% (v/v). O grau de pureza dos solventes utilizado foi “grau para análise de resíduos orgânicos”, ambos da J. T. Baker (Estados Unidos). Antes da extração foram adicionados 100 µL de uma mistura de naftaleno-d₈, acenafeno-d₁₀, fenantreno-d₁₀, criseno-d₁₂ e perileno-d₁₂ (5 ng µL⁻¹) e n-hexadeceno e n-eicoseno (50 ng µL⁻¹) como padrões internos em cada uma das amostras e no branco.

O extrato evaporado foi submetido a uma coluna cromatográfica contendo 8 gramas de sílica gel sobre 16 g de alumina (ambas da Merck), 5% desativadas com água pré-extraída 5 vezes com n-hexano, e 1 g de sulfato de sódio. A eluição foi feita com 40 mL de n-hexano para análise dos hidrocarbonetos alifáticos e uma mistura de n-hexano e diclorometano (50%) para análise dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs). Para purificação complementar, o eluato da F2 foi concentrado a 0,5 mL e injetado no cromatógrafo líquido de alto desempenho (HPLC) (Perkin Elmer) equipado com duas colunas de exclusão (permeação em gel). A fase móvel utilizada foi o diclorometano. Os padrões internos tetradeceno e benzo(b)fluoranteno-d₁₂ foram adicionados nos eluatos concentrados F1 e F2 com volume de 1 mL, respectivamente.

Uma alíquota da F1 foi injetada no cromatógrafo a gás equipado com detector de ionização de chama (GC-FID), (Agilent Technologies) para hidrocarbonetos alifáticos. Os HPAs foram analisados no cromatógrafo a gás equipado com espectrômetro de massas (GC-MS), 6890/5973N (Agilent Technologies).

As temperaturas do injetor e detector do GC-FID foram de 300°C e 325°C, respectivamente. O gás de arraste foi o hidrogênio ultrapuro e o gás auxiliar foi o nitrogênio. A coluna cromatográfica era de 30 metros de comprimento, diâmetro interno de 0,25 mm e espessura do filme de 5% fenilmetilsiloxana de 0,5 µm (J&W Scientific). As temperaturas do GC-MS foram de 280, 280 e 300°C no injetor e na interface e na fonte de íons, respectivamente. A coluna cromatográfica utilizada foi da J&W Scientific com 30 metros de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme de 5% fenilmetilsiloxana. O modo de aquisição foi o SIM (monitoramento seletivo de íons). A rampa de temperatura para PCBs foi: início a 75°C durante 3 min, aumento a uma taxa de 15 °C até 150 °C e a 2 °C até 260 °C e a 20 °C até 300 °C permanecendo constante durante 1 min. A rampa tanto para os AHs quanto para os HPAs teve início em 40°C com aumento a taxa de 20°C até 60°C e a 5°C min até 290°C onde permaneceu por 5 min e aumento a 10°C até 300°C onde permaneceu constante durante 10 min.

A identificação AHs e HPAs foi feita por comparação dos tempos de retenção com padrões de referência da Accustandard, EUA. Os compostos analisados no GC-MS também foram identificados através do espectro de massas. A quantificação foi feita por razões entre os padrões internos e os compostos de interesse, baseada nas curvas analíticas montadas com pelo menos 05 concentrações diferentes de cada grupo de compostos.

13.3 Extração de RNA total

O RNA total foi extraído de 6 pools de fêmeas controle e 6 pools de fêmeas expostas a 10% da FAD para realizar o experimento de SSH. Para a validação dos genes encontrados como potencialmente diferencialmente expressos pela técnica de SSH, o RNA total foi extraído de 8 pools controle (4 pools de machos e 4 pools de fêmeas) e 8 pools expostos a 10% da FAD (4 pools de machos e 4 pools de fêmeas).

A extração de RNA total foi realizada de acordo com o protocolo para o reagente TRIzol (Invitrogen).

13.4 Extração RNA mensageiro (mRNA)

O RNA mensageiro foi extraído apenas para os pools de fêmeas selecionados para a técnica de SSH, usando o *MicropoliA mRNA kit* (Ambion), de acordo com instruções do fabricante. A concentração e pureza do RNA total e mRNA foram verificadas em espectrofotômetro Nanodrop, a 260, 280 e 320 nm e através do perfil eletroforético das amostras de peixes extraídas e separadas em gel de agarose 2%. O mRNA foi utilizado para técnica de SSH.

13.5 Hibridização Subtrativa Supressiva (SSH)

A partir do mRNA foi realizada a síntese do DNA complementar (cDNA) para posterior realização da hibridização subtrativa supressiva utilizando-se o kit *PCR Select cDNA Subtraction Kit* (Clontech). Este kit permite a hibridização dos fragmentos de cDNA comuns a dois grupos (controle X exposto à 10 % da FAD), enquanto os fragmentos diferencialmente expressos são amplificados por reações de PCR ao final do procedimento. Dessa forma, obtêm-se os genes diferencialmente expressos no grupo exposto. O procedimento foi realizado de acordo com as instruções do fabricante.

13.6 Clonagem

Após a hibridização subtrativa, os fragmentos diferencialmente expressos foram ligados em vetores pGEM-T® Easy (Promega), que possuem no sítio de clonagem uma seqüência para clivagem com a enzima de restrição EcoRI.

Células competentes JM109 foram transformadas com a reação de ligação e, posteriormente, plaqueadas em LB agar contendo ampicilina. As células, contendo o vetor e o inserto, foram transferidas para um meio líquido e cultivadas em agitador a 240 rpm a 37°C por 18 h. Após este período, o DNA foi purificado utilizando o kit *Qiagen Miniprep* (Qiagen).

13.7 PCR para seqüenciamento

A incorporação do corante fluorescente *BigDye Terminator* para o seqüenciamento dos fragmentos foi realizada através de uma reação de PCR utilizando os iniciadores M13F ou M13R que se alinham a uma região localizada próxima ao inserto no vetor *pGEM-T[®] Easy* (Promega). A reação de PCR foi então aplicada no seqüenciador *ABI PRISM DNA Sequencer* (Applied Biosystems) para determinação das seqüências gênicas expressas durante o experimento.

13.8 Comparação de seqüências

As seqüências obtidas dos fragmentos clonados foram comparadas com o banco de dado disponível (*GeneBank*), através do software BLAST (www.ncbi.nih.gov/blast), para identificação dos genes.

13.9 Padronização das reações de PCR quantitativo (qPCR)

A validação dos genes diferencialmente expressos no fígado de *P. vivipara* foi feita através da técnica de PCR em tempo-real ou RT-PCR quantitativo. Para esse método é necessário o desenho de iniciadores específicos para cada um dos genes que se pretende estudar. O desenho dos iniciadores

específicos foi realizado no programa *PrimerQuest* (Integrated DNA Technology). Esse programa possibilita o desenho de iniciadores adequados para o uso em reações de PCR em tempo real.

Os ensaios foram realizados no aparelho Rotor Gene 6000 (Corbett Lifesciences) com o rotor de 36 poços. Os programas de ciclagem de cada gene incluíam ativação da enzima a 95°C por 15 min, em seguida 40 ciclos de 10 s de desnaturação a 95°C, 15 s de anelamento com a temperatura conforme Tabela 4, e 20 s de extensão a 72°C, fase onde ocorreu a aquisição de fluorescência. Posteriormente a curva de dissociação foi realizada através do aumento de 1°C a cada 5 s, partindo de 50°C e terminando a 99°C, para analisar o perfil dos produtos formados (especificidade dos iniciadores).

Uma curva contendo 10 ng, 100 ng, 200 ng, 400ng 1000 ng de cDNA por reação de RT-PCR quantitativo foi realizada para calcular a eficiência da reação, onde uma curva padrão ótima apresenta valor de eficiência de 100% (duplica a quantidade de cDNA a cada ciclo). O programa disponível no aparelho Rotor Gene 6000 transformou os valores brutos de fluorescência em uma escala logarítmica, e assim o ciclo limiar (Ct) foi delimitado baseando-se no coeficiente de correlação (R^2) e na eficiência da curva, calculada pelo próprio aparelho.

13.10 Validação de potenciais biomarcadores moleculares por PCR quantitativo (qPCR)

A extração do RNA total foi realizada nos peixes do grupo controle (n=8 pools, sendo 4 pools de fêmeas e 4 pools de machos) e do grupo exposto a FAD (n=8 pools, sendo 4 pools de

fêmeas e 4 pools de machos), utilizando o método do Trizol. A partir de 2 µg de RNA total foi realizado o tratamento com DNase (SIGMA) e a síntese de cDNA utilizando o kit *Omniscrit RT kit* (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. A pureza e a concentração do RNA e cDNA obtidos foram determinadas utilizando-se o Nanodrop a 260, 280 e 320 nm. Com base na padronização foi realizado o qPCR para cada um dos genes sempre com uma curva padrão em paralelo.

Os programas de ciclagem de cada gene incluíam ativação da enzima a 95°C por 15 min, em seguida 40 ciclos de 10 s de desnaturação a 95°C, 15 s de anelamento com a temperatura conforme Tabela 4, e 20 s de extensão a 72°C, fase onde ocorreu a aquisição de fluorescência. Posteriormente a curva de dissociação foi realizada através do aumento de 1°C a cada 5 s, partindo de 50°C e terminando a 99°C, para analisar o perfil dos produtos formados.

O programa disponível no aparelho Rotor Gene 6000 transformou os valores brutos de fluorescência em uma escala logarítmica, e assim o Ct foi delimitado baseando-se no coeficiente de correlação (R^2) e na eficiência da curva, calculada pelo próprio aparelho.

13.11 Quantificação Relativa por RT-PCR quantitativo (qPCR)

Para a quantificação relativa da expressão de cada gene estudado foi utilizado o método de comparação de Ct ou Delta Delta Ct ($\Delta\Delta Ct$). O Ct (*cycle threshold* - ciclo limiar) é definido como o número de ciclos requerido para a fluorescência da reação atingir níveis superiores aos da fluorescência basal da reação (*background*) e apresentar uma amplificação exponencial.

