

Mariana Coelho Naldi

**ANÁLISE DA TRANSCRIÇÃO GÊNICA DE ENZIMAS
ENVOLVIDAS NA BIOTRANSFORMAÇÃO E DO EFEITO
GENOTÓXICO EM PEIXES *Poecilia vivipara* (Bloch e
Scheider, 1801) EXPOSTOS AO FENANTRENO**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de
Graduação em Ciências Biológicas
da Universidade Federal de Santa
Catarina como requisito parcial
para a conclusão do curso.
Orientador: Prof. Dr. Afonso Celso
Dias Bainy

Florianópolis
2012

Naldi, Mariana Coelho

Análise da transcrição gênica de enzimas envolvidas na biotransformação e do efeito genotóxico em peixes *Poecilia vivipara* (Bloch e Scheider, 1801) expostos ao fenantreno./ Mariana Coelho Naldi; orientador, Prof. Dr. Afonso Celso Dias Bainy – Florianópolis, SC, 2012.
70p.

Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Curso de Graduação em Ciências Biológicas.

Inclui referências

1. Fenantreno 2. *Poecilia vivipara* 3. Biomarcadores

Este trabalho é dedicado à minha família, à memória de minha avó e aos meus pais que mesmo distantes estiveram sempre por perto.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer às instituições e pessoas que direta ou indiretamente viabilizaram a produção deste trabalho:

Ao Prof. Afonso pela oportunidade e confiança nesses anos de estágio no laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo incentivo financeiro através do Instituto Nacional de Toxicologia Aquática;

Aos professores do curso de graduação em Ciências Biológicas que não somente me ensinaram o conteúdo programado do curso, mas também a ser um profissional crítico;

Às pessoas da banca que se dispuseram a ler e a corrigir o trabalho, assim como me ajudaram muito;

Ao pessoal do LABCAI que compartilharam cafés, bolinhos, almoços no RU, churrascos, cervejas, mas muitos dias de trabalho, inclusive companheiros de finais de semana. Também aos que ajudaram a carregar galões de água, e ainda se divertiram limpando o bioensaio e a caixa d'água diversas vezes. Aos que auxiliaram a aclimatar e a dissecar os animais, aos que ajudaram nas minhas dúvidas e ansiedades, e aos que simplesmente me fizeram rir. Entre eles: Clei, Elisa, Dani, Karim, Fabrício, Naissa, Tarquin, Jean, Maya, Ju, Pedro, Jacó e Lila; especialmente à Naissa pelo auxílio no Teste Cometa e ao Prof. Alcir D Afré por disponibilizar o espaço para a realização do mesmo, especialmente também ao Clei pela ajuda em toda logística da exposição.

À minha irmã de coração, Celeste, por algumas passagens tristes e inúmeras felizes durante estes cinco anos de graduação. Cabe ressaltar as noites de filmes e brigadeiros, e finais de semana estudando, entre outros, uma madrugada tentado organizar a Discussão através de recortes de texto espalhados pelo quarto valendo um vinho para quem conseguisse encaixá-las;

Às minhas amigas da graduação Iva, Mari e Cella, por muitos motivos de risos e às amigas de infância Josy, Isa e Marita, que mesma a distância nunca separou a certeza que temos uma a outra em qualquer situação e parte do mundo;

Ao meu namorado, Henrique, por compartilhar todo esse tempo comigo e sempre me fazer sorrir. Por inesquecíveis trilhas e viagens, e por pilhas de livros selecionados para eu ler e viajar;

À minha irmã linda, Aline, que muito soube ensinar-me a ser forte e lutar pelos meus ideais, nunca deixando de esquecer meu lado “Diva”. Ao meu irmão, Murilo, por seus inúmeros conselhos e respostas de e-mails desesperados;

Aos meus avós Anésia e Wenceslau, que sempre oraram por mim. À minha avó Maria Alice que teve que partir no meio desta jornada, mas sempre me mostrou a ser um exemplo a seguir e deixou muitas saudades. Ao meu avô Paulo que sempre gostou de desenhar nos pés da “neneca”, até depois dela ter ficado velha. A minha madrinha Fernanda, pelas caminhadas e conversas;

E finalmente, e principalmente, aos meus amados pais, Marisa e Ricardo, por sempre terem apoiado meus estudos e todas as ideias “malucas” que tive durante esses 23 anos. Obrigada pela dedicação, confiança e carinho.

A maior barreira para o sucesso é o medo do fracasso.

(Autor desconhecido)

RESUMO

A água é um recurso indispensável para todos os seres vivos, mas existe uma gama de substâncias químicas oriundas das atividades industriais, agropastoris e do esgoto urbano, que, quando dissolvidos na água, diminuem a sua qualidade. A determinação das concentrações de poluentes aquáticos é essencial para o conhecimento dos níveis de contaminação ambiental e avaliação de risco, porém, não permite estimar a biodisponibilidade e os efeitos tóxicos associados nos organismos. Em ecossistemas aquáticos, os peixes são bons bioindicadores e suas alterações biológicas podem ser utilizadas como biomarcadores. No presente trabalho peixes *Poecilia vivipara* foram expostos a três concentrações de fenantreno na água (10, 20 e 200µg/L) e após 24 horas de exposição foram analisados os níveis de transcrição de genes que codificam enzimas envolvidas no processo de biotransformação de xenobióticos no fígado e brânquia, assim como danos ao DNA dos eritrócitos destes animais. As análises quantitativas da transcrição dos genes *Citrocromo P450 (CYP1A, CYP1B e CYP1C)*, *Uridina difosfato glicuronil-transferase (UDPGT1B)*, *Glutathione-S-transferase (GST)* e *Metiltransferase (MET)* no fígado e brânquia de peixes foram realizadas através da Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real quantitativa (qRT-PCR) e a análise da genotoxicidade dos eritrócitos foi avaliada através do Ensaio Cometa. A análise de fenantreno nos aquários indica que houve absorção deste contaminante pelos animais. Foi observado um aumento na transcrição de *CYP1A* e *UDPGT1B* no fígado de peixes expostos a maior concentração de fenantreno (200µg/L) em relação aos animais expostos a concentrações menores (10 e 20µg/L). Por outro lado, a exposição ao fenantreno causou danos significativos às células do sangue destes organismos nas diferentes concentrações utilizadas neste trabalho em relação ao controle. Este trabalho mostrou que a exposição ao fenantreno causou alterações em biomarcadores moleculares e citogenéticos que podem ser recomendados em conjunto com análises químicas no diagnóstico de regiões com influência de atividades antrópicas, relacionadas ao uso de derivados de petróleo.

Palavras-chave: Fenantreno, *Poecilia vivipara*, Biomarcadores.

SUMÁRIO

1. Introdução	13
1.1 Recursos Hídricos e Poluição Aquática	13
1.2 Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos e o fenantreno	14
1.3 O Uso de Indicadores	17
1.4 Ecotoxicologia: Ferramenta de estudo	17
1.5 Monitoramento Ambiental Biológico	20
1.6 Respostas genotóxicas: Ensaio Cometa	21
1.7 Respostas moleculares: Biomarcadores relacionados à biotransformação	22
1.8 Quantificação relativa da transcrição de genes através da Reação de Polimerização em Cadeia em Tempo Real (qRT-PCR)	25
2 Objetivos	27
2.1 Objetivos específicos	27
3 Materiais e Métodos	29
3.1 Coleta e aclimatação dos peixes <i>Poecilia vivipara</i>	29
3.2 Preparação da solução de fenantreno	29
3.3 Exposição dos peixes <i>Poecilia vivipara</i> ao fenantreno	29
3.4 Construção da curva padrão de fenantreno	30
3.5 Análise do fenantreno na água dos aquários	31
3.6 Preparação das amostras de tecido	31
3.7 Ensaio Cometa	31
3.7.1 Preparação das lâminas pré-cobertas com agarose	31
3.7.2 Preparação e aplicação das amostras na lâmina	32
3.7.3 Lise celular e desnaturação do DNA	32
3.7.4 Eletroforese	32
3.7.5 Neutralização, fixação e coloração	32
3.7.6 Leitura das lâminas	33
3.8 Procedimentos para quantificação relativa de transcritos	35
3.8.1 Extração de RNA total	35
3.8.2 Preparação do cDNA para RT-PCR quantitativo	35

3.8.3 Quantificação relativa em Tempo Real da Reação de Polimerase em Cadeia (qRT-PCR)	36
3.8.4 Análise da transcrição relativa e o método comparativo $\Delta\Delta Ct$	38
4 Análise estatística	41
4.1 Ensaio Cometa	41
4.2 Quantificação relativa da transcrição de genes	41
5 Resultados	43
5.1 Análise do fenantreno na água dos aquários	45
5.2 Ensaio Cometa	47
5.3 Análise da transcrição gênica	48
5.3.1 Fígado	49
5.3.2 Brânquia	51
6 Discussão	53
7 Conclusão	59
8 Referências	61

1. Introdução

1.1 Recursos Hídricos e Poluição Aquática

Ambientes aquáticos ocupam a maioria da superfície do planeta, onde cerca de 70% de todos os organismos existentes vivem parte ou todo o ciclo de vida. Estes ambientes compreendem não somente rios, lagos, lagoas e ambientes marinhos, mas também a conexão entre eles e a circulação da água via precipitação e umidade (Gomes e Clavico, 2005).

Além de ser indispensável para todos os seres vivos, é um importante insumo para as atividades econômicas e industriais, servindo também como via de transporte, fonte de energia e de alimentos. É um ambiente de lazer e agrega valor cênico às paisagens onde se insere.

Segundo Shubo (2003) e Morães e Jordão (2002), as pressões sobre a demanda da água vêm reduzindo a sua qualidade, o que tem forte impacto sobre a saúde pública e na qualidade dos recursos naturais. Há uma diversidade de poluentes potenciais que podem prejudicar a qualidade das águas de rios, lagos e águas costeiras e marinhas. Compostos tóxicos são descarregados nos sistemas aquáticos por lixiviação de aterros sanitários, de áreas agropastoris, e mesmo das cidades (a maioria por descargas domésticas e industriais), e também por derrames de petróleo e óleo (Pereira, 2004). Muitos poluentes do ar, como os organoclorados e os hidrocarbonetos são precipitados em conjunto com as chuvas ou neves e entram nos sistemas aquáticos (Foth, 1999).

Para Moraes (1998) a urbanização brasileira é significativa na zona costeira, faixa onde habita a maior parte da população do país, intensificando os níveis de contaminação dos estuários, mares e, em certos casos extremos, estendendo ao oceano Atlântico.

De acordo com o Decreto n. 50.877/61, art. 3, a poluição dos recursos hídricos é definida como:

“qualquer alteração das propriedades físicas, químicas e biológicas das águas que possa importar em prejuízo à saúde, à segurança e ao bem-estar das populações e ainda comprometer a sua utilização para fins agrícolas, industriais, comerciais, recreativos e principalmente a existência normal de fauna aquática”.

Contudo, segundo Moraes e Jordão (2002), o conceito de poluição ainda não está bem definido ou esclarecido. Nass (2002) esclarece que a poluição é uma alteração ecológica de origem antrópica que, direta ou indiretamente, prejudica a qualidade de vida humana, acarretando danos aos recursos naturais, enquanto a contaminação é a introdução de seres patogênicos ou substâncias, que também afetam a saúde dos seres vivos, porém não alteram as interações ecológicas. Ressalta ainda o autor que este conceito de contaminação vem sendo usado equivocadamente como poluição. Desta forma, para alguns a poluição é a degradação ou modificação prejudicial de um ambiente em que haja qualquer forma de vida, para outros, o conceito de poluição limita-se à esfera dos ambientes humanos (Moraes e Jordão, 2002).

Partindo das conceituações propostas por Nass (2002), podemos concluir que um ambiente pode estar contaminado e ao mesmo tempo não ser considerado poluído, justamente porque é difícil mensurar a contaminação real e seus efeitos sobre a biota.

Neste caso, segundo Meniconi (2007), a água atua como um solvente e dispersa os contaminantes de forma que estes podem não ser detectados por meio da análise físico-química convencional, em níveis considerados de poluição ou alteração ecológica do ambiente. Além disso, é necessário destacar que a qualidade da água é dinâmica, influenciada por seu ciclo hidrológico e pelas correntes, podendo variar no tempo e espaço.

1.2 Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos e o fenantreno

A poluição aguda por óleos e derivados é frequentemente ocasionada pelos acidentes com vazamentos de petróleo pelos navios e plataformas, sendo estes a fonte principal de contaminação aguda dos ecossistemas costeiros (Kennish, 1992). Como exemplos, em 2002 houve o derramamento de mais de 60.000 toneladas de óleo com o rompimento do tanque *Prestige* na costa da Espanha. Este foi capaz de causar danos ambientais em escala mundial, considerado o mais impactante na região da Gálfcia, local de grande economia pesqueira, além de ter sido responsável por impactar também a costa inglesa (Soriano *et al.*, 2006).

Acidentes anteriores como o encalhamento do navio *Exxon Valdez* em 1989, que levou a um derrame de aproximadamente 257 mil barris de petróleo, demonstram que a ocorrência de HPAs no ambiente aquático pode persistir por mais de dez anos (Irvine *et al.* 2006).