Esse método tem como premissa a semelhança entre a eficiência de amplificação do gene de interesse e do gene normalizador, ambos devem ficar entre 80% e 120% (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008). Para utilizar o método, os valores de expressão para cada gene de interesse são normalizados por um gene normalizador (β -Actina). Após esse processo é feita a relativização do grupo exposto em relação ao grupo controle.

Tabela 4. Sequência dos iniciadores *senso* (F) e anti-senso (R) dos genes de *Poecilia vivipara* selecionados pela hibridação subtrativa supressiva (SSH): Citocromo P450 1A (CYP1A), Uridina difosfato glicoronosil transferase 1B (UDPGT), Citocromo P450 2P2 (CYP2P2), Glutationa S-transferase (GST), Metiltransferase (MET), proteína do sistema complemento C3 (C3), Transferrina (TF), Vitelogenina A (VGA) e β -Actina e suas respectivas temperaturas de anelamento utilizadas nos experimentos de PCR quantitativo (qPCR).

Gene	Iniciador	Seqüência	Ta (oC)
CYP1A	F	acacaaacgctgctacctgggagt	58
	R	cacagtcaacacagccaccctcaga	
UDPGT1B	F	tcaacaggctgcttcaggcacca	58
	R	aagggtgctggtatgcccgtagtg	
CYP2P2	F	agtcccaaaccctaccgcctctgtg	58
	R	tgcttgattgtgcatctgctctaccagc	
GST	F	aacatcacctgaacgagtcctacggc	58
	R	gggtgcagctgtttccttggccct	
MET	F	atccacatcgctgcaacaacgct	58
	R	ccagccacctgacagcacatgaaca	
C3	F	ccaatcagtgagggctgttggttgaaca	58
	R	aggtgctactccatgactagcccacaca	
VGA	F	caatggaagctgtgggtggcggtaa	58
	R	ccgcacaggactgcactgtgaactg	
TF	F	tctggtagagggtgctggtgacgtt	58
	R	gcagaattcacaccagagcccagt	
β-Actina	F	aaagccaacagggagaagatgaccca	55
	R	tgacaccgtctccagagtccatcacaat	

13.12 Análises estatísticas

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente por meio do teste t de student (5%). Todas as análises estatísticas foram realizadas com os *software Statistica 6.1.* e para a apresentação dos gráficos foi utilizado o *software GraphPad Prism 5.0.* Todos os dados estão apresentados na forma de média e desvio padrão.

14 RESULTADOS

14.1 Análise química

A concentração de hidrocarbonetos alifáticos (HAs) totais nas amostras de *P. vivipara* após exposição a 10% da FAD durante 24 h foi de $19,2 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ para o grupo controle e $34,0 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ para o grupo exposto (Tabela 5). As concentrações totais de n-alcenos em tecido de peixe que foram expostos durante 24 horas a 10% da FAD foram de $3,04 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ e nos controles foram de $3,11 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (Tabela 5). As Figuras 3 e 4 mostram que os perfis da distribuição de n-alcenos são similares para amostra controle e exposta ao óleo durante 24 horas. Não houve a presença de MCNR e a concentrações de pristano diminuiu, enquanto a concentração de fitano aumentou (Tabela 5).

A concentração de hidrocarbonetos aromáticos totais nas amostras de *P. vivipara* após exposição a 10% FAD durante 24 horas foi de $12.467 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ para o grupo controle e $42.658 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ para o grupo exposto (Tabela 5). Todos os HPAs, exceto o bifenil e trimetilnaftalenos, apresentaram uma maior concentração no grupo exposto a 10% da FAD (Tabela 5). Os hidrocarbonetos de 2 e 3 anéis aromáticos (naftaleno, fenantreno, antraceno, fluoreno) e seus derivados metilados foram mais abundantes no grupo exposto. Entre os HPAs mais representativos nesse estudo estão: o naftaleno, o fenantreno e os derivados metilados desses HPAs. Esses HPAs juntos perfazem cerca de 94% de todos os hidrocarbonetos aromáticos acumulados no tecido dos peixes expostos a 10% da FAD (Tabela 5).

Tabela 5. Hidrocarbonetos alifáticos (HAs) e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em amostras de peixe *Poecilia vivipara* controle e exposta a 10% da fração do óleo diesel acomodada em água. Os valores estão apresentados em $\mu\text{g.g}^{-1}$ de peso seco para HAs e em ng.g^{-1} de peso seco para os HPAs. Apenas estão apresentados os hidrocarbonetos detectados pela metodologia. Legenda: C (controle), E (Exposto).

HAs	C	E	HPAs	C	E
C15	0,653	0,459	Naftaleno	1396	6920
C16	0,239	0,23	Σ metil naftalenos	4537	21858
C17	0,594	0,49	Bifenil	587	303
C18	0,127	0,174	Σ etil naftalenos	585	775
C19	0,128	0,152	Σ dimetil naftalenos	3339	9953
C20	0,178	0,181	Acenafteno	89,4	209,6
C21	0,093	0,084	Σ trimetil naftalenos	1517	573
C25	0,088	0,075	Fluoreno	145	588
C27	0,244	0,256	Dibenzotiofeno	21,5	131
C29	0,434	0,4	Fenantreno	154	895
C31	0,214	0,374	Antraceno	12	40,6
C33	0,113	0,163	Σ metildibenzo tiofenos	10,4	50,1
pristano	1,114	0,812	Σ dimetil fenantrenos	73,2	351
fitano	0,169	0,201	Σ metil fenantrenos	n.d.	n.d.
Alifáticos Totais	19,2	34	Fluoranteno	n.d.	2,7
Alifáticos Resolvidos	19,2	34	Pireno	n.d.	6,8
Alcanos Totais	3,11	3,04	Σ HPAs	12467	42658
pristano/fitano	6,6	4			

14.2 Biomarcadores moleculares em *P. vivipara*

A eficiência da reação no ciclo limiar (Ct) foi de 100% para o *Citocromo P450 1A (CYP1A)*, *Uridina difosfato glicoronosil transferase 1B (UDPGT1B)*, *Glutathione S-transferase (GST)*, *Vitelogenina A VGA*, *Transferrina (TF)*, β -*Actina*. A eficiência foi de 99% para *Metiltransferase (MET)* e 98% para a *proteína do sistema complemento C3 (C3)* e *Citocromo P450 2P2 (CYP2P2)* (Tabela 7). A eficiência das reações ficou entre 80 e 120%, permitindo o uso do método de comparação de Ct ou Delta Delta Ct ($\Delta\Delta$ Ct) (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008).

Tabela 6. Sequência dos iniciadores *senso* (F) e *anti-senso* (R) dos genes de *Poecilia vivipara* selecionados para validação da técnica de hibridização subtrativa supressiva e a eficiência do par de iniciadores no ciclo limiar (Ct).

Gene	Iniciador	Sequencia	Eficiência
CYP1A	F	acacaaacgctgctacctgggagt	100%
	R	cacagtcaacacagggccacctcaga	
UDPGT1B	F	tcaacaggctgcttccaggcacca	100%
	R	aaggtgctggttatgcccgtagg	
CYP2P2	F	agtcccaaacctaccgcctctgtg	98%
	R	tgtcttgattgtgcatctgctctaccagc	
GST	F	aacatcaccctgaacgagtcctacggc	100%
	R	ggtgtcagctgttccctggccct	
MET	F	atccacatgcctgcaacaacgct	99%
	R	ccagccacctgacagcacatgaaca	
C3	F	ccaatcagtgaggctgttggttgaaca	98%
	R	agggtcacttccatgactagcccacaca	
VGA	F	caatggaagctgttggtggcggtaa	100%
	R	ccgcacaggactgcactgatgaactg	
TF	F	tctggtagagggctggtgacggt	100%
	R	gcagaattcacaccacgagccagt	
β-Actina	F	aaagccaacagggagaagatgaccca	100%
	R	tgacaccgtctccagagtccatcacaat	

Foram isolados e seqüenciados 106 fragmentos de cDNA. Dentre essas sequências, 90 foram identificadas, resultando em 27 genes diferencialmente expressos (Tabelas 7 e 8). Os 12 genes induzidos em fígado de peixes expostos a 10% de FAD de óleo diesel foram identificados como genes envolvidos em diferentes funções metabólicas como: Fase I de biotransformação (*Citocromo P4501A*, *Citocromo P4502P2*); Fase II (*Glutathiona-S-transferase*, *Uridina Difosfato Ácido Glicurônico Transferase 1B*, *O-Metiltransferase*); transportadores de membrana de Fase III (*Proteína ligadora de ATP C4*), sistema imune (*Apoliproteína A1* e *α -microglobulina/bicunina*) e genes envolvidos em funções diversas (Tabela 7).

Os 15 genes identificados por terem a sua expressão reduzida nesse experimento estão associados com o sistema imune (*Componente do complemento C3* e *inibidor C1*), reprodução (*Vitelogenina A, B e C*) e outras funções metabólicas (Tabela 8).

Não houve diferença na expressão do gene β -*Actina* após a exposição a FAD, por isso todos os genes induzidos e reprimidos foram normalizados por β -*Actina* (Figura 10). A expressão dos genes induzidos *CYP1A*; *CYP2P2*; *GST*; *UDPGT*; *MET* aumentou, respectivamente 72,1; 2,1; 17,0; 40,8; 1,8 vezes em relação ao grupo controle (Figura 10). A expressão do gene reprimido *VgA* em machos diminuiu 7,14 vezes em relação ao grupo controle. Os demais genes não apresentaram diferenças na expressão gênica, sendo falsos positivos da técnica da SSH (Figura 10).

Tabela 7. Lista gerada pela SSH de genes induzidos pela exposição à 10% da fração do óleo diesel acomodada em água durante 24 h, em fígado do peixe *P. vivipara*. Na tabela estão dispostas informações sobre a função biológica do gene e probabilidade de identificação imprecisa do gene (e-value).

Função biológica	Homólogo (proteína ou DNA)	Espécie comparada	e-value
Fase I de Biotransformação	<i>Citocromo P450 1A (CYP1A)</i>	<i>Fundulus heteroclitus</i>	1,00E-76
	<i>Citocromo P450 2P2 (CYP2P2)</i>	<i>Fundulus heteroclitus</i>	3,00E-04
Fase II de Biotransformação	<i>Glutathione S-transferase R1 (GST)</i>	<i>Pagrus major</i>	1,00E-47
	<i>UDP glicoronosil transferase 1 familia B (UDPGT1B)</i>	<i>Platichthys flesus</i>	8,00E-45
	<i>O-methyltransferase (MET)</i>	<i>Danio rerio</i>	6,00E-118
Fase III de biotransformação	<i>Proteína ligadora de ATP CC4 (ABCC4)</i>	<i>Danio rerio</i>	5,00E-39
Cadeia transportadora de elétrons	<i>Citocromo c oxidase subunidade 1 (COXI)</i>	<i>Cubiceps paradoxus</i>	9,00E-154
Sinalização celular	<i>Presenilina – enhancer 2 (PEN2)</i>	<i>Oreochromis mossambicus</i>	9,00E-36
Apoptose	<i>Proteína integral de membrana 2B (ITM2B)</i>	<i>Epinephelus coioides</i>	1,00E-17
Chaperona	<i>Complexo associado ao polipeptídeo nascente alfa (α-NAC)</i>	<i>Oreochromis mossambicus</i>	3,00E-20
Efluxo de Colesterol e sistema imune	<i>Precursor da Alfa microglobulina/bicunina (AMBIP)</i>	<i>Danio rerio</i>	7,00E-29
	<i>Precursor da Apolipoproteína AI (APOAI)</i>	<i>Platichthys flesus</i>	4,00E-32

Tabela 8. Lista gerada pela SSH de genes reprimidos pela exposição à 10% da fração do óleo diesel acomodada em água durante 24 h, em fígado do peixe *P. vivipara*. Na tabela estão dispostas informações sobre a função biológica do gene e probabilidade de identificação imprecisa do gene (e-value).

Função biológica	Homólogo (proteína ou DNA)	Espécie comparada	e-value
Vitelogênese	<i>Vitelogenina A (VgA)</i>	<i>Poecilia reticulata</i>	9,00E-115
	<i>Vitelogenina B (VgB)</i>	<i>Poecilia reticulata</i>	7,00E-25
	<i>Vitelogenina C (VgC)</i>	<i>Gambusia affinis</i>	4,00E-43
Sistema imune	<i>Proteína do sistema complemento C3 (C3)</i>	<i>Paralichthys olivaceus</i>	4,00E-65
	<i>Inibidor C1 (C1)</i>	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	1,00E-59
Chaperona	<i>Proteína de choque térmico 90 (HSP90)</i>	<i>Solea senegalensis</i>	4,00E-61
Transporte transmembrana	<i>Transportador de ânions orgânicos membro 1c1 (OATP2)</i>	<i>Mus musculus</i>	5,00E-23
Metabolismo do ferro e sistema imune	<i>Transferrina (TF)</i>	<i>Acanthopagrus schlegelii</i>	4,00E-32
Metabolismo do Glicogênio	<i>UDP glicose pirofosforilase(UDPGP)</i>	<i>Salmo salar</i>	2,00E-27
Transporte de Oxigênio	<i>Hemoglobina</i>	<i>Salmo salar</i>	8,00E-48
	<i>Alfa hemoglobina A</i>	<i>Seriola quinqueradiata</i>	5,00E-48
Metabolismo de ácidos graxos	<i>Proteína ligante de AcilCoA (ACBP)</i>	<i>Oryzias latipes</i>	1,00E-39
Sinalização celular	<i>Integrina beta 1</i>	<i>Danio rerio</i>	7,00E-34

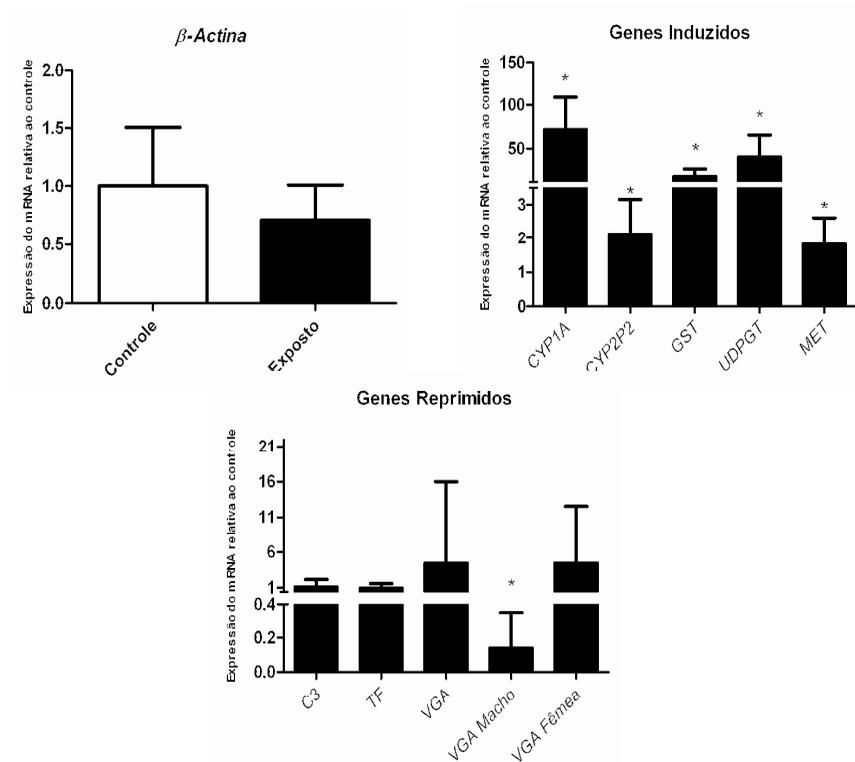


Figura 10. Expressão do gene normalizador *β-Actina* e validação, por RT-PCR quantitativo, dos genes identificados pela SSH como induzidos e reprimidos no grupo de peixes *P. vivipara* expostos a 10% da fração do óleo diesel acomodada em água após 24 h. O asterisco (*) representa diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle. O eixo Y representa quantas vezes a expressão do gene aumentou ou diminuiu em relação ao seu respectivo grupo controle. Os dados estão representados na forma de média e desvio padrão.

15 DISCUSSÃO

15.1 Análise Química

Os peixes *P. vivipara* expostos a 10% da FAD apresentaram maiores concentrações de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos que o grupo controle, mostrando uma bioacumulação desses compostos nos organismos expostos. O parâmetro MCNR que corresponde aos hidrocarbonetos ramificados e cíclicos não apresentou variação expressiva. A concentração de pristano diminuiu e a de fitano aumentou no grupo exposto, esse resultado pode estar relacionado, em parte, pela maior suscetibilidade de biodegradação do pristano em relação ao fitano (ROSA, 2001). Outra hipótese para esse resultado é que o tempo de exposição não foi suficiente para a bioacumulação desses isoprenóides (pristano e fitano) e a variação na concentração dessas substâncias corresponde a uma variação natural proveniente de uma contaminação no local de coleta.

Dentre os HPAs mais representativos nesse estudo estão: o naftaleno, o fenantreno e os derivados metilados desses HPAs. Esses HPAs juntos perfazem cerca de 94 % de todos os hidrocarbonetos aromáticos acumulados no tecido dos peixes e, provavelmente, são os responsáveis pelas mudanças na expressão gênica observadas neste estudo (BAGCHI et al., 2002; BARRON; HEINTZ; RICE, 2004; VONDRACEK et al., 2007; TINTOS et al., 2007; MONTEIRO; REIS-HENRIQUES; COIMBRA, 2000; FORMAN; ZHANG; RINNA, 2009; YIN et al., 2007).

15.2 Biomarcadores Moleculares em peixes *Poecilia vivipara*

15.2.1 Sistema de Biotransformação Fase I e Vitelogênese

Nesse trabalho foi observada uma ativação da expressão de genes correspondentes as 3 fases do processo de biotransformação (*CYP1A*, *CYP2P2*, *GST*, *UDPGT1B*, *MET* e *ABCC4*) (Tabela 7). A ativação da transcrição desse conjunto de genes envolvidos no processo de biotransformação sugere um sinergismo entre as diferentes etapas da biotransformação para a detoxificação dos hidrocarbonetos.

Embora o processo de biotransformação geralmente resulte na detoxificação do contaminante, a ação das enzimas do complexo CYP450 também pode gerar metabólitos tóxicos que contribuem para o aumento do risco de câncer, deformações embrionárias e outros efeitos deletérios (NEBERT; KARP, 2008). O HPA Naftaleno, após o processo de biotransformação de fase I pelo *CYP1A*, gera intermediários reativos (naftoquinonas), podendo causar estresse oxidativo, danos a DNA e lipoperoxidação no cérebro e no fígado de mamíferos (BAGCHI et al., 2002).

A expressão de *CYP1A* em mamíferos e peixes é bastante induzida por HPAs, via ativação do receptor AHR (HAHN, 2002). Esta característica permitiu o amplo uso da expressão de genes *CYP1A* como marcadores de exposição ambiental aos agonistas do receptor AHR em humanos e em outras espécies animais (FUJITA et al., 2001; LAMBERT et al. 2006).

Em camundongos, além de modular o *CYP1A* e o *CYP1A2*, o receptor AHR também modula os genes *CYP1B1*, *GST alfa 1* (*GSTA1*), *UDP-glicoronosil transferase1A6* (*UDPGT1A6*) (HAYES; DINKOVA-KOSTOVA; MCMAHON, 2009). Algumas evidências mostram que o conjunto de genes modulados por AHR em peixes é semelhante àquele documentado para camundongos (ARUKWE; NORDBO, 2008). Dessa forma, pode-se sugerir que o AHR está sendo ativado pelos HPAs encontrados na FAD, conduzindo a expressão de seus genes alvo. Os possíveis ativadores do receptor AHR neste estudo são: os derivados metilados do fenantreno, fluoranteno e pireno (VONDRACEK et al., 2007; BARRON; HEINTZ; RICE, 2004) (Tabela 5).