No Brasil, destacam-se o derrame de 1,3 milhões de litros de óleo no ano 2000 e 60mil litros em 2005, ambos na Baía de Guanabara, no Rio de Janeiro (Michel, 2000; Soares-Gomes *et al.*, 2010), e o vazamento de 4 milhões de litros de óleo nos rios Barigüi e Iguaçú, no Paraná em 2000, que afetou uma área de 2,5km² (Silva, *et al.*, 2009), além do derrame de milhões de litros de diversos tipos de óleo devido a explosão do navio Vicuña em Paranaguá, 2004. Estes derramamentos causaram efeitos em diferentes ecossistemas, como os manguezais (Filho, 2006), áreas de transição que funcionam como proteção da costa e berçário para diversos animais.

Recentemente, em 2011, houve o vazamento de petróleo a partir de uma fenda no fundo do mar na costa brasileira. O acidente ocorreu no Campo de Frade, Bacia de Campos, Rio de Janeiro e foi estimado em 381,6mil litros de petróleo liberados na água durante dias (ABBM, 2011).

Embora os derrames de petróleo sejam conhecidos como a principal causa de impactos no sistema costeiro, talvez por causa da expressiva divulgação pelos meios de comunicação, é preciso destacar que alguns desses ecossistemas costeiros recebem continuamente o aporte quase que imperceptível de efluentes e derivados de petróleo oriundos das atividades antrópicas (Lüchmann, 2012).

Como exemplo, Jonhson *et al.* (2008) verificou o incremento de HPAs em Puget Sound, Washington, originários do petróleo e produtos de combustão, por fontes municipais e industriais. De acordo com o mesmo autor e Liang *et al.* (2007), esses fatores ocorreram devido à intensa urbanização e as chuvas que carregam os derivados de óleo e combustíveis dos automóveis para os rios, e destes para o mar.

O petróleo e seus derivados são formados por hidrocarbonetos, que são compostos orgânicos constituídos principalmente por moléculas de hidrogênio e carbono. Em geral, existem três grupos principais de hidrocarbonetos: parafínicos, naftênicos e aromáticos. Dentre o último grupo, são classificados os que apresentam apenas um anel benzênico como monocíclico e os que são formados por dois ou mais anéis, são denominados de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos ou HPAs (Pedrozo *et al.*, 2002). Segundo Sudip *et al.* (2002) os HPAs são os principais constituintes de derivados de petróleo e apresentam elevado risco à biota, devido à sua característica lipofílica podem atravessar as membranas biológicas e atingir a corrente sanguínea.

Os HPAs podem acumular em tecidos adiposos de qualquer organismo, sendo variável em concentração, nível e tempo de exposição (Meador *et al.*, 1995; Pedrozo *et al.*, 2002). São também capazes de passar por vários níveis da cadeia trófica quando se tornam parte da dieta (Driscoll *et al.*, 2010).

Dentre os HPAs, o fenantreno é um importante componente do óleo cru e é classificado como poluente prioritário pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos em função da sua abundância e toxicidade ao ambiente, (USEPA, 1993). Este hidrocarboneto é uma molécula de baixo peso molecular, composto por três anéis benzênicos (Figura 1), característica que pode lhe conferir uma metabolização rápida quando ingerido pelos organismos.

Sua estrutura química também pode ser encontrada em outros HPAs, como benzo[*a*]pireno (Figura 1) e benzo[*a*]antraceno, sendo assim, é considerado um sinal de contaminação ambiental (Moody *et al.*, 2001), pois sua identificação no meio pode indicar a existência de outras substâncias potencialmente tóxicas.

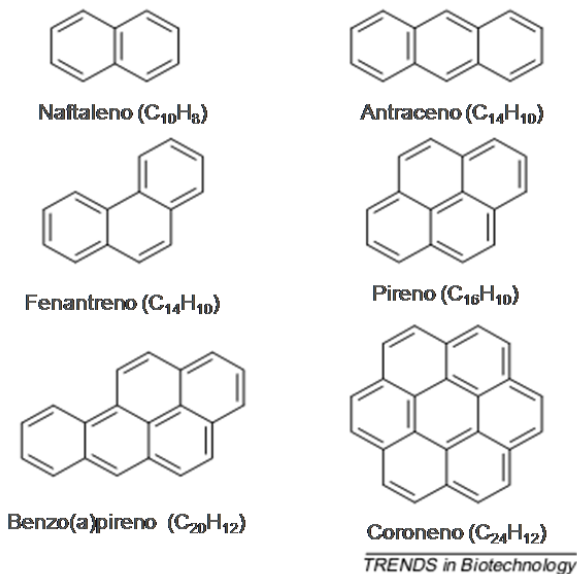


Figura 1. Estrutura dos HPAs abundantes no ambiente. Adaptado de Sudip *et al.* (2002).

Dentre os meios de contaminação por HPAs, destacam-se também a lixiviação de produtos sintetizados a partir de compostos orgânicos contendo fenantreno, notadamente os pesticidas, fungicidas, detergentes, tintas, entre outros (Shennan, 1984).

O fenantreno na água pode interferir no metabolismo normal de peixes, bivalves e algas (Moody *et al.*, 2001; Hannam *et al.*, 2010, Naldi *et al.*, 2010; Lüchmann, 2012), podendo degenerar células do sistema reprodutor de ouriços (Schäfer e Köhler, 2009). Além de ter sido verificado um potencial carcinogênico em humanos, o fenantreno também foi detectado na urina (Jacob e Seidel, 2002), assim como em águas subterrâneas (140µg/L) e águas usadas para o consumo (40 µg/L), segundos dados da CETESB (2005) e de Wu *et al.* (2011), com a possibilidade de ser encontrado com misturas de HPAs em alimentos, especialmente, frutos do mar, como ostras, mexilhões e peixes, pois estes estão em contato direto com o meio aquático.

1.3 O Uso de Indicadores

O conceito de sustentabilidade surgiu na década de 80, como uma alternativa ao uso exploratório dos recursos naturais, degradando e contaminando o meio ambiente, e vem sendo discutido em diversos encontros internacionais. Uma forma de mensurar a sustentabilidade é através de indicadores, que são instrumentos de avaliação e medida do desenvolvimento de um sistema, monitorando seu estado ambiental (Polette, 2004).

A agenda 21 recomenda o “Uso e a Proposição de Indicadores de Sustentabilidade como Ferramentas para Monitoramento da Gestão de Recursos Naturais” como instrumento para agregar dados e informações complexas, facilitando sua compreensão, além de mensurar a qualidade ambiental (Sousa, 2006). As principais características de um bom indicador é sua capacidade de avaliar condições existentes e tendências em escala temporal e local, relacionando a metas e objetivos, a fim de obter informações de advertência (Polette, 2004).

1.4 Ecotoxicologia: Ferramenta de estudo

A ecotoxicologia estuda as transformações e os efeitos de agentes químicos no ambiente. Tais agentes são denominados xenobióticos, que significa “estranho à biota”. Esta área do conhecimento objetiva conhecer a regulação do ecossistema em detalhes e reconhecer as influências antropogênicas sobre o ambiente,

combinando conhecimentos interdisciplinares (Magalhães e Filho, 2008).

Essa área do conhecimento busca conhecer como os compostos químicos agem na função fisiológica das células, órgãos e indivíduos, com exposição aguda ou crônica, podem também ser aplicados para entender os efeitos maléficos destes compostos no ambiente (Foth, 1999).

A fim de conhecer os efeitos de certos contaminantes, a ecotoxicologia realiza testes em laboratório analisando dois tipos de efeitos, agudos e crônicos. Os efeitos agudos promovem resposta rápida nos organismos levando à imobilidade ou morte, geralmente causados por exposição pontual de grandes quantidades de poluentes no meio (Walker *et al.*, 2006), por exemplo, em casos de vazamentos ou derrames de componentes industriais.

Os efeitos crônicos levam a efeitos deletérios no organismo afetando seu crescimento, reprodução e comportamento, em alguns casos são detectadas alterações bioquímicas e moleculares que se persistirem podem comprometer o metabolismo normal do organismo. São causados por exposição em longo prazo do contaminante que pode ser diluído no meio (Walker *et al.*, 2006), como por exemplo, lixiviação de óleos e combustíveis do ambiente urbano, vazamentos de petróleo através de fendas no fundo do mar.

Atualmente, a ecotoxicologia aborda todos os níveis, da molécula ao ecossistema, e traz um conhecimento sobre as respostas dos organismos perante os impactos sobre o ambiente. Isto é representado esquematicamente na Figura 2, na qual o primeiro sinal de exposição de um organismo a um determinado contaminante é detectado a nível molecular até o efeito mais tardio, o ecossistema.

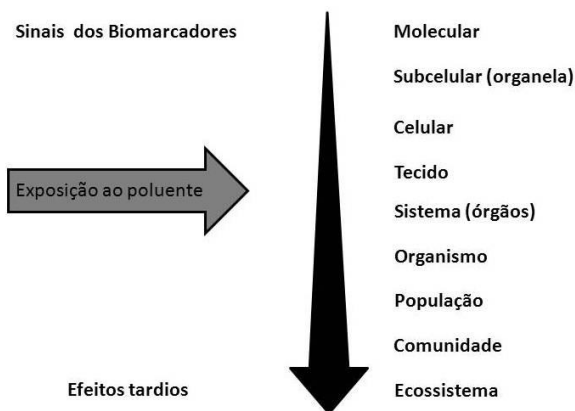


Figura 2. Esquema que representa a ordem de resposta a exposição ao poluente no sistema biológico. Modificado de Bayne *et al.* (1985) *apud* Van Der Oost *et al.* (2003).

As respostas dos biomarcadores moleculares e genotóxicos mostram sinais iniciais de contaminação, sendo assim, são respostas precoces. Considerar somente respostas de população a ecossistema, por exemplo, alterações na mortalidade e baixa taxa de reprodução, seria enxergar apenas os efeitos tardios, que ocorrem, muitas vezes, numa condição de poluição em que é custosa a recuperação do meio (Naldi e Bainy, 2011).

A fim de esclarecer estes conceitos, bioindicadores são organismos que fornecem informações sobre as condições ambientais por sua presença ou ausência (Phillips e Rainbow, 1993), geralmente são sensíveis às alterações ambientais, tem baixa especificidade aos contaminantes e seu período de estudo é longo, sendo pouco preditivo.

Enquanto os biomarcadores são alterações biológicas nos organismos desencadeadas por compostos tóxicos presentes no ambiente, que expressam a exposição e/ou seus efeitos. São usados para representar respostas adaptativas ou sinais de danos aos indivíduos expostos, geralmente reversíveis e precoces, considerada uma ferramenta preventiva.

As alterações biológicas em diferentes escalas, comportamental, tecidual, celular, enzimática e molecular, mostram

níveis de normalidade dos organismos. Os biomarcadores podem ser definidos como indicadores de curto prazo, mas de efeitos biológicos de longo prazo (Cajaraville *et al.*, 2000).

1.5 Monitoramento Ambiental Biológico

A avaliação de Risco Sócio-Ambiental prevê a interdependência da saúde humana e do meio ambiente. A maior preocupação do monitoramento ambiental é estabelecer medidas de avaliação de riscos ecológicos, associados a exposições em diferentes níveis tróficos, populações e comunidades (Chasin e Azevedo, 2003).

No âmbito da legislação ambiental brasileira, as Resoluções CONAMA 357/2005 que dispõe sobre a classificação das águas e o lançamento de efluentes e 393/2007 referente a água produzida em plataforma de petróleo e gás natural prevêem além de ensaios químicos e físicos, ensaios ecotoxicológicos, porém relacionados somente a mortalidade, sucesso reprodutivo ou a presença/ausência de um bioindicador. Deve-se ressaltar que as análises físico-químicas convencionais, além de pontuais, determinam ausência ou presença de um contaminante, mas não fornecem dados sobre o efeito do contaminante na biota, incluindo os seres humanos.

Programas de monitoramento ambiental vêm sendo sugeridos para avaliar a qualidade dos ecossistemas. Grande parte destes estudos visa a identificação dos efeitos biológicos de contaminação, sendo que muitos deles, analisam os efeitos agudos, como mortalidade, já que os crônicos são mais difíceis de serem detectados (USEPA, 1984; OECD, 1992). Além disso, há dificuldade de identificar a contaminação por um determinado químico quando este se apresenta em misturas de compostos, como petróleo e esgoto, e também pela presença de substâncias que podem se agregar com outras e/ou acumular no sedimento, sendo assim, não são detectadas nos ensaios. Tudo isto sugere o uso de biomarcadores como ferramenta para avaliação da qualidade da água (Goulart e Callisto, 2003).

Da mesma forma, agências e institutos como a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (Rhomborg, 1993), o *International Council for the Exploration of the Sea* (ICES, 2004) e o Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia - Toxicologia Aquática (INCT-TA, 2008) recomendam programas de biomonitoramento ambiental utilizando bioindicadores e biomarcadores de contaminação

aquática, com o intuito de alertar e prevenir danos que podem se tornar irreversíveis nos ecossistemas.

Em sistemas aquáticos, os peixes são considerados bons bioindicadores e suas alterações biológicas podem ser utilizadas como biomarcadores, pois podem ser expostos aos contaminantes através de diferentes vias, pelo contato direto com as brânquias, pela absorção dos compostos tóxicos na coluna d'água, pelos seus ovos e larvas e pela ingestão de alimento contaminado (Pedrozo *et al.*, 2002).