Nesse estudo, um outro gene pertencente aos *CYP450* foi identificado como *CYP2P2* (Tabela 7). A família *CYP2* inclui cerca de 25 subfamílias que metabolizam uma ampla gama de substratos endógenos e exógenos, contudo as funções fisiológicas dessa família de CYPs ainda é obscura para a maioria das espécies de mamíferos. O gene identificado nesse estudo como *CYP2P2* é muito similar ao *CYP2P3*, que mostrou capacidade de catalisar a oxidação do ácido araquidônico (OLEKSIK et al., 2003).

Um resultado interessante da SSH foi a indução na expressão do gene *CYP1A* com a concomitante inibição de diferentes genes de *Vitelogeninas* (*VgA*, *VgB*, *VgC*). Muitos estudos realizados em animais coletados no campo e expostos em laboratório revelam que contaminantes orgânicos são capazes de reduzir a concentração plasmática de estradiol e assim reduzir a expressão do gene *vitelogenina* via receptor de estrógeno (ER) (NICOLAS, 1999). Entre os HPAs encontrados nesse estudo que podem causar essa redução nos níveis de estradiol estão o naftaleno e o fenantreno (TINTOS et al., 2007; MONTEIRO; REIS-HENRIQUES; COIMBRA, 2000).

O mecanismo pelo qual os HPAs promovem a redução de estradiol no plasma pode envolver um aumento no catabolismo do estradiol devido a um aumento na atividade de enzimas de fase I (CYP1A2) e II de biotransformação em organismos expostos a HPAs (NICOLAS, 1999). Por outro lado, Kawahara e colaboradores (2009) mostraram que a inibição da vitelogenina não depende do aumento da fase I de biotransformação (atividade EROD), mas depende da ligação de agonistas no receptor AHR.

A participação do receptor AHR na inibição do gene da *Vitelogenina* foi confirmada em estudos *in vitro* usando cultura primária de hepatócitos de Truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*). Esse estudo revelou uma proporcionalidade entre a inibição da síntese de vitelogenina e a ativação do gene *CYP1A*, dependendo da potência dos agonistas do AHR utilizados (NAVAS; SEGNER, 2000). Apesar disso, o mecanismo de inibição da vitelogenina por AHR permanece desconhecido em peixes.

Em mamíferos, os mecanismos propostos para antiestrogenicidade dos HPAs envolvem: 1) a ligação do heterodímero (AHR/ARNT) em elementos de resposta a xenobióticos inibitórios (XREi) presentes nos genes regulados pelo receptor de estrógeno (ER); 2) aumento da degradação proteossomal do receptor ER mediada pelo AHR; 3) alteração no catabolismo do estrógeno pelos CYPs450 (MATTHEWS; GUSTAFSSON, 2006).

É importante ressaltar que os resultados do PCR quantitativo (Figura 10) mostram uma inibição da vitelogenina A (*VgA*) apenas para os machos. O motivo para essa diferença pode envolver os baixos níveis plasmáticos de estradiol em machos e fêmeas em estágio inicial da vitelogênese. Anderson e colaboradores (1996) mostraram que a administração de β -Naftoflavona (BNF), um agonista do AHR, em peixes com baixa

concentração de estradiol causava a inibição da síntese de vitelogenina, enquanto altas concentrações de estradiol e BNF causavam um aumento na síntese de vitelogenina. Esses resultados sugerem que os níveis de estradiol determinam o quanto agonistas de AHR podem suprimir, não ter efeito ou potencializar a síntese de vitelogenina no fígado. Ou seja, os estágios mais precoces da vitelogênese (baixos níveis de estradiol) são mais sensíveis a inibição da síntese de vitelogenina por HPAs.

Dessa forma, o motivo para diferença na expressão da vitelogenina entre machos e fêmeas neste experimento pode envolver dois fatores: 1) o pequeno “n” amostral e 2) os diferentes estádios da vitelogênese (níveis de estradiol variáveis) das fêmeas utilizadas no experimento. Esses fatores associados podem ter contribuído para o alto desvio padrão e ausência de significância estatística em fêmeas. Por outro lado, a ausência de estádios de vitelogênese e baixos níveis de estradiol em machos contribuíram para uma maior homogeneidade da amostra, permitindo uma maior nível de significância estatística.

15.2.2 Sistema de Biotransformação Fase II e III

Após a fase I de biotransformação, os xenobióticos se tornam substratos mais adequados para reações de conjugação que compõem a fase II de biotransformação (INSAUSTI et al., 2009; ZAMEK-GLISZCZYNSKI et al., 2006). O aumento na expressão gênica da *GST* e *UDPGT1B* neste estudo pode indicar uma maior capacidade de biotransformação por conjugação com glutathione e ácido glicurônico, respectivamente. Um resultado que corrobora essa hipótese foi o aumento na atividade GST em

fígado e brânquia de peixes expostos a 20% da FAD (Capítulo 1).

A formação de glicuronídeos é a principal via de biotransformação de compostos endógenos e xenobióticos orgânicos potencialmente tóxicos em mamíferos. Entre os substratos das UDPGTs estão: esteróides, sais biliares, bilirubina, fenóis e uma ampla gama de contaminantes ambientais. Estudos em linguado (*Platichthys flesus*) mostraram uma indução do gene *UDPGT1B* e *CYP1A* após tratamento com os agonistas do AHR, Aroclor e benzo(a)pireno, sugerindo que ambos genes são regulados por AHR nessa espécie (LEAVER et al., 2007). Nesse mesmo estudo foi demonstrado que os substratos da UDPGT1B são o 1-naftol, estradiol e testosterona (LEAVER et al., 2007). Dessa forma, um aumento na atividade UDPGT1B, devido a uma indução do gene *UDPGT1B* (Figura 10), poderia potencialmente aumentar a biotransformação de metabólitos do naftaleno (1-naftol) e promover um aumento na excreção de hormônios esteróides.

As glutathione S-transferases (GSTs) são uma família de enzimas envolvidas na detoxificação de uma grande variedade de substratos xenobióticos. Essas enzimas catalisam a adição do tripeptídeo Glutathione (GSH) em substratos que possuem centros eletrofílicos, aumentando a hidrosolubilidade e facilitando a excreção (KONISHI et al., 2005). Os genes de GSTs possuem tanto elementos de resposta antioxidante (ARE) quanto elementos de resposta a xenobióticos (XRE) e, sendo assim, esses genes podem ser modulados pelo receptor AHR e/ou o fator de transcrição NRF2 (KONISHI et al., 2005). O aumento na expressão dos genes *GST* e *UDPGT1B* encontrados nesse estudo (Figura 10), assim como para o *CYP1A*, pode estar associado aos HPAs detectados nos tecidos dos animais expostos, uma vez que são agonistas do AHR.

O gene que codifica para enzima Metiltransferase (MET), outra enzima de fase II, foi identificado como gene induzido neste estudo (Tabela 7). Estudos por similaridade com a sequência de *Danio rerio* sugerem que o gene *MET* codifica para uma proteína com atividade Catecol-O-Metiltransferase (COMT). A COMT catalisa a transferência de um grupo metil da S-Adensilmetionina para uma grupo hidroxil catecólico presente no composto aceptor (YASUDA et al., 2009). A COMT inativa hormônios, neurotransmissores e xenobióticos que possuem um grupo catecol (TENHUNEN, 1994). Estudos em humanos mostram que o gene COMT é reprimido por β -estradiol via receptor de estrógeno (ER) (JIANG et al., 2003). Nos peixes expostos a FAD, pode-se sugerir que o aumento na biotransformação de fase I e II (Capítulo I) acelerou a biotransformação de β -estradiol, permitindo a supressão da repressão do gene COMT e, conseqüentemente, o aumento da expressão deste gene. A redução nos níveis de β -estradiol também pode ser provocada pelo naftaleno através de uma desregulação em múltiplos locais no eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal ou pelo fenantreno através da inibição de enzimas esteroidogênicas (THOMAS; BUDIANTARA, 1995; TINTOS et al., 2007; MONTEIRO; REIS-HENRIQUES; COIMBRA, 2000).

As reações de conjugação aumentam a hidrosolubilidade, a carga negativa da molécula e seu peso molecular. Essas mudanças nas propriedades físico-químicas dos xenobióticos reduzem sua permeabilidade à membrana plasmática. Dessa forma, é necessária a existência de proteínas carreadoras de membrana que transportem essas substâncias para o sangue sinusoidal, para eventual excreção via urina, ou para os canalículos (excreção via bile) (ZAMEK-GLISZCZYNSKI et al., 2006). O processo de transporte de xenobióticos pelas proteínas

de membrana foi caracterizado como fase III de biotransformação (KEPPLER; RINGWOOD, 2001).

A proteína de resistência a multidrogas ABCC4 medeia o efluxo de ânions orgânicos para fora dos hepatócitos. Estudos em humanos mostraram que essa proteína está localizada na membrana sinusoidal dos hepatócitos e medeia o co-transporte de glutatona (GSH) com ácidos biliares ou outros substratos. Entre os substratos estão: Monofosfato de Adenosina e Monofosfato de Guanosina cíclicos (AMPc e GMPc), ácidos biliares, eicosanoides, urato, Dehidroepiandrosterona-sulfato, Estradiol-17-D-glicuronídeo, α -naftil- β -D-glicuronídeo, Glutaciona-S-conjugados (AUBEL et al., 2002; BAI et al., 2004; CHEN; KLAASSEN, 2004; RUSSEL; KOENDERINK; MASEREEUW, 2008). Tendo em vista os substratos da ABCC4, sugere-se que a possível indução desse gene nesse estudo (Tabela 7) pode aumentar o efluxo de metabólitos sulfatados, glicuronídeos e glutaciona-S-conjugados de hormônios e do naftaleno (α -naftil- β -D-glicuronídeo), garantindo a manutenção da homeostase celular. Outra possível consequência é a depleção de glutaciona (GSH) hepática devido ao seu co-transporte com ânions orgânicos. Contudo, deve-se ressaltar o fato que o conhecimento sobre os substratos e a modulação gênica dessa proteína é recente e somente estabelecida em mamíferos.

Em mamíferos, a modulação do gene *ABCC4* envolve a ativação e ligação do NRF2 no elemento de resposta antioxidante (ARE) localizado na região promotora do gene *ABCC4* (CHEN; KLAASSEN, 2004; RUSSEL; KOENDERINK; MASEREEUW, 2008). O fator de transcrição NRF2, ao contrário do AHR, não é ativado por ligantes. Sob condições normais, o NRF2 está associado a uma proteína inibitória chamada KEAP1. Na presença de endo ou xenobióticos que reagem com tióis ou aumentam a formação espécies reativas de oxigênio (por exemplo, quinonas) a KEAP1 é inativada. Uma vez livre de

KEAP1, o NRF2 é translocado para o núcleo onde pode ativar a transcrição de vários genes que possuem ARE em suas regiões promotoras.

A biotransformação do naftaleno e fenantreno gera espécies reativas de oxigênio (FORMAN; ZHANG; RINNA, 2009; YIN et al., 2007). Dessa forma, sugere-se que a indução do gene *ABCC4* seja resultado de um estresse oxidativo hepático que ativou a via do NRF2. Outro resultado que corrobora com essa hipótese é o aumento da atividade Glutathiona redutase (gene regulado por NRF2) em peixes expostos durante 96H a FAD (Capítulo 1). No entanto, vale ressaltar que: 1) Exceto as enzimas antioxidantes, nenhum parâmetro indicador de estresse oxidativo foi medido nesse estudo; 2) o aumento da atividade GR pode ter explicações alternativas que envolvem modificações pós-traducionais na proteína; 3) A expressão gênica da *ABCC4* não foi validada por PCR quantitativo, podendo ser um falso positivo da técnica de SSH.

Uma outra proteína transportadora de membrana encontrada nesse estudo como gene inibido pela técnica de SSH foi a *OATP2* (Tabela 8). Estudos em ratos mostraram que os níveis da proteína e da expressão gênica da *OATP2* diminuíram após o tratamento com agonistas do receptor AHR (GUO; CHOUDHURI; KLAASSEN, 2002). Mais uma vez, pode-se atribuir a mudança na expressão gênica aos HPAs agonistas do AHR contidos na FAD. No entanto, vale ressaltar que a expressão gênica da *OATP2* não foi validada por PCR quantitativo, podendo também ser um falso positivo da técnica de SSH.

15.2.3 *Genes Envolvidos no sistema Imune Inato e Metabolismo de Carboidratos e Lipídeos*

Os resultados da SSH (Tabela 7 e 8) apresentaram diversos genes envolvidos no sistema imune inato tais como: *Componente C3* e o *Inibidor C1*, pertencentes ao sistema complemento, e os genes *Transferrina*, *α -microglobulina/bicunina (AMBP)*, *Apolipoproteína AI (ApoAI)*, que além de participarem na regulação do sistema imune inato, também possuem outras funções no metabolismo de carboidratos e lipídeos.

Os resultados do PCR quantitativo mostram que o *Componente C3* e a *Transferina* são falsos positivos da técnica de SSH. Os demais genes não foram validados por PCR quantitativo e serão discutidos apenas em função de sua possível alteração pela técnica de SSH.

O Inibidor C1 é um inibidor de serina proteases que regula a ativação do sistema complemento. A regulação do sistema complemento ocorre através da inativação da via clássica das proteases (C1r e C1s) e inibição da via alternativa através da interação reversível com a proteína C3b (DAVIS, 2004). A inibição do gene *Inibidor C1* neste estudo poderia permitir a autoativação do sistema complemento com possíveis efeitos negativos no sistema imune inato.

Outros genes envolvidos no sistema imune e metabolismo de carboidratos e lipídeos que aumentaram a expressão no grupo exposto a FAD foram a *Apolipoproteína AI (ApoAI)* e a *alfa-1-Microglobulina/bicunina (AMBP)*. A Apolipoproteína AI (ApoAI) promove o efluxo de colesterol, associa-se a lipídeos, ativa a lecitina/colesterol aciltransferase e forma o HDL (FRANK; MARCEL, 2000). A ApoAI também pode agir como um inibidor do complexo de ataque a membrana C5b-9 ao interagir com o

componente C3 do sistema complemento (MAGNADÓTTIR; LANGE, 2004). O gene *AMBIP* é responsável por codificar duas glicoproteínas do plasma: a alfa-1-Microglobulina (A1M) e bicunina. A A1M funciona como um carreador de pequenas moléculas hidrofóbicas e pode ter um papel chave na regulação da resposta imune. A bicunina é uma serina protease que parece participar do controle de células endoteliais e estabilização da matrix extracelular (TYAGI, 2002). Estudos *in vitro* mostram que bicunina previne invasão de células tumorais e metástase (KOBAYASHI et al., 1994).

Outros genes reprimidos envolvidos no metabolismo de carboidratos e lipídeos neste estudo foram: a *UDP-glicose pirofosforilase (UDPGP)* e a *Proteína ligante de Acil-CoA (ACBP)*. A UDP-glicose pirofosforilase é uma das enzimas envolvidas na glicogênese e síntese de uridina difosfato ácido glicurônico (UDPGA) (VANHULLE et al., 2001). A possível queda na expressão desse gene pode comprometer a produção do substrato UDPGA e, conseqüentemente, no processo de glicuronidação por UDPGT. A proteína ligante de acil-CoA (ACBP) liga-se seletivamente a ésteres de Acil-CoA de cadeia média e longa (C14-C22). Entretanto, o exato papel da ACBP no metabolismo de lipídeos é ainda desconhecido (SANDBERG et al., 2005). Estudos em leveduras mostram que ACBP é importante no correto endereçamento de proteínas e no tráfego vesicular (BURTON et al., 2005). Estudos sugerem que a expressão de ACBP de mamíferos é regulada pela dieta. O jejum reduz a expressão, enquanto uma dieta rica em lipídeos aumenta a expressão de ACBP (BHUIYAN et al., 1995). A explicação para redução na expressão de ACBP poderia envolver um aumento na demanda energética durante o processo de biotransformação no grupo exposto. A maior demanda energética acentuaria os efeitos do jejum, promovendo uma redução nos estoques de glicogênio e na expressão de ACBP.

15.2.4 Apoptose

A presenilina 2 (PEN-2), cujo gene foi encontrado como induzido pela SSH (Tabela 7), é um membro do complexo da γ -secretase que possui uma função essencial na proteção contra a apoptose dependente de caspases em *Danio rerio*. (ZETEMBERG et al., 2006). Estudos com embriões de *Danio rerio* mostram que o “knockdown” do gene *PEN-2* nos tecidos dos peixes causava apoptose em todo o embrião (CAMPBELL et al., 2006). O complexo da γ -secretase também é responsável pela clivagem da proteína integral de membrana tipo I (APP), gerando os peptídeos β -amilóides. A agregação desses peptídeos em humanos tem sido relacionada a doença neurodegenerativa de Alzheimer e azoospermia (RENGARAJ et al., 2008).

A proteína integral de membrana 2B (ITM2B), também encontrada como induzida pela SSH (Tabela 7), possui diversas funções. Uma dessas funções é reduzir os níveis de peptídeos β -amilóides tóxicos formados pela atividade do complexo da γ -secretase (RENGARAJ et al., 2008). Outra função atribuída a essa proteína é a indução de apoptose pela ativação da via mitocondrial dependente de caspases (FLEISCHER; AYLLON; REBOLLO, 2002).

É importante ressaltar que as funções dessas duas proteínas (PEN2 e ITM2B) na apoptose são antagônicas. A PEN2 promove a sobrevivência celular enquanto a ITM2B é pró-apoptótica. Por outro lado, essas duas proteínas também podem interagir, reduzindo os níveis dos peptídeos β -amilóides formados pela atividade do complexo γ -secretase.

15.2.5 Transporte de Oxigênio

Duas sequências neste estudo foram identificadas como *Hemoglobina* e *Alfa Hemoglobina A* (Tabela 8). Estudos em peixes (*Paralichthys olivaceus*) expostos a fração solúvel em água do petróleo mostraram uma redução na expressão do gene *Alfa Hemoglobina* nos rins e redução na contagem de células vermelhas (NAKAYAMA et al., 2008). Além disso, um declínio na concentração de hemoglobina foi observado em peixes (*Paralichthys olivaceus*) expostos a fenantreno (JEE; KIM; KANG, 2004), em peixes (*Prochilodus lineatus*) expostos a FAD (SIMONATO; GUEDES; MARTINEZ, 2008) e em peixes (*Pleuronectes americanus*) coletados em locais contaminados por HPAs e bifenilas policloradas. Dessa forma, a diminuição na expressão dos genes da hemoglobina neste estudo pode estar relacionada com os HPAs presentes na FAD.

15.2.6 Chaperonas e Coativadores da Transcrição

O Complexo associado a polipetídeos nascentes alfa (α -NAC) possui função de coativador transcricional. O α -NAC também pode interagir com polipetídeos recém sintetizados nos ribossomos, evitando interações inadequadas entre os polipeptídeos nascentes e as proteínas citosólicas. Além disso, essa proteína ajuda no correto endereçamento das proteínas recém sintetizadas. (WIEDMANN et al. 1994). Neste estudo o gene α -NAC foi identificado como um dos genes induzidos nos animais expostos a FAD (Tabela 7). Pode-se sugerir que este

aumento esteja relacionado à alteração no padrão de expressão gênica celular e a necessidade de α -NAC no processo de tradução subsequente.

A proteína de choque térmico 90 (HSP90) têm sido utilizada como marcador em diversos tipo de estresse celular (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). A HSP90 parece estar envolvida no envelhecimento dos receptores AHR recém sintetizados, estabilização da conformação ativa do AHR e inibição da dimerização constitutiva com ARNT (PETRULIS; PERDEW, 2002). A associação do receptor AHR e HSP90 é crucial para sinalização mediada pelo AHR, enquanto a desestabilização dessa interação conduz a degradação proteossomal do receptor (WISEMAN; VIJAYAM, 2007). A HSP90 também interage com outros receptores nucleares como o receptor de estrógeno (ER) e o receptor de glicocorticóide, sendo importante para a ativação do ER por estrógenos em peixes (OSBORNE et al., 2007).