Suas brânquias possuem uma variedade de funções fisiológicas, incluindo trocas gasosas, osmorregulação, excreção de nitrogênio e controle do balanço ácido-base. As brânquias são supridas por uma extensa rede arterial e venosa e por ela passa um grande volume de água, o que confere a este tecido um importante local de troca com o meio externo (Erickson *et al.*, 2008) Os peixes também apresentam um papel importante na cadeia trófica, carregando energia da base ao topo do sistema (Van Der Oost *et al.*, 2003; Johnson *et al.*, 2008).

Poecilia vivipara (Bloch e Scheider, 1801), da família Poeciliidae, são peixes eurihalinos de pequeno porte que habitam em regiões de baixios (menos de um metro de profundidade) e ocorrem em toda costa brasileira (Figura 3). São fáceis de coletar, transportar e aclimatar em laboratório (Breden *et al.*, 1999). São também organismos resistentes, frequentemente encontrados em corpos d'água que apresentam contaminação orgânica e inorgânica (Betito, 2006). Ainda, várias espécies desta família são estudadas em termos toxicológicos e comportamentais (Breden *et al.*, 1999), portanto costumam-se em ótimos modelos de estudos ambientais (Mattos, 2010).

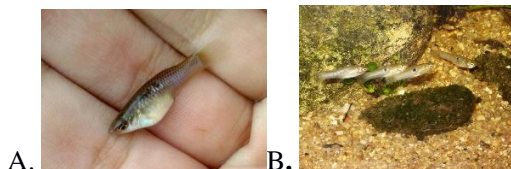


Figura 3. A) Peixe *Poecilia vivipara*. B) Peixe *Poecilia vivipara* em seu hábitat.

1.6 Respostas genotóxicas: Ensaio Cometa

Segundo Martinez e Cólus (2002), respostas genotóxicas específicas são utilizadas como parâmetros para avaliar danos no DNA

causados por poluentes ambientais, como exemplo o Ensaio Cometa ou Eletroforese em Gel de Célula Única, o qual é um teste amplamente usado para detectar danos no DNA em células individualizadas (Kumaravel *et al.*, 2009). Este é um método sensível que possibilita quantificar quebras da fita do DNA a partir de classes de dano definidas. Além disso, possui baixo custo, rapidez, precisão e reprodutibilidade, possibilitando assim, resultados fidedignos. Qualquer tipo celular pode ser avaliado, desde que haja um núcleo, e é necessário um número relativamente pequeno de células por amostra (Di Paolo, 2006).

Neste ensaio, o material genético preparado em lâminas histológicas migra quando submetido à corrente elétrica, deixando fragmentos de DNA em diferentes extensões e dependendo do tamanho das quebras, formam um desenho semelhante a cauda de um cometa (Di Paolo, 2006).

Deste modo, o dano pode ser quantificado em células individuais, permitindo avaliar o potencial genotóxico de amostras ou de condições ambientais alteradas. Recentemente, estudos relatam os procedimentos, vantagens e limitações deste método para análises de genotoxicidade, ecotoxicidade e análises de biomonitoramento aquático (Di Paolo, 2006; Souza e Fontanetti, 2007; Kumaravel *et al.* 2009). Este ensaio vem sendo aplicado em eritrócitos de diversas espécies de peixes, devido à sensibilidade a efeitos adversos que possuem as células sanguíneas destes animais (Pretti *et al.*, 2007; Steckert *et al.*, 2007; Matsumoto *et al.*, 2006). Muitos destes efeitos são oriundos de agrotóxicos, hidrocarbonetos e despejos industriais.

1.7 Respostas moleculares: Biomarcadores relacionados à biotransformação

Em razão do avanço da biologia molecular, é possível detectar alterações nos níveis de transcrição gênica que podem fornecer informações sobre os estressores ambientais e a regulação dos genes. Assim, a ecotoxicologia tenta esclarecer de que maneira a transcrição gênica é regulada através dos estímulos ambientais (Brulle *et al.*, 2008). Segundo Mattos (2010) ao considerar que o primeiro passo da regulação gênica é a transcrição do ácido dextrribonucléico (DNA), a quantificação dos níveis de transcritos em resposta aos contaminantes representa informações sobre o estado do ambiente em que certo animal se encontra.

Alguns contaminantes, principalmente os lipofílicos, bioacumulam nos tecidos dos animais, e podem ser transferidos pela cadeia trófica, chegando ao consumidor de topo, inclusive aos seres humanos. Ao ser bioacumulado, o contaminante deixa de estar disponível no ambiente, tornando difícil a sua detecção por métodos analíticos convencionais, que quantificam componentes em amostras de água ou sedimento (Meniconi, 2007).

Ocasionalmente, um composto estranho à biota pode ser eliminado sem ser alterado. Porém, a maioria deles está sujeita à biotransformação, que são alterações químicas que ocorrem principalmente no fígado, mas podem ocorrer em outros órgãos extra-hepáticos, com a finalidade de tornar os compostos menos tóxicos para o organismo (Harper e Murray, 1994). Este processo nem sempre corresponde a uma detoxificação, pois algumas substâncias podem se transformar em espécies reativas intermediárias, aumentando a atividade biológica do xenobiótico que passa a ser responsável pelos efeitos adversos, como quebras no material genético (Pedrozo *et al.*, 2002). A biotransformação envolve três estágios distintos, reações bioquímicas de Fase I, Fase II e Fase III.

No primeiro momento, ocorre a introdução de um grupamento polar ativo na molécula do composto químico através de reações de oxidação, redução e hidrólise. O sistema enzimático dominante da Fase I é composto por membros de uma classe de enzimas conhecidas como monooxigenases ou componentes do citocromo P450, cujo gene pertencem à família de genes *CYP* (*Citocromo P450*). Essa classe de enzimas é formada por hemoproteínas de membrana do retículo endoplásmico, que podem diferir em suas características apoproteicas e sua especificidade pelos substratos, mas em geral funcionam como enzimas oxidativas (Pedrozo *et al.*, 2002).

Estas enzimas são extremamente importantes, pois estão relacionadas com a biotransformação de substâncias exógenas como fármacos e contaminantes, bem como certos compostos endógenos, tais como os esteróides (Harper e Murray, 1994).

As reações enzimáticas de Fase I podem resultar em inativação ou alteração da toxicidade da substância química. Nesta fase os xenobióticos tornam-se mais hidrofílicos, podendo servir de substratos para as reações de conjugação ou metilação de Fase II (Raposo, 2002).

Neste segundo momento, pode ocorrer a conjugação de compostos exógenos com substratos endógenos, por exemplo, a conjugação de ácido UDP-glicurônico, doador de grupos glicuronil, pela atividade catalítica da enzima uridina difosfato-glicuronil-transferase (UDPGT), presentes tanto no retículo endoplasmático quanto no citosol da célula (Harper e Murray, 1994). Esta enzima tem sua atividade considerada um parâmetro da Fase II para resposta a poluentes, sendo a formação de glicuronídeos a principal via de inativação e excreção de compostos endógenos e exógenos em peixes (Van Der Oost *et al.*, 2003).

Na fase II, também pode ocorrer a conjugação com glutatona endógena (GSH) pela glutatona-S-transferase (GST) uma enzima citosólica pertencente a uma superfamília de genes que transcrevem enzimas diméricas solúveis bastante representativas no tecido hepático. Se os xenobióticos potencialmente tóxicos não fossem conjugados com a GSH, ficariam livres para conjugar com os ácidos nucleicos e as proteínas celulares causando danos (Harper e Murray, 1994).

Outra enzima de fase II responsável pela biotransformação é a metiltransferase (MET) que adiciona grupos metil a outras moléculas. O gene desta enzima foi induzido em peixes *P. vivipara* após exposição à fração de óleo diesel acomodada em água (FAD) por Mattos (2010).

Por fim, as enzimas de Fase III, peptidases, hidrolases e liases, catalizam os metabólitos conjugados, com o objetivo de formar produtos excretáveis (Van der Oost *et al.*, 2003), pois o propósito final das fases da biotransformação é de aumentar hidrossolubilidade (polaridade) do xenobiótico e assim facilitar sua eliminação pela urina ou bile.

A análise quantitativa da transcrição desses genes pode indicar se um organismo foi ou está sendo exposto a um agente tóxico no ambiente. Apesar do fígado ser o principal órgão envolvido na biotransformação, estudos revelam a atividade de enzimas de biotransformação em diversos órgãos de peixes, como nas brânquias, que é um órgão de contato com o meio ambiente e via de entrada de xenobióticos (Van Der Oost *et al.*, 2003; Zanette, 2009).

Técnicas de biologia molecular procuram identificar genes relacionados ao processo de biotransformação em organismos sentinela e também verificar sua transcrição diferencial a fim de padronizar certas famílias de genes que indiquem a contaminação do ambiente por uma classe de contaminante específico (Zanette, 2009; Lüchmann, 2012).

1.8 Quantificação relativa da transcrição de genes através da Reação de Polimerização em Cadeia em Tempo Real (qRT-PCR)

A partir da mensuração da RNA mensageiro (mRNA) pode-se inferir a extensão da transcrição de um gene em particular (Schmittgen e Livak, 2008). Contudo, a detecção do RNAm é difícil, pois trata-se de uma molécula instável (Roth, 2002). A fim de contornar esse problema, o mRNA é transformado em fita de DNA complementar (cDNA) e posteriormente o transcrito de interesse é amplificado por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (Alberts *et al.*, 2004; De Robertis e Hib, 2006).

Com o avanço da tecnologia, a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase Tempo Real (Real Time RT-PCR) constitui-se hoje um dos métodos mais usados para quantificar RNA, porque é um procedimento rápido, possibilita utilizar muitas amostras e os dados são coletados no momento em que o processo ocorre. Além disso, este método é sensível, sendo capaz de detectar a presença de uma única cópia gênica e quantificar sua expressão através da detecção de fluorescência (Bustin *et al.*, 2005; Nolan *et al.*, 2006).

A técnica de PCR em tempo real utiliza diferentes estratégias para detectar a amplificação de cDNA, em uma delas é usado um corante repórter “não-específico” fluorescente que combina a amplificação e a detecção dos passos da reação de PCR, o sinal fluorescente detectado é proporcional a quantidade de DNA produzido em cada ciclo da reação, pois este corante, ao intercalar a fita dupla de DNA em formação, emite um sinal que é detectado fluorimetricamente. Enquanto na PCR tradicional os produtos precisam ser analisados posteriormente num gel de eletroforese (Nolan *et al.*, 2006).

Há duas maneiras de quantificar a transcrição gênica através do RT-PCR, a quantificação absoluta e quantificação relativa. A primeira determina número exato de cópias do transcrito de interesse, quando é conhecido o número de cópias inicial, por exemplo, através da clonagem de um fragmento. Outra forma é quantificar a transcrição do gene comparando o grupo exposto com o grupo tratado ou alvo. Esse modo de quantificação necessita de um gene normalizador, que serve para corrigir as diferenças na extração do RNA, transcrição da amostra e erros técnicos na preparação das reações de PCR (Wong e Medrano, 2005; Schmittgen e Livak, 2008). Em termos gerais, a partir da normalização dos dados do PCR quantitativo são feitas análises

estatísticas para verificar se houve ou não diferença na expressão relativa entre os tratamentos.

De acordo com o exposto, essa técnica pode demonstrar se há alguma alteração na transcrição de genes envolvidos na biotransformação em relação ao um grupo controle, o qual não é exposto ao contaminante de interesse. Ao mesmo tempo, se essas alterações podem ter efeito biológico no DNA.

2 Objetivos

Este trabalho teve como objetivo analisar respostas moleculares e genotóxicas em peixes *Poecilia vivipara* expostos a diferentes concentrações de fenantreno por 24 horas.

2.1 Objetivos específicos

- a) analisar quantitativamente a transcrição dos genes do *Citocromo P450 (CYP1A)*, da *Glutathione-S-transferase (GST)*, *Uridina difosfato glicorunil-transferase (UDPGT1B)* e *Metiltransferase (MET)* na brânquia e no fígado dos peixes, além de duas outras isoformas do *Citocromo P450 (CYP1B e CYP1C)* no fígado de peixes;
- b) analisar danos causados no DNA através do Ensaio Cometa em amostras de sangue de peixes *P. vivipara* expostos a diferentes concentrações de fenantreno;
- c) relacionar as alterações moleculares e genotóxicas com os níveis de exposição a fenantreno.

3 Materiais e Métodos

3.1 Coleta e aclimação dos peixes *Poecilia vivipara*

A coleta dos peixes *Poecilia vivipara* foi realizada no Laboratório de Piscicultura Marinha, do Departamento de Aquicultura, localizado na Barra da Lagoa, Florianópolis – SC, onde esta espécie é fauna acompanhante dos peixes de cultivo. Uma armadilha (Minnowtrap™) foi utilizada contendo ração para atrair os animais. Após a coleta, os peixes foram transportados para o Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica (LABCAI), do Núcleo de Estudos em Patologia Aquícola para serem aclimatados.

O total dos peixes foram divididos em aquários de 30 litros de água na salinidade de 24, com aeração constante, fotoperíodo de 12:12 horas e temperatura regular entre 20-24°C. A limpeza e renovação de 50% da água foram realizadas diariamente, assim como a alimentação com ração comercial para aquarofilia. Neste período, artêmias foram eclodidas em dois momentos para reforçar a alimentação dos peixes que poderiam ter ficado imunodeprimidos devido ao estresse da coleta e transporte. Todo o procedimento para coleta, transporte e aclimação teve duração de duas semanas e seguiu o protocolo CEUA PP00266, juntamente com a autorização do IBAMA.