Em mamíferos, a HSP90 é um componente do complexo molecular de chaperonas citosólico. A desestabilização desse complexo libera o fator de choque térmico 1 (HSF1), que após um processo de trimerização, translocação nuclear e interação com a região promotora do gene *HSP90*, promove a transcrição da *HSP90* (OSBORNE et al., 2007). Esse mecanismo de modulação da transcrição do gene *HSP90* foi descrito em mamíferos; não há, até o momento, informações para peixes.

No presente estudo a SSH mostrou uma redução na expressão da *HSP90* nos peixes expostos a FAD durante 24H (Tabela 8); a diminuição na expressão da *HSP90* também foi descrita em um trabalho realizado com peixes *Danio rerio* expostos a água produzida. As consequências fisiológicas de uma redução na expressão proteica da HSP90 pode envolver desregulação endócrina, devido a sua interação com os receptores nucleares, e até mesmo apoptose, uma vez que essa

proteína interfere no processo de apoptose inibindo a formação do apoptossomo (CHIOSIS et al., 2004).

15.2.7 Proteínas ribossomais e Mitocondriais

Nesse estudo houve um aumento na expressão do gene *citocromo c oxidase (COXI)*. A enzima citocromo C oxidase, ou complexo IV, é um grande complexo protéico transmembrana encontrado em bactérias e nas mitocôndrias. É a última enzima da cadeia transportadora de elétrons. Contribui na formação da diferença de potencial transmembrana utilizado pela ATP sintase para sintetizar o ATP (VOET; VOET, 2004).

Alguns genes que codificam proteínas ribossomais foram identificados como possivelmente reprimidos neste estudo (Tabela 8). Estas proteínas são componentes integrais da maquinaria celular basal envolvida na síntese de proteínas. Contudo, existem evidências mostrando a participação dessas proteínas nas vias de sinalização de crescimento.

16 CONCLUSÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

- Os genes envolvidos no processo de biotransformação de fase I e II validados por qPCR como *CYP1A* e *GST* foram induzidos no grupo exposto, mostrando que, de forma semelhante ao Capítulo 1, esses genes e as proteínas codificadas por eles podem ser bons biomarcadores de exposição a FAD;

- Outros genes de fase I e II de biotransformação (*CYP2P2*, *UDPGT1B*, *MET*) foram identificados e validados por qPCR. Esses genes são candidatos a biomarcadores de exposição aos componentes da FAD;

- A fase III de biotransformação também apresentou genes identificados como induzidos e reprimidos pela SSH (*ABCC4* e *OATP2*) que não foram validados por qPCR. Os substratos das proteínas codificadas por esses genes ainda não foram investigados em peixes. Entre os possíveis substratos estão glicuronídeos e Glutathione S-conjugados;

- A *VgA* foi identificada como gene reprimido na SSH, mas a validação por qPCR mostrou repressão gênica apenas em machos;

- Outros genes foram identificados por SSH e potencialmente codificam produtos envolvidos em diversas funções biológicas como: sistema imune, metabolismo de carboidratos e lipídeos, apoptose, transporte de oxigênio, enovelamento de proteínas, regulação da transcrição entre outras;

- O processo de ativação na expressão dos genes *CYP1A*, *GST*, *UDPGT1B* possivelmente está associado a uma ativação do AHR pelos seus agonistas encontrados na FAD;

- Estudos posteriores envolvendo a clonagem completa dos genes validados por qPCR são necessários para a identificação final dos genes;
- Estudos focados na identificação dos receptores nucleares que modulam os genes validados por qPCR são necessários. Essa informação permitirá identificar as classes de xenobióticos capazes de desencadear a ativação transcricional desses genes, ajudando a delimitar a especificidade de um gene e seu produto como biomarcador.

17 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAS, E. et al. PAH metabolites in bile, cytochrome P4501A and DNA adducts as environmental risk parameters for chronic oil exposure: a laboratory experiment with Atlantic cod. **Aquatic Toxicology**, v. 51, p. 241-258, 2000.

AKCHA, F. et al. Induction and elimination of bulky benzo[a]pyrene-related DNA adducts and 8-oxodGuo in mussels *Mytilus galloprovincialis* exposed *in vivo* to B[a]P-contaminated feed. **Marine Ecology Progress Series**, v. 205, p. 195-206, 2000.

AMARAL, M.C.; BONECKER, A.C.T.; ORTIZ, C.H.D. Activity determination of $\text{Na}^+ \text{K}^+$ - ATPase and Mg^{++} - ATPase enzymes in the gill of *Poecilia vivipara* (Osteichthyes, Cyprinodontiformes) in different salinities. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 44, p. 01-06, 2001.

ANDERSON, M. J. et al. *In Vivo* Modulation of 17 β -Estradiol-Induced Vitellogenin Synthesis and Estrogen Receptor in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Liver Cells by b-Naphthoflavone. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 137, p. 210-218, 1996.

ARAÚJO, F.G. et al. Distribution of guppies *Poecilia reticulata* (Peters, 1860) and *Phalloceros caudimaculatus* (Hensel, 1868) along a polluted stretch of the Paraíba do Sul River, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 69, p. 41-48, 2009.

ARUKWE, A.; NORDBØ, B. Hepatic biotransformation responses in Atlantic salmon exposed to retinoic acids and 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl (PCB congener 77). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 147, p. 470-482, 2008.

AUBEL, R.A.M.H.V. et al. The *MRP4/ABCC4* Gene Encodes a Novel Apical Organic Anion Transporter in Human Kidney Proximal Tubules: Putative Efflux Pump for Urinary cAMP and Cgmp. **Journal of American Society of Nephrology**, v.13, p. 595-603, 2002.

BADO-NILLES, A. et al. Effects of two oils and 16 pure polycyclic aromatic hydrocarbons on plasmatic immune parameters in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (Linné). **Toxicology in Vitro**, v. 23, p. 235-241, 2009.

BAGCHI, D. et al. Comparative effects of TCDD, endrin, naphthalene and chromium(VI) on oxidative stress and tissue damage in liver and brain tissues of mice. **Aquatic Toxicology**, v. 175, p. 73-82, 2002.

BAI, J. et al. Multidrug resistance protein 4 (MRP4/ABCC4) mediates efflux of bimane-glutathione. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 36, p. 247-257, 2004.

BARRON, M.G.; HEINTZ, R.; RICE, S.D. Relative potency of PAHs and heterocycles as aryl hydrocarbon receptor agonists in fish. **Marine Environmental Research**, v. 58, p. 95-100, 2004.

BARSIENE, J. et al. Investigation of micronuclei and other nuclear abnormalities in peripheral blood and kidney of marine fish treated with crude oil. **Aquatic Toxicology**, v. 78, p. 99-104, 2006.

BEUTLER, E. **Red cell metabolism: a manual of biochemical methods**. New York: Grune & Stratton, 1975. 160 p.

BHUIYAN, J. et al. Effects of high-fat diet and fasting on levels of acyl-coenzyme a binding protein in liver, kidney, and heart of rat. **Metabolism**, v. 44, p. 1185-1189, 1995.

BIERKENS, J.G.E.A. Applications and pitfalls of stress-proteins in biomonitoring. **Toxicology**, v. 153, p. 61-72, 2000.

BISHOP, P.L. Marine pollution and its control. New York: McGraw-Hill Book Company, 1983. 387 p.

BOUTET, I.; TANGUY, A.; MORAGA, D. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hydrocarbon contamination under experimental conditions. **Gene**, v. 329, p. 147-157, 2004.

BRAY, T.M.; LEVY, M.A. Assessment of oxidative stress: Concepts and approaches. In: BRAY, T.M.; SCHOENE, N.W. **Models and methods in cell signaling and gene expression: Applications to oxidative stress research**. London: OICA International, 2000. p. 1-14.

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

BULTELLE, F. et al. Identification of differentially expressed genes in *Dreissena polymorpha* exposed to contaminants. **Marine environmental research**, v. 54, p. 385-389, 2002.

BURGEOT, T. et al. Bioindicators of pollutant exposure in the northwestern Mediterranean Sea. **Marine Ecology Progress Series**, v. 131, p. 125-141, 1996.

BURTON, M. et al. Evolution of the acyl-CoA binding protein (ACBP). **Biochemical Journal**, v. 392, p. 299-307, 2005.

CAJARAVILLE, M.P. et al. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. **Science of the Total Environment**, v. 247, p. 295-311, 2000.

CAJARAVILLE, M.P. et al. Signs of recovery of mussels health two years after the Prestige oil spill. **Marine Environmental Research**, v. 62, p. 337-341, 2006.

CAMPBELL, W.A. et al. Zebrafish lacking Alzheimer presenilin enhancer 2 (Pen-2) demonstrate excessive p53-dependent apoptosis and neuronal loss. **Journal of Neurochemistry**, v. 96, p. 1423-1440, 2006.

CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Glutathione reductase. **Methods in Enzymology**, v. 113, p. 484-490, 1985.

CARRO, N.; COBAS, J.; MANEIRO, J. Distribution of aliphatic compounds in bivalve mollusks from Galicia after the Prestige oil spill: Spatial and temporal trends. **Environmental Research**, v. 100, p. 339-348, 2006.

CETESB. **Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental**. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.br>>. Acesso em: novembro de 2008.

CHEN, C.C.; KLAASSEN, C.D. Rat multidrug resistance protein 4 (Mrp4, Abcc4): molecular cloning, organ distribution, postnatal renal expression, and chemical inducibility. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 317, p. 46-53, 2004.

CHIOSIS, G. et al. Hsp90: the vulnerable chaperone. **Drug Discovery Today**, v. 9, p. 881-888, 2004.

CONAMA 2000. **Conselho Nacional do Meio Ambiente, Resolução No 273, de 29 de novembro de 2000**. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama>. Acesso em: setembro de 2008.

DAVIS, A. E. Biological Effects of C1 Inhibitor. **Drug News Perspective**, v. 7, p. 439, 2004.

FARRINGTON, J.W. et al. Hydrocarbons in cores of northwestern Atlantic coastal and continental margin sediments. **Estuarine Coastal Marine Sciences**, v. 5, p. 793-808, 1977.

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

FILHO, A.M.S. **Planos Nacionais de Contingência para Atendimento a Derramamento de Óleo: Análise de Países Representativos das Américas para Implantação no Caso do Brasil**. 2006. 217 f. Dissertação (Mestrado em Ciências em Planejamento Ambiental) - Curso de Pós-Graduação em

Engenharia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

FITZPATRICK, P.J. et al. Assessment of a glutathione S-transferase and related protein in the gill and digestive gland of *Mytilus edulis* (L.), as a potential organic pollution biomarkers. **Biomarkers**, v. 2, p. 51-56, 1997.

FLEISCHER, A.; AYLLON, V.; REBOLLO, V. ITM2BS regulates apoptosis by inducing loss of mitochondrial membrane potential. **European Journal of Immunology**, v. 32, p. 3498–3505, 2002.

FORMAN, H.J.; ZHANG, H.; RINNA, A. Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 30, p. 1-12, 2009.

FRANK P.G.; MARCEL, Y.L. Apolipoprotein A-I: structure-function relationships. **Journal of Lipid Research**, v. 41, p. 853-872, 2000.

FROUIN, H. et al. Physiological effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on soft-shell clam *Mya arenaria*. **Aquatic Toxicology**, v. 82, p.120-134, 2007.

FUJITA, S. et al. P450 in wild animals as a biomarker of environmental impact. **Biomarkers**, v. 6, p. 19-25, 2001.

GAGNON, M.M.; HOLDWAY, D.A. Metabolic Enzyme Activities in Fish Gills as Biomarkers of Exposure to Petroleum Hydrocarbons. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 44, p. 92-99, 1999.

GALLOWAY, T.S. et al. A multi-biomarker approach to ecosystem management. **Marine Environmental Research**, v. 58, p. 233-237, 2004.

GESAMP. Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Pollution (GESAMP), Reducing Environmental Impacts of Coastal Aquaculture Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Reports and Studies No.47 IMO/FAO/Unesco/WMO/WHO/ IAEA/UN/UNEP**. Roma, 1991.

GLOCK, G.E.; MCLEAN, L.P. Further studies on the properties and assay of glucose 6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase of rat liver. **Biochemical Journal**, v. 55, p. 400-408, 1953.

GOKSØYR, A.; FÖRLIN, L. The cytochrome P-450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring. **Aquatic Toxicology**, v. 22, p. 287-312, 1992.

GUO, G.L.; CHOUDHURI, S.; KLAASSEN, C.D. Induction Profile of Rat Organic Anion Transporting Polypeptide 2 (oatp2) by Prototypical Drug-Metabolizing Enzyme Inducers That Activate Gene Expression through Ligand-Activated Transcription Factor Pathways. **The Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics**, v. 300, p. 206–212, 2002.

HAHN, M. E. Aryl hydrocarbon receptors: diversity and evolution. **Chemico-Biological Interactions**, v. 141, p. 131-160, 2002.

HE, N.; LIU, H.; XU, X. Identification of genes involved in the response of haemocytes of *Penaeus japonicus* by suppression subtractive hybridization (SSH) following microbial challenge. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 17, p. 121-128, 2004.

HAYES, J.D.; DINKOVA-KOSTOVA, A.T.; MCMAHON, M. Cross-talk between transcription factors AhR and Nrf2: lessons for cancer chemoprevention from dioxin. **Toxicological Sciences**, v. 111, p. 199-201, 2009.

ICES. The International Council for the Exploration of the Sea (ICES), Marine Habitat Committee. **Report of the working group on biological effects of contaminants (WGBEC) 22-26 Março 2004**. Copenhagen, 2004.

INSAUSTI, D. et al. Biliary fluorescent aromatic compounds (FACs) measured by fixed wavelength fluorescence (FF) in several marine fish species from the NW Mediterranean. **Marine Pollution Bulletin**, v. 58, p. 1635-1642, 2009.

JEE, J.; KIM, S.; KANG, J. Effects of phenanthrene on growth and basic physiological functions of the olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 304, p. 123–136, 2004.

JIANG, H. et al. Human catechol-O-methyltransferase down-regulation by estradiol. **Neuropharmacology**, v. 45, p. 1011–1018, 2003.

KAWAHARA, S. et al. The effect of in vivo co-exposure to estrone and AhR-ligands on estrogenic effect to vitellogenin production and EROD activity. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 27, p. 139–143, 2009.

KEEN, J.H.; HABIG, W.H.; JAKOBY, W.B. Mechanism for the several activities of the glutathione S-transferase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 251, p. 6183–6188, 1976.

KENNISH, M.J. **Ecology of Estuaries: Anthropogenic Effects**. Londres: CRC Press, 1992. 494 p.

KEPPLER, C.; RINGWOOD, A. H. Expression of P-glycoprotein in the gills of oysters, *Crassostrea virginica*: seasonal and pollutant related effects. **Aquatic Toxicology**, v. 54, p. 195–204, 2001.

KOBAYASHI, H. et al. Inhibition of the soluble and the tumor cell receptor-bound plasmin by urinary trypsin inhibitor and subsequent effects on tumor cell invasion and metastasis. **Cancer Research**, v. 54, p. 844–849, 1994.

KONISHI, T. et al. A new class of glutathione S-transferase from the hepatopancreas of the red sea bream *Pagrus major*. **Biochemistry Journal**, v. 388, p. 299–307, 2005.

KOSKINEN, H. et al. Response of rainbow trout transcriptome to model chemical contaminants. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 320, p. 745–53, 2004.

KRAUS, L.A.; S.; BONECKER, A.C.T.; VITAL, N.A.A. Acute Toxicity of Potassium Dichromate, Sodium Dodecyl sulfate, Copper and Zinc to *Poecilia vivipara* (Osteichthyes, Cyprinodontiformes). **Fresenius Environmental Bulletin**, v. 7, p. 654-658, 1998.

LAMBERT, G.H. et al. Induced CYP1A2 activity as a phenotypic biomarker in humans highly exposed to certain PCBs/PCDFs. **Environmental Science & Technology**, v. 40, p. 6176-6180, 2006.

LEAVER, J.M. et al. Piscine UDP-glucuronosyltransferase 1B. **Aquatic Toxicology**, v. 84, p. 356–365, 2007.

LI, N. et al. Nrf2 is a key transcription factor that regulates antioxidant defense in macrophages and epithelial cells: protecting against the proinflammatory and oxidizing effects of diesel exhaust chemicals. **Journal of Immunology**, v. 173, p. 3467-3481, 2004.

LIVINGSTONE, D.R. Biotechnology and Pollution Monitoring - Use of Molecular Biomarkers in the Aquatic Environment. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 57, p. 195-211. 1993.

MACHELLA, N.; REGOLI, F.; SANTELLA, R.M. Immunofluorescent detection of 8-oxo-dG and PAH bulky adducts in fish liver and mussel digestive gland. **Aquatic Toxicology**, v. 71, p. 335-343, 2005.

MACLEOD, W. D. et al. Standard Analytical Procedures of the NOAA National Analytical Facility, 1985-1986. Extractable Toxic Organic Components. Second edition, U. S. Department of Commerce, NOAA/NMFS. NOAA Tech. Memo. NMFS F/NWC-92, 121.

MAGNADÓTTIR, B.; LANGE, S. Is Apolipoprotein A-I a regulating protein for the complement system of cod (*Gadus morhua* L.)?. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 16, p. 265-269, 2004.

MATTHEWS, J.; GUSTAFSSON, J. Estrogen receptor and aryl hydrocarbon receptor signaling pathways. **Nuclear Receptor Signaling**, v. 4, p. 1-4, 2006.

MCCORD, J.M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocuprein (hemocuprein). **Journal of Biological Chemistry**, v. 244, p. 6049-6055, 1969.

MENICOM, M.F.G. et al. Brazilian oil spills chemical characterization - case studies. **Environmental Forensics**, v. 3, p. 303-321, 2002.

MONTEIRO, P. R. R.; REIS-HENRIQUES, M. A.; COIMBRA, J. Plasma steroid levels in female flounder (*Platichthys flesus*) after chronic dietary exposure to single polycyclic aromatic hydrocarbons. **Marine Environmental Research**, v. 49, p. 453-467, 2000.

NAHRGANG, J. et al. PAH biomarker responses in polar cod (*Boreogadus saida*) exposed to benzo(a)pyrene. **Aquatic Toxicology**, v. 94, p. 309-319, 2009.

NAKAYAMA, K. et al. Toxicogenomic analysis of immune system-related genes in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) exposed to heavy oil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 57, p. 445-452, 2008.

NAVAS, J.M.; SEGNER, H. Antiestrogenicity of β -naphthoflavone and PAHs in cultured rainbow trout hepatocytes: evidence for a role of the arylhydrocarbon receptor. **Aquatic Toxicology**, v. 51, p. 79-92, 2000.

NEBERT, D.W.; KARP, C.L. Endogenous Functions of the Aryl Hydrocarbon Receptor (AHR): Intersection of Cytochrome P450 1 (CYP1)-metabolized Eicosanoids and AHR Biology. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, p. 36061-36065. 2008.

NEFF, J.M. **Bioaccumulation in Marine Organisms: Effect of Contaminants from Oil Well Produced Water Amsterdam**. The Netherlands: Elsevier Science Publishers, 2002. 452 p.

NEFF, J.M.; STOUT, S.A.; GUNSTER, D.G. Ecological risk assessment of PAH in sediments: Identifying sources and ecological hazard. **Integrated Environmental Assessment and Management**, v. 1, p. 22-33, 2005.

NEVES, F.M.; MONTEIRO, L.R. Body shape and size divergence among populations of *Poecilia vivipara* in coastal lagoons of south-eastern Brazil. **Journal of Fish Biology**, v. 63, p. 928-941, 2003.