3.2 Preparação da solução de fenantreno

O fenantreno (Sigma-Aldrich Lot: 537908-347) foi diluído em dimetilsulfóxido (DMSO) a 1mg/ml, com uma concentração final de DMSO 0,01% conforme proposto por Torre *et al.* (2008) e Hannam *et al.* (2010). A partir desta diluição, três soluções estoques foram preparadas nas concentrações de 100mg/L, 200mg/L e 2g/L de fenantreno em água a 24 de salinidade. De cada estoque foi retirado 3ml para ser adicionado em cada aquário de 30L de água. Portanto cada aquário continha a concentração nominal de fenantreno na água de 10, 20 e 200µg/L respectivamente.

3.3 Exposição dos peixes *Poecilia vivipara* ao fenantreno

Na sala de bioensaios do LABCAI/UFSC, um total de 60 animais foi distribuído em quatro aquários de vidro com 30 litros de água na salinidade de 24. Cada aquário continha 15 indivíduos, numa densidade de um peixe para cada dois litros, sendo tratamentos controle e concentrações de 10µg/L, 20µg/L e 200 µg/L de fenantreno na água no tempo zero e assim permaneceram por 24 horas. Essas concentrações

foram previamente definidas pelo Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia – Toxicologia Aquática (INCT-TA) baseando em concentrações encontradas no meio ambiente. Por exemplo em águas subterrâneas (140µg/L) (CETESB, 2005) e em águas para consumo (40µg/L) (Wu *et al.*, 2011). De acordo com a Organização Mundial de Saúde, doses acima de 50µg/L são consideradas como contaminação ambiental (WHO, 1997).

Durante a exposição os peixes permaneceram em jejum. A fim de evitar a evaporação do fenantreno e a possível reação deste composto com o plástico das mangueiras, foi utilizada uma pipeta de vidro para a aeração da água no lugar da mangueira de plástico com a pedra porosa. Os aquários foram tampados e vedados durante a exposição para evitar eventual volatilização e contaminação no ambiente pelo composto. Cada aquário continha um termômetro de vidro para verificar a temperatura da água que permaneceu entre 20 e 24°C.

A sala de bioensaio permaneceu durante todo o tempo de exposição com as luzes apagadas e teve as janelas tampadas para evitar a entrada de luz externa, a fim de evitar a possível degradação fotoquímica do fenantreno, principalmente pela luz solar (Bruyn *et al.*, 2012).

3.4 Construção da curva padrão de fenantreno

Os comprimentos de onda de excitação e emissão ideais do fenantreno foram previamente determinados no LABCAI, utilizando o espectrofluorímetro Spectramax 250 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA). Foi fixado o comprimento de onda de excitação em 250nm e verificou-se um pico de emissão a 360nm, portanto o par 250/360 (excitação/emissão) foi escolhido para determinação do fenantreno em água do mar durante a exposição de animais.

A curva padrão para o fenantreno foi preparada com o objetivo de monitorar os níveis deste composto ao longo do experimento. A partir de uma solução em água com salinidade 24 e de fenantreno em DMSO (0,01%) na concentração de 500µg/L, foram definidas as seguintes concentrações para a preparação de uma curva padrão nas seguintes concentrações (500µg/L; 250µg/L; 125µg/L; 62,5µg/L; 31,15µg/L; 15,625µg/L; 7,8125µg/L e branco) para a quantificação de fenantreno nos aquários de exposição.

3.5 Análise do fenantreno na água dos aquários

Ao longo da exposição foram realizadas análises da água dos aquários para monitorar os níveis de fenantreno durante as primeiras 10 horas de exposição. O ensaio foi realizado em triplicata na microplaca, com volume final de 200µl, no espectrofluorímetro Spectramax 250 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA). Os níveis de fenantreno na água foram calculados a partir da curva padrão (item 3.4).

Um conjunto de aquários nas mesmas condições experimentais sem a adição de peixes foi preparado em paralelo, a fim de avaliar o desaparecimento de fenantreno na água, independente da bioacumulação e biotransformação realizada pelos peixes.

3.6 Preparação das amostras de tecido

Após o período de exposição, os peixes foram mortos por uma incisão na coluna vertebral com um corte do cordão nervoso para evitar dor e em seguida foram medidos e pesados. Não foi realizada a distinção de sexo dos animais. O fígado e as brânquias foram retirados com material cirúrgico devidamente esterilizado e limpos com água destilada e etanol (100%). Os tecidos foram armazenados em *eppendorfs* contendo RNA *later* (SIGMA) para preservação do RNA na relação 1:5 tecido: RNA *later*, de acordo com o fabricante.

Para a realização do ensaio do cometa, amostras de sangue de *P. vivipara* foram coletadas a partir do corte na cervical com uma seringa que continha como veículo 70µL de soro fetal bovino.

3.7 Ensaio Cometa

O ensaio do cometa foi realizado em amostras de sangue de cada indivíduo em duplicata, totalizando 15 indivíduos por tratamento (controle e exposição 10, 20 e 200µg/L de fenantreno). Algumas células do grupo controle (positivo) são preparadas numa solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), são incluídas na corrida de eletroforese e posteriormente são analisadas e utilizadas como controle positivo dos resultados (Kumaravel *et al.*, 2009).

3.7.1 Preparação das lâminas pré-cobertas com agarose

A agarose normal foi preparada a 1,5% com tampão fosfato-salino – PBS - (NaCl 137mM, KCl 2,7mM, Na₂HPO₂ 10mM, KH₂PO₄ 2mM, pH 7,4) dissolvida no microondas e deixada em banho Maria a 60°C.

Lâminas de microscópio previamente limpas foram mergulhadas na agarose, limpas com papel toalha na superfície inferior e deixadas secar em temperatura ambiente por 24 horas antes do uso.

Os procedimentos seguintes foram realizados usando a luz vermelha devido à fotossensibilidade dos reagentes e para impedir também maiores danos às células.

3.7.2 Preparação e aplicação das amostras na lâmina

Dez microlitros do sangue diluído em soro fetal bovino foram adicionados a 50 μ L de PBS e desta solução foram adicionados 20 μ L em 180 μ L de agarose de baixo ponto de fusão 0,7%, totalizando 200 μ L para cada indivíduo. Este total foi dividido em duas lâminas, pipetando 100 μ L em cada lâmina pré-coberta com agarose (item 3.7.1) sendo estas imediatamente cobertas com lamínulas. As lâminas foram colocadas na geladeira por 10 minutos para que a agarose se solidificasse.

3.7.3 Lise celular e desnaturação do DNA

As lamínulas foram retiradas e as lâminas posicionadas cuidadosamente em cubetas envoltas em papel alumínio contendo solução de lise com sais (NaCl 2,8M, EDTA 100mM, Tris base 10mM, DMSO 10%, Triton X-100 1%, pH 10) e detergente (n-Lauroil Sarcosinato 1%), em quantidade suficiente para cobrir as lâminas, a temperatura de 4°C. O período de lise foi de duas horas.

Após a lise celular, as lâminas foram retiradas cuidadosamente da solução de lise e colocadas na cuba de eletroforese aleatoriamente e levadas a geladeira. Uma lâmina de cada duplicata foi colocada em uma eletroforese distinta, sendo cobertas com solução alcalina de NaOH (300mM), EDTA (1mM) e água destilada (pH final >13) e deixadas por 20 minutos para desnaturar o DNA.

3.7.4 Eletroforese

Após a desnaturação a corrente foi mantida para 25V e 300mA, sendo a amperagem acertada com a adição ou remoção do tampão de corrida. O tempo total de eletroforese foi de 25 minutos, realizada dentro de geladeira a 4°C.

3.7.5 Neutralização, fixação e coloração

As lâminas foram lavadas três vezes com tampão neutralizador (Tris 0.4M, pH 7.5) após a eletroforese, por cinco minutos

cada vez. Depois, foram lavadas três vezes com água destilada. A secagem das lâminas ocorreu em estufa a 37°C.

Para fixação, as lâminas foram colocadas novamente em cubetas, com o cuidado de estarem uma oposta a outra e foi acrescentada solução fixadora (ácido tricloroacético 15%, sulfato de zinco heptahidratado 5%, glicerol 5%) As lâminas permaneceram por 10 minutos e depois foram lavadas três vezes com água destilada e secas em estufa a 37°C por duas horas.

As lâminas foram previamente reidratadas por cinco minutos com água destilada em cubas de coloração. Após descartar a água, foram acrescentadas simultaneamente as soluções de coloração:

Solução A: 25g de carbonato de sódio (Na_2CO_3) dissolvido em 500 ml de H₂O

Solução B: nitrato de amônio (NH_4NO_3) 0,1%, nitrato de prata (AgNO_3) 0,1%, ácido tungstosilicico 0,25% e formaldeído 0,15%.

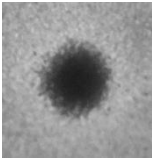
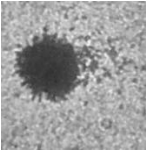
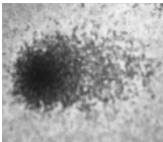

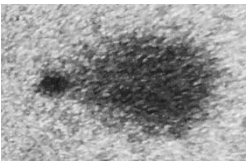
As cubetas estavam envoltas em papel alumínio e todo procedimento foi feito com luz vermelha. Estas permaneceram em agitação moderada (100rpm) a 37°C por 35 minutos.

Após a coloração, as lâminas foram lavadas três vezes com água destilada e a solução de parada (ácido acético glacial 1% dissolvido em água destilada) foi então acrescentada e permaneceu nas cubetas por cinco minutos antes de serem lavadas novamente. Por fim, as lâminas foram secas à temperatura ambiente e foram avaliadas em microscópio óptico para análise dos danos.

3.7.6 Leitura das lâminas

Em microscópio óptico foram lidas 100 células por indivíduo, sendo 50 células em cada lâmina, ou 100 células em uma lâmina, no caso da outra estar ilegível. A fim de quantificar o dano, existem quatro classes padrões de dano de acordo com a tabela 1:

Tabela 1: Classes de dano de acordo com a relação cabeça/cauda do DNA de células observadas de *P. vivipara*. Adaptado de Di Paolo (2006).

Célula observada	Relação cabeça/cauda	Classe de dano
	Sem cauda	0
	Pouca cauda	1
	Cabeça maior que a cauda	2
	Cauda com quase a mesma quantidade de DNA que a cabeça	3
	Bem mais DNA na cauda que na cabeça, que se encontra diminuída	4

Para calcular o índice de danos (ID) de cada grupo, o número de células encontradas para cada classe de dano (dentre as 100 células analisadas) foi multiplicado por cada classe de dano, que varia de zero a quatro, e por fim, foram somados. O valor do ID pode então variar de zero (nenhuma célula sofreu dano) até 400 (todas as 100 células analisadas apresentaram dano de classe quatro), conforme o cálculo:

$$\text{ID total} = 0.(\text{n}^\circ \text{ Classe } 0) + 1.(\text{n}^\circ \text{ Classe } 1) + 2.(\text{n}^\circ \text{ Classe } 2) + 3.(\text{n}^\circ \text{ Classe } 3) + 4.(\text{n}^\circ \text{ Classe } 4)$$

No entanto, a frequência de danos (FD) representa o número de células que apresentaram dano de qualquer classe, dentre o total de células analisadas, e é representado em percentual, conforme o cálculo:

$$\text{FD} = [(\text{n}^\circ \text{ total} - \text{n}^\circ \text{ Classe } 0).100 / \text{n}^\circ \text{ total de células}]$$

3.8 Procedimentos para quantificação relativa de transcritos

3.8.1 Extração de RNA total

O RNA total dos tecidos fígado e brânquia dos grupos controle e exposto foi extraído utilizando-se o protocolo de extração de RNA com TRIzol Invitrogen®, nome comercial do composto de tiocianato de guanidina-fenol-clorofórmio. O tiocianato de guanidina, além de desnaturante de proteínas, foi usado para inativar RNAses endógenas no isolamento do RNA. O protocolo seguiu com uma modificação, respeitando as quantidades de reagentes sugeridas pelo fabricante e os tempos de incubação (Invitrogen, 2010). Na primeira etapa foram realizadas duas homogeneizações com TRIzol e clorofórmio, no lugar de apenas uma como sugere o protocolo.

Cada tratamento teve 15 indivíduos que foram divididos em 5 *pools* de 3 indivíduos cada (n=5) para as extrações, a fim de obter RNA total suficiente para preparação de DNA complementar (cDNA) para reações de RT-PCR quantitativo.

A concentração e pureza do RNA total foram medidas no espectrofotômetro Nanodrop (ThermoScientific) nas absorvâncias 260nm, 260/280nm e 260/230nm.

3.8.2 Preparação do cDNA para RT-PCR quantitativo

A técnica utilizada no presente estudo foi o RT-PCR de duas etapas, e a primeira destas é a transcrição reversa. Portanto, o RNA foi previamente extraído (item 3.8.1) e os cDNAs foram posteriormente sintetizados a partir de 1µg de RNA utilizando o *Quantitec Reverse*

Transcriptase kit (QIAGEN) que combina duas reações: a eliminação do DNA genômico e a transcrição reversa das fitas de RNA de acordo com o protocolo do fabricante. O DNA genômico pode interferir nas reações de PCR, dando ruídos de fundo e falsos positivos, portanto a sua eliminação ocorre antes da transcrição reversa, utilizando um tampão do próprio *kit* livre de RNase.