NICOLAS, J. Vitellogenesis in fish and the effects of polycyclic aromatic hydrocarbon contaminants. **Aquatic Toxicology**, v. 45, p. 77–90, 1999.

NIYOGI, S. et al. Seasonal variation of antioxidant and biotransformation enzymes in barnacle, *Balanus balanoides*, and their relation with polyaromatic hydrocarbons. **Marine Environmental Research**, v. 52, p. 13-26, 2001.

OLEKSIK, F.M. et al. Identification and regulation of a new vertebrate cytochrome P450 subfamily, the CYP2Ps, and functional characterization of CYP2P3, a conserved arachidonic acid epoxygenase/19-hydroxylase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 411, p. 223–234, 2003.

OLF. The Norwegian Oil Industry Association Water Column monitoring. Summary Report 2005. **Discharges risk assessment monitoring**. Stavanger, 2005.

OSBORNE, N. et al. The role of hsp90 in 17 α -ethynylestradiol-induced endocrine disruption in rainbow trout hepatocytes. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 68, p. 13–19, 2007.

PACHECO, M.; SANTOS, M. A. Biotransformation, Endocrine, and Genetic Responses of *Anguilla anguilla* L. to Petroleum Distillate Products and Environmentally Contaminated Waters. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 49, p. 64-75, 2001a.

PACHECO, M.; SANTOS, M. A. Biotransformation, genotoxic and histopathological effects of environmental contaminants in European eel (*Anguilla anguilla* L.). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 53, p. 331-347, 2001b.

PETERSON, G.L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. wich is more generally applicable. **Analytical Biochemistry**, v. 83, p. 346-356, 1977.

PETRULIS, J.R.; PERDEW, G.H. The role of chaperone proteins in the aryl hydrocarbon receptor core complex. **Chemico-Biological Interactions**, v. 141, p. 25-40, 2002.

PORTAL BR 2005. **Petrobrás Distribuidora**. Disponível em: <<http://www.br.com.br/portalbr>>. Acesso em: outubro 2008.

RAND, G.M. **Effects, environmental fate, and risk assessment**. Washington: Taylor & Francis, 1995. 1125 p.

RENGARAJ, D. et al. Differential expression and regulation of integral membrane protein 2b in rat male reproductive tissues. **Asian Journal of Andrology**, v. 10, p. 503-511, 2008.

ROSA, A. P. **Processos de biorremediação na mitigação do impacto ambiental, devido a eventuais derrames de óleo na bacia de campos-experimentos laboratoriais**. 2001. 131f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Reservatório e de Exploração) – Curso de pós-graduação em Engenharia de Reservatório e de Exploração, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Rio de Janeiro, 2001.

RUSSEL, F.G.M.; KOENDERINK, J.B.; MASEREEUW, R. Multidrug resistance protein 4 (MRP4/ABCC4): a versatile efflux transporter for drugs and signalling molecules. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 29, p. 200-207, 2008.

SANDBERG, M.B. et al. The Gene Encoding Acyl-CoA-binding Protein Is Subject to Metabolic Regulation by Both Sterol Regulatory Element-binding. Protein and Peroxisome Proliferator-activated Receptor in Hepatocytes. **The Journal Of Biological Chemistry**, v. 280, p. 5258-5266, 2005

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

SEWALL, L. The skill of ecological perception. In: **Molecular approaches to identify exposure and risk to specific environmental pollutants**. Biomarkers, v. 4, p. 93-103, 1999.

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, p. 112-120, 2008.

SIMONEIT, B.R.T. Hydrothermal alteration of organic matter in marine and terrestrial systems. In: **Organic Geochemistry – Principles and Applications Topics in Geobiology 11**, New York: Plenum Press, 1993. p. 397-418.

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, p. 1007-1016, 2000.

SLEKAR, K.H.; KOSMAN, D.J.; CULOTTA, V.C. The yeast copper/zinc superoxide dismutase and the pentose phosphate pathway play overlapping roles in oxidative stress protection. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 28831-28836, 1996.

SNYDER, M.J.; GIRVETZ, E.; MULDER, E.P. Induction of Marine Mollusc Stress Proteins by Chemical or Physical Stress. **Environmental Contamination and Toxicology**, v. 41, p. 22-29, 2001.

SORIANO, J.A. et al. Spatial and temporal trends of petroleum hydrocarbons in wild mussels from the Galician coast (NW Spain) affected by the Prestige oil spill. **Science of the Total Environment**, v. 370, p. 80-90, 2006.

STEPHENSEN, E.; STURVE, J.; FÖRLIN, L. Effects of redox cycling compounds on glutathione content and activity of glutathione-related enzymes in rainbow trout liver. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 133, p. 435-442, 2002.

TENHUNEN, J. et al. Genomic organization of the human catechol O-methyltransferase gene and its expression from two distinct promoters **European Journal of Biochemistry**, v. 223, p. 1049-1059, 1994.

TERAMITSU, I. et al. Identification of novel cytochrome P450 1A genes from five marine mammals species. **Aquatic Toxicology**, v. 51, p. 145-153, 2000.

THOMAS, P.; BUDIANTARA, L. Reproductive Life History Stages Sensitive to Oil and Naphthalene in Atlantic Croaker. **Marine Environmental Research**, v. 39, p. 147-150, 1995.

TIBURTIUS, E.R.L. et al. Degradação de BTXs via processos oxidativos avançados. **Química Nova**, v. 28, p. 61-64, 2005.

TIMME-LARAGY, A.R. et al. Synergistic induction of AHR regulated genes in developmental toxicity from co-exposure to two model PAHs in zebrafish. **Aquatic Toxicology**, v. 85, p. 241-250, 2007.

TINTOS, A. et al. Naphthalene treatment alters liver intermediary metabolism and levels of steroid hormones in plasma of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 66, p. 139-147, 2007.

TYAGI S.; SALIER J.P.; LAL S.K. The liver specific human α 1-microglobulin/bikunin precursor (AMBIP) is capable of self association. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 399, p. 66-72, 2002.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N.P.E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, p. 57-149, 2003.

VANHULLE, V.P. et al. Cryopreservation of rat precision-cut liver slices by ultrarapid freezing Influence on phase I and II metabolism and on cell viability upon incubation for 24 hours. **Life Sciences**, v. 68, p. 2391–2403, 2001.

VANZELLA, T.P.; MARTINEZ, C.B.R.; CÓLUS, I.M.S. Genotoxic and mutagenic effects of diesel oil water soluble fraction on a neotropical fish species. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 631, p. 36-43, 2007.

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

VOET, D.; VOET, J.G. **Biochemistry**, 3^a ed. John Wiley and Sons, 2004.

VOLKMAN, J. K. et al. Identification of natural, anthrogene and petroleum hydrocarbons In: **Aquatic Sediments**. Science of Total Environment, v. 112, p. 203-219, 1992.

VONDRACEK, J. et al. Concentrations of methylated naphthalenes, anthracenes, and phenanthrenes occurring in czech river sediments and their effects on toxic events associated with carcinogenesis in rat liver cell lines. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 26, p. 2308–2316, 2007.

WALKER, C.H. et al. **Principles of Ecotoxicology**. Londres: Taylor & Francis, 1996. 321 p.

WANG, Z. et al. **Characteristics of Spilled Oils, Fuels, and Petroleum Products: Composition and Properties of Selected Oils**. North Carolina: United States Environmental Protection Agency, 2003. 286 p.

WENDEL, A. Glutathione peroxidase. **Methods in Enzymology**, v. 77, p. 325-333, 1981.

WERNER, I.; KLINE, K.F.; HOLLIBAUGH, J.T. Stress protein expression in *Ampelisca abdita* (Amphipoda) exposed to sediments from San Francisco Bay. **Marine Environmental Research**, v. 45, p. 417-430, 1998.

WIEDMANN, B. et al. A protein complex required for signal-sequence-specific sorting and translocation. **Nature**, v. 370, p. 434-440, 1994.

WINSTANLEY, C. **Molecular Biomethods Handbook**. Totowa: Humana Press, 2008. 1119 p.

WISEMAN, S.B.; VIJAYAN, M.M. Aryl hydrocarbon receptor signaling in rainbow trout hepatocytes: Role of hsp90 and the proteasome. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 146, p. 484-491, 2007.

WOLFE, M.F. et al. Induction of heat shock protein (hsp)60 in *Isochrysis galbana* exposed to sublethal preparations of dispersant and Prudhoe Bay crude oil. **Marine Environmental Research**, v. 47, p. 473-489, 1999.

YASUDA, S. et al. Concerted action of the cytosolic sulfotransferase, SULT1A3, and catechol-O-methyltransferase in the metabolism of dopamine in SK-N-MC human neuroblastoma cells. **Neuroscience Research**, v. 64, p. 273-279, 2009.

YIN, Y. et al. Bioaccumulation and ROS generation in liver of *Carassius auratus*, exposed to phenanthrene. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 145, p. 288-293, 2007.

ZAMEK-GLISZCZYNSKI, M.J. et al. Integration of hepatic drug transporters and phase II metabolizing enzymes: Mechanisms of hepatic excretion of sulfate, glucuronide, and glutathione metabolites. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 27, p. 447-486, 2006.

ZANETTE, J. **Identificação e caracterização de marcadores moleculares para estudos ecotoxicológicos em moluscos bivalves e peixes.** 2009. 180 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Curso de pós graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

ZANETTE, J.; MONSERRAT, J.M.; BIANCHINI, A. Biochemical biomarkers in gills of mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae* from three Brazilian estuaries. **Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology**, v. 143, p. 187-195. 2006.

ZETTERBERG, H. et al. The Cytosolic Loop of the γ -Secretase Component Presenilin Enhancer 2 Protects Zebrafish Embryos from Apoptosis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, p. 11933–11939, 2006.

ZHANG, J.F. et al. Effects of water-soluble fractions of diesel oil on the antioxidant defenses of the goldfish, *Carassius auratus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 58, p. 110-116, 2004.