Com a utilização do NanoDrop (ThermoScientific), verificou-se a concentração e a pureza do cDNA nas absorvâncias 260nm, 260/280nm e 260/230nm.

3.8.3 Quantificação relativa em Tempo Real da Reação de Polimerase em Cadeia (qRT-PCR)

A partir da técnica de Hibridização Subtrativa Supressiva (SSH), Mattos (2010) obteve uma biblioteca com a transcrição de genes relacionados à exposição de *P. vivipara* à fração de óleo diesel acomodada em água (FAD). Iniciadores específicos (*primers*) foram desenhados por Mattos (2010) através do programa PrimerQuest (Integrated DNA Technology) para PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR).

Os iniciadores selecionados para este trabalho encontram-se na tabela 2, são estes: *Citocromo P450 (CYP1A)*, *Uridina difosfato glicoronosiltransferase 1B (UDPGT1B)*, *Glutationa S-transferase (GST)*, *Metiltransferase (MET)* e β - *Actina*, os iniciadores degenerados das isoformas de Citocromo P450 (*CYP1B* e *CYP1C*) e os iniciadores para o gene codificante da proteína ribossomal 40S de eucariotos.

Tabela 2: Sequências de iniciadores senso (F) e anti-senso (R) dos genes de *Poecilia vivipara*: citocromo P4501A (CYP1A), citocromo P4501B (CYP1B), citocromo P4501C (CYP1C), Uridina difosfato glicuronil-transferase 1B (UDPGT1B), Glutathione S-transferase (GST), Metiltransferase (MET), β - Actina e proteína ribossomal 40S (40S) usados nas reações de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR).

Gene	Iniciador	Sequência
CYP1A*	F	ACACAAACGCTGCTACCTGGGAGT
	R	CACAGTCAACACAGGCCACCTCAGA
CYP1B**	F	CCBGGGAGCATGCTGGACGTG
	R	TTGGACAGCTCCTCDDCRATGCA
CYP1C**	F	CAGCTGGGYCAGATGCCTCAC
	R	TCTGTCCTCSACWGACGGCAGYCG
UDPGT1B*	F	TCAACAGGCTGCTTTCAGGCACCA
	R	AAGGTGCTGGTTATGCCCGTGGATG
GST*	F	AACATCACCTGAACGAGTCCTACGGC
	R	GGTGTGAGCTTGTTCCTTGGCCCT
MET*	F	ATCCACATCGCCTGCAACAACGCT
	R	CCAGCCACCTGACAGCACATGAACA
β - Actina*	F	AAAGCCAACAGGGAGAAGATGACCCA
	R	TGACACCGTCTCCAGAGTCCATCACAAT
40S***	F	CTTCACTGGGAATGTCTCTATCCGTG
	R	GCACTCTCCAACAGTCACAATGTCTCCAAC

* desenhados por Mattos (2010); **desenhados por Zanette (2009);

***desenhados por Piazza (dados ainda não publicados).

O gene da β -actina é considerado como um clássico gene de controle interno (Pfaffl *et al.*, 2004; Huggett *et al.*, 2005; Wong e Medrano, 2005), com a proposta de normalizar as amostras para análise da quantificação relativa por qRT-PCR. Iniciadores para o gene codificante da proteína ribossomal 40S de eucariotos também foram utilizados como possíveis normalizadores e são recomendados por Schmittgen e Zakrajsek (2000).

As reações de qRT-PCR foram realizadas com *pool* de cDNA (n=5) de cada tratamento usando o kit *Sybr Green Quantifast* qRT-PCR (QIAGEN) de acordo com as instruções do fabricante. A concentração dos iniciadores usada para cada reação foi de 300nM para todos os genes, exceto para a β -actina e 40s que foram de 400nM e 100nM,

respectivamente. Essas concentrações foram adotadas a partir de testes preliminares, considerando a bibliografia dos autores, e assim, foram escolhidas as concentrações que teriam a menor formação de produtos inespecíficos.

Os ensaios foram feitos em duplicata no aparelho *Rotor Gene 6000* (Corbett Lifesciences) com o anel de 72 poços da QIAGEN. Os programas de ciclagem de cada gene iniciaram com a ativação da enzima DNA polimerase a 95°C por cinco minutos, em seguida, 40 ciclos de 10 segundos de desnaturação a 95°C. O anelamento e a extensão são combinados, ambos a 60°C por 30 segundos, o fabricante recomenda o uso desta temperatura mesmo que a temperatura ideal específica de cada par de iniciador seja diferente desse valor.

Na fase de extensão, o corante fluorescente *SybrGreen* (SYBR[®]) intercala com a dupla fita de DNA e emite fluorescência detectada pelo aparelho pelo comprimento de onda entre 494nm/521nm (excitação/emissão).

Posteriormente a curva de dissociação foi obtida através do aumento de 1°C a cada 5 segundos, partindo de 50°C e terminando a 99°C, para verificar a formação de dímeros de iniciadores ou produtos não específicos, pois a reação pode ter interferência por ruídos de fundo, como conjugação de iniciadores entre outros reagentes que podem ser encontrados na amostra.

O método utilizado para analisar a quantificação relativa em qPCR foi o método Ct comparativo ou $\Delta\Delta Ct$, o qual levou em conta a diferença da quantificação de um gene de controle interno, gene normalizador, relativa ao grupo referência ou controle não tratado (Livak e Schmittgen, 2001).

3.8.4 Análise da transcrição relativa e o método comparativo $\Delta\Delta Ct$

A cada ensaio de PCR, foi feita uma curva padrão com um *pool* de cDNA de todos os grupos do ensaio e do mesmo tecido com diluições seriadas de 800ng a 50ng por reação. A eficiência da reação foi obtida através da inclinação da reta, esta deve ser igual a 1, ou seja 100%, demonstrando que ocorreu a duplicação do fragmento a cada ciclo (Livak e Schmittgen, 2001). Sendo o valor de R^2 igual a 1,0 indica que a reação se mantém com eficiência semelhante em cada concentração de cDNA da curva. As eficiências de amplificação dos genes nas reações devem ser iguais ou muito próximas para que o

método seja válido. A transcrição dos genes *β-actina* e *40s* foram escolhidas como possíveis normalizadores dos dados.

Para calcular o ΔCt , o Ct do gene constitutivo foi subtraído do gene alvo em cada amostra, conforme a seguinte equação:

$$\Delta Ct = (Ct_{\text{alvo}} - Ct_{\text{constitutivo}})$$

A média do ΔCt do grupo controle foi utilizado como calibrador para obter o $\Delta\Delta Ct$, o qual é a relação entre amostras tratadas e controle, conforme a equação:

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{alvo}} - Ct_{\text{constitutivo}})^{\text{Tratado}} - (Ct_{\text{alvo}} - Ct_{\text{constitutivo}})^{\text{Controle}}$$

Os dados estão apresentados pela alteração na transcrição gênica normalizada pelo gene endógeno de referência (constitutivo), relativo ao tratamento controle.

Para cada amostra foram utilizados os dados de $\Delta\Delta Ct$ como expoente negativo na base dois ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), pois em reações com 100% de eficiência considera-se que os fragmentos duplicaram a cada ciclo.

4 Análise estatística

4.1 Ensaio Cometa

Os dados referentes ao Ensaio Cometa foram tabulados em planilhas do programa Excel (Microsoft). A análise estatística foi conduzida por meio do teste paramétrico de uma via ANOVA e os gráficos foram feitos no programa GraphPad Prism 5.0. O teste de comparações múltiplas de Dunnett foi empregado, pois este confronta os tratamentos com o controle, procurando diferenças significativas ($p < 0,05$). Os resultados foram apresentados na forma de média e desvio padrão.

4.2 Quantificação relativa da transcrição de genes

Primeiramente, as análises para a escolha do gene constitutivo foram feitas utilizando o valor de ΔCt dos genes β -Actina e 40S de cada amostra como um expoente negativo de base 2, confrontando os grupos expostos com o tratamento controle. Posteriormente, os Cts de cada gene alvo foram submetidos ao método comparativo $2^{-\Delta\Delta Ct}$. A média e desvio padrão foram calculados para realizar o teste de Grubbs a fim de detectar os valores *outliers*.

As análises estatísticas foram feitas no programa GraphPad Prism 5. Para verificar se o teste empregado poderia ser paramétrico ou não-paramétrico utilizaram-se, portanto, os testes de Pearson e D'Agostino e Shapiro-Wilk para verificar a normalidade dos dados e de Barlett para verificar a homocedacidade das variâncias. Foi verificado através do programa que estes testes não poderiam ser tratados como paramétricos, pois o número amostral é muito pequeno. Sendo Assim, foi empregado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis comparando todos os tratamentos entre si. As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$. Todos os resultados estão apresentados na forma de média e desvio padrão.

5 Resultados

A tabela 3 mostra os dados biométricos dos animais utilizados neste experimento.

Tabela 3: Médias das medidas de peso e comprimento dos indivíduos de *Poecilia vivipara* por grupo de tratamento apresentadas com desvio padrão (DP).

	Peso (g)	Comprimento (cm)
Tratamento Controle	0,97 ± 0,35	3,98 ± 0,56
Tratamento 10µg/L	1,01 ± 0,33	3,97 ± 0,52
Tratamento 20µg/L	1,09 ± 0,42	3,97 ± 0,53
Tratamento 200µg/L	0,99 ± 0,31	3,97 ± 0,49

Os valores referentes a pureza do RNA e do cDNA estão representados nas tabelas 4 e 5, respectivamente, de acordo com o tecido analisado. Ambos foram medidos em espectrofotômetro com os pares 260/280 e 260/230.

Tabela 4: Valores referentes a pureza do RNA no fígado e brânquia de *P. vivipara*.

RNA	Fígado	Brânquia
260/280	1,86-1,93	1,84-1,98
260/230	1,40-1,84	1,79-2,20

Tabela 5: Valores referentes a pureza do cDNA no fígado e brânquia de *P. vivipara*.

cDNA	Fígado	Brânquia
260/280	1,71-1,77	1,76-1,80
260/230	1,74-2,12	2,04-2,22

Neste trabalho, as reações de PCR tiveram os valores de eficiência entre 99 e 106%, como demonstrado para os diferentes genes na tabela 6:

Tabela 6: Eficiência de cada reação de qRT-PCR para os tecidos fígado e brânquia em relação aos diferentes genes apresentados neste trabalho.

Gene	Eficiência da reação (%)	
	Fígado	Brânquia
<i>CYP 1A</i>	99	100
<i>CYP1B</i>	99	-
<i>CYP1C</i>	95	-
<i>UDPGT1B</i>	102	100
<i>GST</i>	100	103
<i>MET</i>	101	100
<i>β- Actina</i>	106	103
<i>40S</i>	103	100

5.1 Análise do fenantreno na água dos aquários

As figuras 4, 5 e 6 mostram os níveis de fenantreno na água dos aquários com e sem peixes nas concentrações de 10, 20 e 200 $\mu\text{g/L}$, respectivamente, medidos em espectrofluorímetro. Estas figuras possuem um padrão semelhante para a concentração de fenantreno na água dos aquários. Os aquários que possuíam peixes apresentaram uma maior diminuição dos níveis de fenantreno ao longo do tempo em relação aos aquários sem peixes.

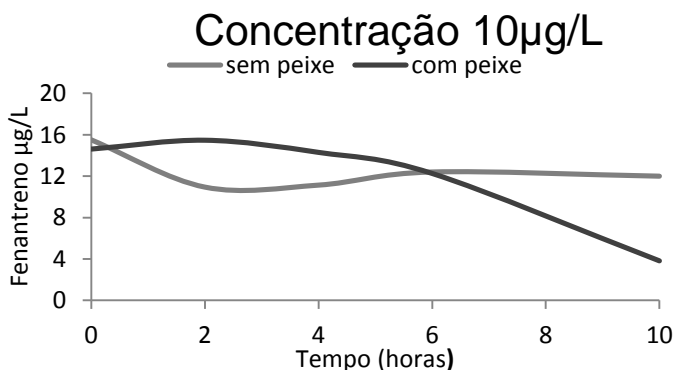


Figura 4. Níveis de fenantreno durante exposição nos aquários com e sem peixes, ambos tratados com 10 $\mu\text{g/L}$ de fenantreno no tempo inicial.

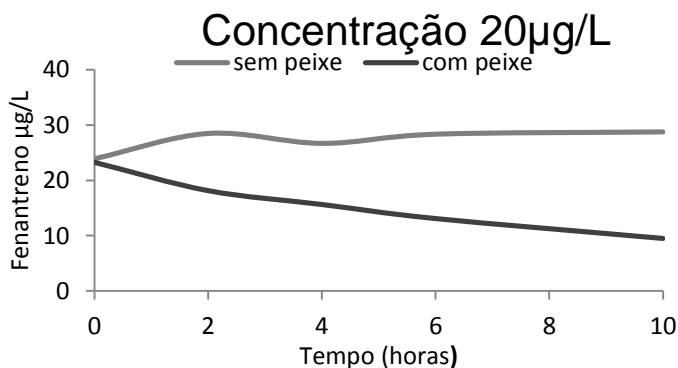


Figura 5. Níveis de fenantreno durante exposição nos aquários com e sem peixes, ambos tratados com 20 $\mu\text{g/L}$ de fenantreno no tempo inicial.

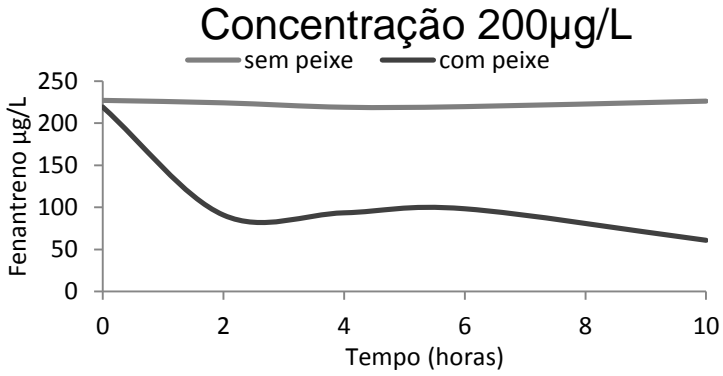


Figura 6. Níveis de fenantreno durante exposição nos aquários com e sem peixes, ambos tratados com 200µg/L de fenantreno no tempo inicial.

5.2 Ensaio Cometa

A Figura 7 mostra a análise do dano em eritrócitos de *P. vivipara* expostos as diferentes concentrações de fenantreno (10, 20 e 200µg/L) em água, assim como os controles negativo e positivo. Os índices de dano foram altos, perto do índice máximo (ID máx.= 400), e estes foram próximos entre os grupos, porém, apresentaram diferença significativa em relação ao controle.

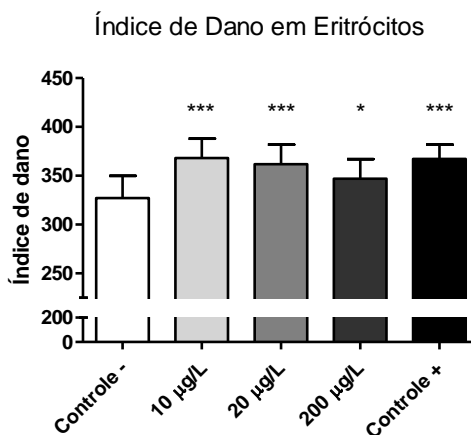


Figura 7. Análise do dano em eritrócitos de *P. vivipara* através do Ensaio Cometa. Tratamentos Controle Negativo (Controle -), Fenantreno (10, 20 e 200µg/L) e Controle Positivo (Controle +). Média controle negativo = 327,1 e DP = 22,93; Média 10µg/L = 368,2 e DP = 19,82; Média 20µg/L = 361,7 e DP = 20,22; Média 200µg/L = 367,2 e DP = 20,07; Média controle positivo = 367,2 e DP = 14,59. *p<0,05; ***p<0,001.

As frequências de dano também foram altas e próximas entre si, porém, foram estatisticamente diferentes em relação ao controle (Figura 8).

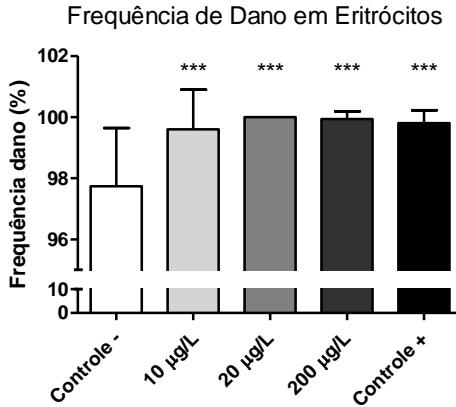


Figura 8. Análise da frequência de dano em eritrócitos de *P. vivipara* através do Ensaio Cometa. Tratamentos Controle Negativo (Controle -), Fenantreno (10, 20 e 200µg/L) e Controle Positivo (Controle +). Média controle negativo = 97,7 e DP = 1,97; Média 10µg/L = 99,60 e DP = 1,30; Média 20µg/L = 100 e DP = 0; Média 200µg/L = 99,93 e DP = 0,26; Média controle positivo = 99,80 e DP = 0,42. ***p<0,001.

5.3 Análise da transcrição gênica

O gene constitutivo que apresentou a maior homogeneidade entre os grupos, tanto na brânquia, como no fígado, foi o gene codificante da proteína ribossomal 40S, e, portanto foi utilizado como gene normalizador dos resultados de transcrição dos diferentes genes avaliados. A figura 9 mostra os níveis de transcrição do mRNA para β -Actina (9A-B) e 40S (9C-D).

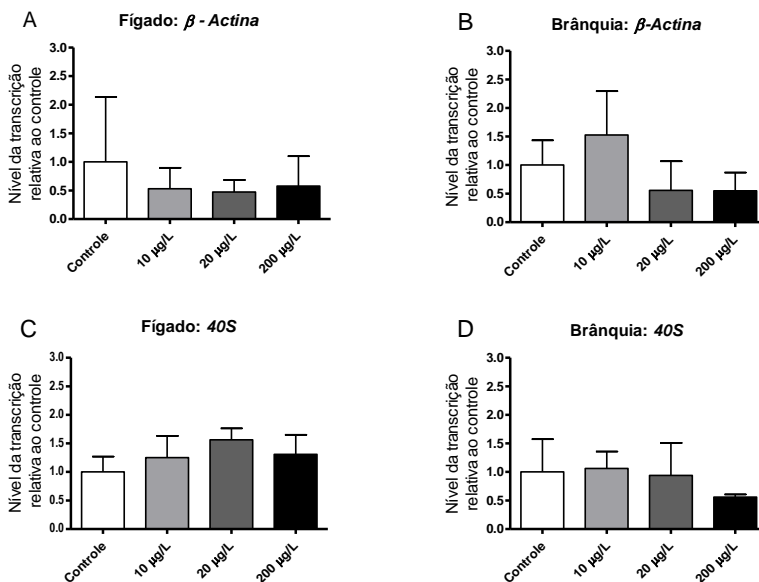


Figura 9. Nível da transcrição gênica de β -Actina e 40S para os tratamentos controle, 10 µg/L, 20 µg/L e 200 µg/L de fenantreno no fígado e na brânquia de *Poecilia vivipara* ($p < 0,05$).

5.3.1 Fígado

As amostras de fígado dos animais expostos à maior concentração de fenantreno (200 µg/L) apresentaram valores significativamente maiores de transcrição de *CYP1A* do que aqueles dos animais expostos às duas menores concentrações (10 µg/L e 20 µg/L), mas não diferiram do grupo controle, apesar de terem sido em média 2 vezes maior (Figura 10A).

Nenhuma alteração na transcrição das isoformas *CYP1B* e *CYP1C*, bem como de *MET* e *GST* foi observada no fígado dos peixes expostos a diferentes concentrações de fenantreno (Figuras 10B-10E).

A transcrição do *UDPGT1B* foi significativamente maior nos animais expostos à concentração de 200 µg/L de fenantreno, quando comparado com o grupo exposto a 20 µg/L de fenantreno (Figura 10F).

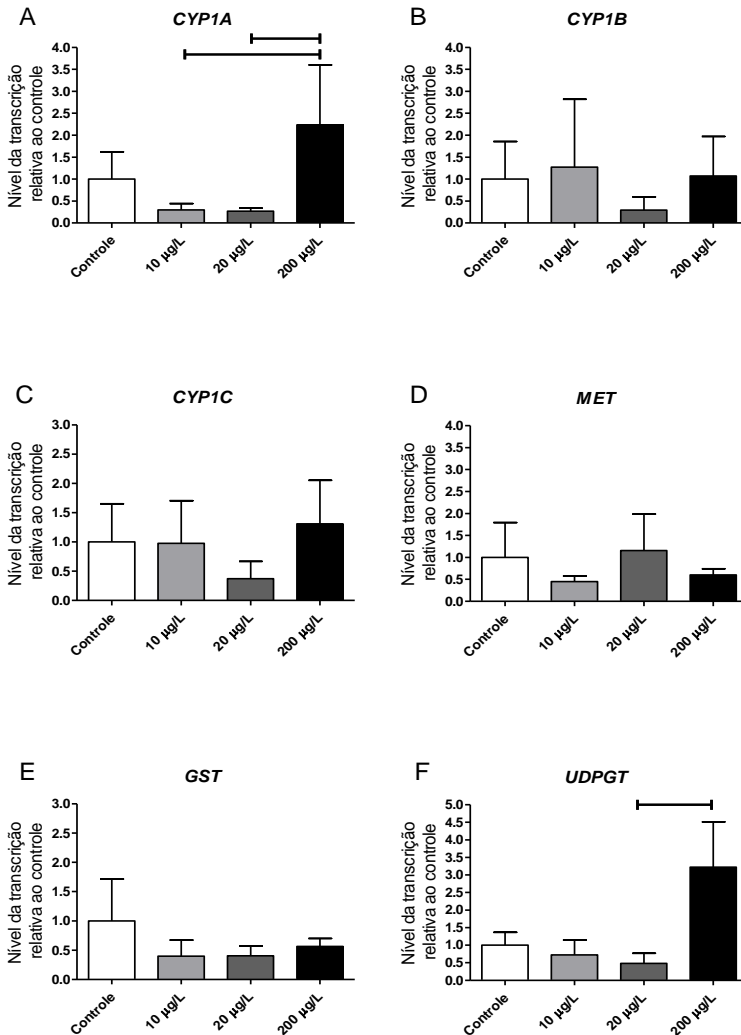


Figura 10. Nível da transcrição relativa em qRT-PCR para os genes *CYP1A*, *CYP1B*, *CYP1C*, *MET*, *GST* e *UDPGT1B* no fígado de *Poecilia vivipara* expostos a 10µg/L, 20 µg/L e 200 µg/L de fenantreno na água e controle durante 24 horas. A) Citocromo P450 (*CYP1A*). B) Citocromo P450 (*CYP1B*). C) Citocromo P450 (*CYP1C*). D) Metiltransferase (*MET*). E) Glutathione-S-transferase (*GST*) e F) Uridina difosfato glicuronil-transferase (*UDPGT1B*). A barra horizontal corresponde p<0,05.

5.3.2 Brânquia

Nenhuma alteração na transcrição dos genes *CYP1A*, *UDPGT1B*, *MET* e *GST* foram observadas na brânquia dos peixes expostos a diferentes concentrações de fenantreno (Figura 11).

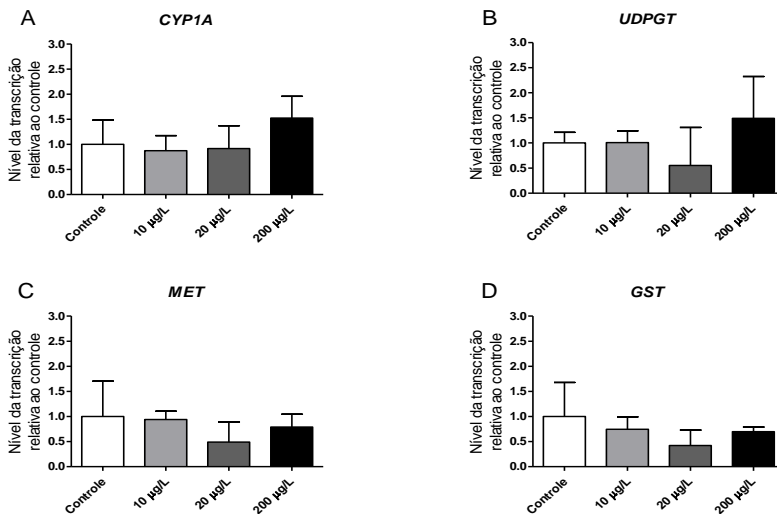


Figura 11: Nível da transcrição relativa em qRT-PCR para os genes *CYP1A*, *MET*, *GST* e *UDPGT1B* na brânquia de *Poecilia vivipara* expostos a 10 µg/L, 20 µg/L e 200 µg/L de fenantreno na água e controle durante 24 horas. A) Citocromo P450 (*CYP1A*). B) Uridina difosfato glicuronil-transferase (*UDPGT1B*). C) Metiltransferase (*MET*). e E) Glutationa-S-transferase (*GST*).

6 Discussão

Os recursos hídricos recebem continuamente aportes de contaminantes que podem interferir na biota, na qualidade do meio ambiente e, por conseguinte, nos seres humanos. De acordo com Erickson *et al.* (2008), a bioacumulação de um composto do ambiente depende da disponibilidade deste no meio (hidrofobicidade), fisiologia do organismo (ingestão, metabolismo e eliminação) e do comportamento do organismo (fidelidade de hábitat).

Quando a exposição é feita *in situ* deve-se considerar estes fatores, porém quando a exposição é feita *in vitro*, o fator que implica alteração na reposta do experimento é a fisiologia de cada organismo, por exemplo, se os peixes tiveram maior atividade respiratória e, portanto, trocas com o meio durante o período de exposição ou ficaram mais sedentários, influenciando assim a uma alta ou baixa absorção do fenantreno da água. De acordo com Liang *et al.* (2007) peixes pequenos possuem maior consumo de oxigênio que os grandes (massa/volume), e assim, a taxa de perda de compostos orgânicos pode ser maior que a de absorção.

No presente trabalho, a maior diminuição dos níveis de fenantreno na água dos aquários que continha peixes sugere que os animais poderiam estar absorvendo este contaminante (Figuras 4, 5, e 6). Porém, para confirmar a acumulação nos tecidos, seria necessária a análise química deste composto. A absorção, assim como a acumulação depende da lipossolubilidade do composto, sendo que quanto mais lipossolúvel a molécula, mais propensa será a bioacumular nos tecidos sem serem metabolizadas e excretadas. O fenantreno possui baixo coeficiente octanol/água ($Kow = 4,53$) em relação a outros HPAs, sendo assim, espera-se uma baixa taxa de acumulação. Além disso, este composto possui apenas três anéis benzênicos e baixo peso molecular (peso molecular do fenantreno = 178,2), o que pode acarretar em uma rápida metabolização, ou simplesmente excreção sem ser biotransformado (Pedrozo *et al.*, 2002).

Quando uma substância é absorvida, esta pode desencadear um aumento nos níveis da transcrição de genes relacionados com a biotransformação de xenobióticos visando a excreção do composto original ou metabólitos intermediários, produtos da biotransformação.

As respostas genotóxicas analisadas neste estudo através do Ensaio Cometa indicam a possível formação de metabólitos

intermediários pelas enzimas das fases de biotransformação, principalmente nas concentrações mais baixas de fenantreno (10 e 20µg/L) que tiveram maior diferença significativa ($p < 0,001$) em relação a diferença apresentada pela concentração maior de 200µg/L de fenantreno ($p < 0,05$). Esses metabólitos são espécies reativas que poderiam ter causado danos ao DNA, referentes ao tamanho do índice de quebras de fita de DNA e a alta frequência das mesmas nas concentrações menores. Isso também pode ter ocorrido nas primeiras horas da exposição, como pode ser observado nas figuras 4, 5 e 6, nas quais houve redução da concentração do fenantreno nas primeiras horas.

Os autores Di Paolo (2006), Matsumoto *et al.* (2006), Pretti *et al.* (2007), Vanzella *et al.* (2007) obtiveram índices de dano significativos através do Ensaio Cometa também em eritrócitos de peixes expostos a hidrocarbonetos tanto em laboratório como em campo. Em estudos com invertebrados, como de Laffon *et al.* (2002), o molusco *Mytilus galloprovincialis* exposto em laboratório ao óleo do derramamento do navio *Prestige* mostrou a bioacumulação de HPAs nos tecidos do animal, além de significativo dano no DNA. Isso mostra que o uso do Ensaio Cometa é uma ferramenta importante para estudos ecotoxicológicos que avalia sensivelmente a genotoxicidade à contaminantes do meio e pode ser usado amplamente em biomonitoramento aquático.

Estudos semelhantes realizados por Oliveira *et al.* (2007) obtiveram resultados sobre a atividade de *CYP1A* a partir da análise da atividade da enzima EROD no fígado do peixe *Liza aurata* expostos a 17,82 a 66µg/L de fenantreno em 16 horas, além disso, também verificou danos significantes no DNA dos eritrócitos dos animais expostos. Apesar de serem analisadas em tecidos diferentes, essas alterações poderiam estar relacionadas a baixas quantidades de fenantreno, principalmente nas primeiras horas de exposição.

Nas vias da biotransformação, os primeiros genes a serem analisados são aqueles que codificam diferentes isoformas do complexo Citocromo P450, importante maquinaria de metabolização de Fase I, principalmente no tecido hepático. No presente estudo, foi observada uma diferença significativa na transcrição do gene *CYP1A* no fígado dos peixes expostos à maior concentração de fenantreno (200 µg/L) em relação aos outros tratamentos (10 e 20 µg/L), porém não houve diferença significativa na transcrição entre este tratamento e o grupo controle (Figura 10A).

CYP1A está relacionado com a detoxificação de xenobióticos, inclusive HPAs, principalmente em estudos que utilizam a atividade enzimática etóxi-resorufina-O-deetilase (EROD) como expressão catalítica de proteínas *CYP1A* (Whyte *et al.*, 2000; Pedrozo *et al.*, 2002; Johnson *et al.*, 2008). Mattos (2010) observou um aumento na atividade da EROD e na transcrição de *CYP1A* em fígado de *P. vivipara* expostos à fração de óleo diesel acomodada em água.

Billiard *et al.* (2004) fazem referência ao potencial que os HPAs têm de induzir um aumento na atividade de EROD em fígado de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) e constatou que entre os HPAs analisados em seu estudo, o fenantreno foi o único que não aumentou a atividade desta enzima relacionada a atividade de *CYP1A*.

Hawkins *et al.* (2002) utilizaram o mesmo modelo animal exposto a maiores concentrações de fenantreno (100 e 500 µg/L) em água e verificou que este composto possui baixa toxicidade em peixes e o classificou como não indutor de *CYP1A*, que pode acumular nos tecidos dos peixes quando expostos diretamente na água. Porém, o metabolismo, a taxa de excreção e toxicidade do fenantreno aumentam quando este é co-exposto com β-naftoflavona (βNF), outro HPA comum, o que demonstra uma importante correlação com o aumento da toxicidade quando substâncias consideradas pouco tóxicas isoladamente são expostas em conjunto. Os hidrocarbonetos são encontrados em sítios urbanos perto de descargas industriais, portanto eles geralmente ocorrem concomitantemente com uma variedade de outros contaminantes (Johnson *et al.*, 2008; Meador *et al.*, 1995).

Neste trabalho, foi observado um aumento na transcrição do gene representativo da Fase II da biotransformação o *UDPGT* no fígado de animais expostos a fenantreno na concentração de 200µg/L em relação à 20µg/L, enquanto que os tratamentos de menor concentração não apresentaram diferença entre si e em relação ao controle (Figura 10F).

Uma explicação para este fato decorre de que as concentrações menores, 10µg/L e 20µg/L, poderiam ser consideradas baixas a ponto de não induzir diferença em relação à transcrição do grupo controle. Possivelmente a atividade enzimática nos peixes expostos a estes níveis de contaminação seja suficiente para rápida biotransformação deste contaminante nessas condições. Outro fator determinante é o número amostral, que neste caso pode ter sido

insuficiente para demonstrar diferenças estatísticas significantes entre os grupos.

Por outro lado, Torre *et al.* (2008) expôs a enguia europeia (*Anguilla anguilla*) a três concentrações diferentes de 2,4,6-trinitrotolueno (TNT), 0,5, 1 e 2,5mg/L, nas mesmas condições deste trabalho, dissolvido em DMSO (0,01%) e diluído em água. Este autor analisou a transcrição de genes no fígado por qRT-PCR e observou que não houve indução do *CYP1A* em 24 horas de exposição, sendo que em 6 horas houve um aumento seguido de uma significativa diminuição da atividade da EROD. Enquanto que a partir de 24 horas houve um aumento dependente da dose na expressão de *UDPGT*. Desta forma, o período de 24 horas pode não ter sido suficiente para um aumento na transcrição de *CYP1A* e *UDPGT* nas concentrações menores de fenantreno apresentadas neste trabalho, mas pode ter ativado as enzimas de biotransformação, não avaliadas bioquimicamente neste estudo.

Segundo Schlenk *et al.* (2008) a indução de genes *CYPs* está relacionada com a atividade do receptor de hidrocarboneto aromático (AhR) que controla a transcrição desses genes de Fase I, assim como alguns genes de enzimas de Fase II. As isoformas da *UDPGT* estão localizadas no retículo endoplasmático com seu sítio ativo voltado para o lúmen o que lhe confere íntima ligação com o sistema enzimático citocromo P450. Esta interação de *CYP1A* e *UDPGT* facilita a biotransformação de HPAs. De acordo com Schlenk *et al.* (2008), vários trabalhos mostram a indução de genes *UDPGT* no fígado de peixes de ambientes poluídos ou expostos a HPAs o que corrobora os resultados deste trabalho.

As outras isoformas de *CYPs*, *CYP1B* e *CYP1C* expressas no fígado, não apresentaram alteração em suas transcrições (Figuras 10B-C). Segundo Schlenk *et al.* (2008) *CYP1B* de peixes possuem níveis menores de resposta a HPAs, porém é necessário mais estudos para determinar a significância fisiológica deste gene em peixes. É, contudo, bastante estudado em tumores de mamíferos, o que mostrou que este gene possui menos propensão, em relação a *CYP1A*, para formar metabólitos de HPAs reativos com DNA, reforçando os resultados obtidos no Ensaio Cometa.

Segundo Zanette (2009), peixes *Fundulus heteroclitus* expostos a PCB apresentaram maior indução de *CYP1B* no cérebro e *CYP1C* na gônada, ocorrendo no fígado níveis menores de transcrição

de ambos os genes, em contrapartida ao *CYP1A*, que teve maior transcrição no tecido hepático.

No presente estudo não houve aumento na transcrição relativa de *GST* no fígado de *P. vivipara* expostos a diferentes concentrações de fenantreno (Figura 10E), o que pode indicar que as concentrações foram baixas para ativar este gene ou a atividade catalítica das diferentes isoformas de *GST* eram suficientes para atender a biotransformação de Fase II destes animais. O trabalho realizado por Torre *et al.* (2008) demonstrou aumento significativo da atividade desta enzima, em relação a transcrição do mesmo gene.

Apesar da consideração da baixa toxicidade do fenantreno, a exposição crônica do peixe *Sebastiscus marmoratus* a este composto mostrou modulação dose-dependente a genes relacionados à maturação de gametas, como também ao acúmulo de fenantreno e modulação da atividade da *GST* no cérebro desses animais (Sun *et al.*, 2011). Schlenk *et al.* (2008) relatam que, em geral, a atividade da *GST* em peixes é significativamente menor quando comparados com roedores. Portanto, doses maiores ou menor tempo de exposição poderiam ter levado a um aumento na transcrição do gene desta enzima.

Outro gene de enzima de Fase II, *MET*, também não apresentou diferença significativa no fígado dos animais expostos às diferentes concentrações de fenantreno (Figura 10D). No entanto, a transcrição do gene da *MET* foi induzida no trabalho de Mattos (2010), o qual relacionou a codificação deste gene a uma proteína com atividade catecol-O-metiltransferase, responsável por inativar hormônios, neurotransmissores e xenobióticos transferindo um grupo catecol.

Nenhuma alteração significativa na transcrição dos genes *CYP1A*, *MET*, *GST* e *UDPGT* foi observada na brânquia dos peixes expostos a diferentes concentrações de fenantreno (Figura 11). Alguns autores observaram o acúmulo de HPAs em diferentes tecidos de peixes, entre eles, músculos, brânquia, gônadas, cérebro e coração, sendo que na brânquia foi encontrada a menor fração destes compostos (Quddus Khan *et al.*, 2005). A brânquia é um tecido de contato direto com a água e de primeira passagem de xenobióticos, podendo ativar respostas bioquímicas e/ou moleculares nas primeiras horas do contato.

Peixes mantidos em laboratório tendem a serem menos ativos do que peixes no ambiente natural, assim, a taxa de ventilação branquial pode variar muito entre os indivíduos (Driscoll *et al.*, 2010). Entretanto,

ainda que os genes *CYP1A* e *UDPGT* tenham apresentado uma tendência de aumento da transcrição gênica nos animais expostos à concentração maior de fenantreno ($200\mu\text{g/L}$), as concentrações apresentadas neste estudo não foram capazes de induzir estes genes nas brânquias dos animais (Figuras 11A -B).

Alguns autores sugerem uma baixa toxicidade do fenantreno (Hawkins *et al.*, 2002), enquanto que outros estudos o consideram como agente químico prioritário de contaminação (USEPA, 1993). Em alguns trabalhos, resultados foram obtidos com concentrações mais elevadas de fenantreno ou outros contaminantes relacionados, o que indica que *Poecilla vivipara* poderia ser exposto a concentrações maiores de fenantreno, como também durante um período de tempo menor, ou vários intervalos de tempo, a fim de relacionar a exposição crônica e aguda.

Os biomarcadores moleculares e genotóxicos permitem respostas biológicas de exposição a curto prazo. Além disso, estudos mostram que estes biomarcadores são sensíveis a alterações nos organismos expostos à contaminantes, podendo ser recomendados em conjunto com análises químicas e bioquímicas em diagnóstico de regiões com influência de atividades antrópicas, relacionadas ao uso de derivados de petróleo

7 Conclusão

- Os resultados apresentados neste trabalho mostram que no fígado de peixes *Poecilia vivipara* expostos a fenantreno (200µg/L) por 24 horas houve aumento na transcrição de *CYP1A* e *UDPGT1B1* em relação a exposição nas concentrações menores (10 e 20µg/L). Além disso, esses resultados mostram a possível interação dos sistemas enzimáticos citocromo P450 e uridina difosfato-glicuronil-transferase.
- As isoformas *CYP1B* e *CYP1C* não apresentaram diferença em sua transcrição no fígado de *P. vivipara*.
- Os níveis de *CYP1A* e *UDPGT* na brânquia dos peixes não apresentaram diferenças estatísticas.
- Os genes *GST* e *MET* não apresentaram diferença estatística na transcrição tanto no fígado quanto na brânquia dos animais expostos.
- As concentrações de fenantreno, o tempo de exposição ou o número amostral utilizado não foram suficientes para uma diferença considerável na transcrição dos genes de biotransformação analisados.
- O fenantreno causou danos significativos no DNA dos eritrócitos dos peixes expostos e estes tiveram alta frequência, em relação ao controle, o que pode estar relacionado à formação de metabólitos reativos intermediários nas fases de biotransformação

8 Referências

- ABBM. Associação Brasileira de Biologia Marinha. Notícias e Eventos: Petróleo IV: Vazamento de petróleo na Bacia de Campos provoca acidente de grandes proporções. Boletim Informativo da Associação Brasileira de Biologia Marinha, v. 4, n. 3, p. 19-22, 2011.
- Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J. Raff, M. Roberts, K. Walter, P; trad. Veiga *et al.* Biologia Molecular da Célula, Artmed, 4 ed, Porto Alegre, p. 508-1071, 2004.
- Betito, R. Comparação da complexidade das adaptações bio-ecológicas de dois peixes (*Jenynsia multidentata* e *Poecilia vivipara*) (Cyprinodontiformes) no estuário da Lagoa dos Patos, Rio Grande do Sul, Brasil. Revista Didática Sistêmica, v. 3, p. 73, 2006.
- Billiard, S. M.; Bols, N. C.; Hodson, P. V. In vitro and in vivo comparisons of fish-specific *CYP1A* induction relative potency factors for selected polycyclic aromatic hydrocarbons. Rapid Communication, Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 59, p. 292-299, 2004.
- Brasil, Decreto nº 50.877, de 29 de junho de 1961. Dispõe sobre o lançamento de resíduos tóxicos ou oleosos nas águas interiores ou litorâneas do País e dá outras providências Disponível em: <<http://www.mp.ba.gov.br>>. Acesso em 24/03/2012.
- Breden, F.; Ptacek, M. B.; Rashed, M.; Taphorn, D.; Figueiredo, C. A. Molecular phylogeny of the live-bearing fish genus *Poecilia* (Cyprinodontiformes: Poeciliidae). Molecular Phylogenetics and Evolution, v. 12, n. 2, p. 95-104, 1999.
- Brulle, F.; Cocquerelle, C.; Mitta, G.; Castric, V.; Douay, F.; Leprêtre, A.; Vandenbulcke, F. 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.
- Bruyn, W. J. de; Clark, G. D.; Ottelle, K.; Aiona, P. Photochemical degradation of phenanthrene as a function of natural water variables modeling freshwater to marine environments. Marine Pollution Bulletin, v. 62, p. 533, 2012.
- Bustin, S. A.; Benes, V.; Nolan, T.; Pfaffl, M. W. Quantitative real-time RT-PCR – a perspective. Journal of Molecular Endocrinology, v. 34, p. 597-601, 2005.

Cajaraville, M. P.; Bebianno, M. J.; Blasco, J.; Porte, C.; Sarasquete, C.; Viarengo, A. 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.

CETESB. Decisão de Diretoria nº 195-2005E. Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental, artigo 1º, anexo único, 2005. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br>>. Acesso em 23/03/2012.

Chasin, A. A. M.; Azevedo, F. A. As bases toxicológicas da ecotoxicologia. São Carlos: RIMA, São Paulo: Interfox, p. 123-126, 2003.

CONAMA 2005. Resolução CONAMA nº 357 de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Conselho Nacional do Meio Ambiente, 2005. Disponível em: <www.mma.org.br>. Acesso em 23/03/2012.

CONAMA 2007. Resolução CONAMA nº 393 de 08 de agosto de 2007. Dispõe sobre o descarte contínuo de água de processo ou de produção em plataformas marítimas de petróleo e gás natural, e dá outras providências. Conselho Nacional do Meio Ambiente, 2007. Disponível em: <www.mma.org.br>. Acesso em 23/03/2012.

De Robertis, E.; Hib, J. E. Bases da biologia celular e molecular. Guanabara Koogan S.A., 4 ed., Rio de Janeiro, p. 381, 2006.

Di Paolo, C. Aplicação do ensaio Cometa a estudo de danos ao DNA de robalos, *Centropomus parallelus* (Poey, 1860) expostos à β -naftoflavona. 91f. Dissertação (Mestre em Ciências – Oceanografia Biológica) Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, SP, 2006.

Driscoll, S. B. K.; Mcardle, M. E.; Menzie, A. C.; Reiss, M.; Steevens, J. A. A framework for using dose as metric to assess toxicity of fish to PAHs. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 73, p. 486-489, 2010.

Erickson, R. J.; Nichols, J. W.; Cook, P. M.; Ankley, G. T.; Bioavailability of Chemical Contaminants in Aquatic Systems. In: Giulio R. T. e Hinton D. E. *The Ecotoxicology of fishes*, CRC Press, cap. 2, p. 9-14, 2008.

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. 217f. Dissertação (Mestrado em Ciências em Planejamento Ambiental) - Curso de Pós-Graduação em Engenharia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, 2006.

Foth, H. Toxicology. Chapter 45: Ecotoxicology. Institute of Environmental Toxicology, Martin Luther University of Halle/Wittenberg. Ecotoxicology Science Direct, University Press, p. 1067-1072, 1999.

Gomes, A. S.; Clavico E. Propriedades físico-químicas da água. Departamento de Biologia Marinha, Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, p.1-5, 2005. Disponível em <<http://www.uff.br/ecosed/PropriedadesH2O.pdf>>. Acesso em: 05/03/2012. 2005.

Gouart, M.; Callisto, M. Bioindicadores de qualidade de água como ferramenta em estudos de impacto ambiental. Revista da FAPAM, v. 2, n. 2, p. 153-164, 2003.

Hannam, M. L.; Bamber, S. D.; Galloway, T. S.; Moody, A. J.; Jones, M. B. Funcional immune response in *Pectan maximus* Combined effects of a pathogen-associated molecular pattern and HPA exposure. Fish and Shellfish Immunology, v. 28, p 249-252, 2010.

Harper, H. A.; Murray, R. K. Harper: Bioquímica. Atheneu, 7 ed., São Paulo, p. 685-687, 1994.

Hawkins, A. S.; Billiard, M. S.; Tabash, S. P.; Brown, R. S.; Hodson, P. V. Altering cytochrome P4501A activity affects polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism and toxicity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Environmental Toxicology and Chemistry, vol. 21, n. 9. p. 1845-1853, 2002.

Hugget, J.; Dheda, K.; Bustin, S.; Zumla, A. Real-time RT_PCR normalization, strategies and considerations. Genes and Immunity, Nature Publishing Group, p.1-6, 2005.

ICES. Report of the working group on biological effects of contaminants (WGBEC), Ostend, Belgium. International Council for the Exploration of the Sea (ICES), Marine Habitat Committee, p. 82-86, 2004.

INCT-TA. Institutos Nacionais de Ciência e Tecnologia - Toxicologia Aquática. Edital15/2008-MCT/CNPq/CAPES/FAPEMIG/FAPERJ/FAPESP. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, p. 3-10, 2008.

Invitrogen. TRIzol Reagent® Protocol. Life Technologies. Part no. 15596026.PPS. Revisado em 15 Nov 2010. Disponível em: <www.invitrogen.com> Acesso em: 18/04/2012, 2010.

Irvine, G. V.; Mann, D. H.; Short, J. W. Persistence of 10-year old *Exxon Valdez* oil in Gulf of Alaska beaches: The importance of boulder-armoring. *Marine Pollution Bulletin*, v. 52, p. 1011-1015, 2006.

Jacob, J.; Seidel, A. Biomonitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons in human urine. *Journal of Chromatography*, v. 778, p. 31-74, 2002.

Johnson, L. L.; Arkoosh, M. R.; Bravo, C. F.; Collier, T. K.; Krahn, M. M.; Meador, J. P.; Myers, M. S.; Reichert, W. L.; Stein, J. E.; The effects of polycyclic aromatic hydrocarbons in fish from Puget Sound, Washington. In: Giulio R. T. e Hinton D. E. *The Ecotoxicology of fishes*, CRC Press, cap. 22, p. 881- 887, 2008.

Kennish, M. J. *Ecology of estuaries: anthropogenic effects*. CRC Press, Londres, p. 494, 1992.

Kumaravel, T. S.; Vilhar, B.; Faux, S. P.; Jha, A. N. Comet assay measurements: a perspective. *Cell Biology and Toxicology*, v. 25, p. 53-64. 2009.

Laffon, B.; Aldao, I.; Pérez-Cadahina, B.; Pássaro, E.; Méndez, J. Primer paso en la evaluación de los efectos del fuel del *Prestige* sobre el medio ambiente marino: Disponibilidad, bioacumulación y daño en el ADN. *Ciencias Marinas*, v. 32, n. 02B, p. 389-399, 2006.

Liang, Y.; Tse, M. F.; Young, L.; Wong, M. H. Distribution patterns of polycyclic aromatic hidrocarbons (PAHs) in sediments and fish at Mai Po Marshes Nature Reserve, Hong Kong. *Water research*, v. 41, p. 1301-1311, 2007.

Livak, J. K.; Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using Real-time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods*, v. 25, p. 402-408, 2001.

Lüchmann, K. H. Respostas bioquímicas e moleculares em ostras do mangue, *Crassostrea brasiliiana*, expostas a diferentes contaminantes

ambientais. 178f. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, SC, 2012.

Magalhães, D. P.; Filho, A. S. F. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. *Oecologia Brasiliensis*, v. 3 n.12, p. 355-381, 2008.

Martinez, C. B. R.; Cólus, I. M. S. Biomarcadores em peixes neotropicais para o monitoramento da poluição aquática na bacia do rio Tibagi. In: MEDRI, M. E. *et al.* Editores, Londrina, PR, p. 551-577, 2002.

Matsumoto, S. T.; Mantovani, M. S.; Malagutti, M. I. A; Dias, A. L.; Fonseca, I. C.; Marin-Morales, M. A. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. *Genetics and Molecular Biology*, v. 29, n. 1, p. 148-158, 2006.

Mattos, J. Respostas bioquímicas e moleculares no peixe *Poecilia vivipara* exposto à fração de óleo diesel acomodada em água. 120f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, SC, 2010.

Meador, J. P.; Stein, J.E.; Reichert, W.L.; Varanasi, U. Bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons by marine organisms. *Environmental Contamination Toxicology*, v. 143, p. 79-165, 1995.

Meniconi, M. F. G. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos no meio ambiente: diferenciação de fontes em sedimentos e metabólitos em bile de peixes. 214f. Tese (Doutorado em Química) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade do Rio Grande do Norte, RN, 2007.

Michel, J. Assessment and recommendations for the oil spill cleanup of Guanabara Bay, Brazil. *Spill Science and Technology Bulletin*, v. 6, n. 1, p. 89-96, 2000.

Moody, J. D.; Freeman, P. J.; Deorge, D. R.; Cerniglia, C. E. Degradation of phenanthrene and anthracene by cell suspensions of *Mycobacterium* sp. strain PYR-1. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 67, n. 4, p. 1476-1483, 2001.

Moraes, A. C. R. Contribuições para gestão da zona costeira do Brasil. Ed. Hucitec, cap. 2, p. 27-31, 1998.

Moraes, D. S. L.; Jordão, B. Q. Degradação de recursos hídricos e seus efeitos sobre a saúde humana. Revista Saúde Pública, v. 36, n.3, p. 370-374, 2002.

Naldi, M. C.; Bainy, A. C. D. O uso de biomarcadores moleculares como indicador de contaminação aquática: conceitos e perspectivas. In: III WORKSHOP INTERDISCIPLINAR DE PESQUISA EM INDICADORES DE SUSTENTABILIDADE. Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, São Paulo, p. 65, 2011.

Naldi, M. C.; Trevisan, R.; Lüchmann, K. H.; Dorrington, T.; Mattos, J.; Siebert, M. N.; Dafré, A. L.; Melo, C. M. R.; Bainy, A. C. D. Monitoramento da exposição de ostras do mangue *Crassostrea brasiliana* a duas concentrações de fenantreno e análise das defesas antioxidantes não-enzimáticas. In: IV CONGRESSO BRASILEIRO DE OCEANOGRAFIA, Associação Brasileira de Oceanografia, Rio Grande, RS, p. 965-968, 2010.

Nass, D. P. O conceito de poluição. Revista Eletrônica de Ciências, n. 13, p1-3, 2002. Disponível em: <<http://cdcc.sc.usp.br/ciencia/artigos/>>. Acesso em: 23/03/2012. 2002.

Nolan, T.; Hands, R.; Bustin, R. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. Nature Protocols, v. 1, n. 3, p. 1559, 2006.

OECD. Guidelines for testing chemicals – Fish, acute toxicity test. Organization for Economic Cooperation and Development, Guideline 203, 9p, 1992.

Oliveira, M.; Pacheco, M.; Santos, M. A. Cytochrome P4501A, genotoxic and stress responses in Golden grey mullet (*Liza aurata*) following short-term exposure phenanthrene. Chemosphere, v. 66, n. 7, p. 1284-1291, 2007.

Pedrozo, M. F. M.; Barbosa, E. M.; Corseuil, H. X.; Schneider, M. R.; Linhares, M. M. Ecotoxicologia e avaliação do risco do petróleo. Centro de Recursos Ambientais, Cadernos de Referência Ambiental, Salvador, v.12, p. 69-246, 2002.

Pereira, S. R. Identificação e caracterização das fontes de poluição em sistemas hídricos. Revista Eletrônica de Recursos Hídricos, v. 1, n. 1, p. 20-36, 2004. Disponível em:

<<http://www.abrh.org.br/informacoes/rrh.pdf>>. Acesso em: 20/03/2012.

Pfaffl, M. W.; Tichopad, A.; Prgomet, C.; Neuvians, T. P. Determination of stable housekeeping genes and sample integrity: BestKeeper-Excel-base tool using pair-wise correlations. *Biochemical Letters*, v. 26, p. 509-515, 2004.

Phillips, D. J. H.; Rainbow, P. S. Biomonitoring of trace aquatic contaminants. Elsevier Applied Science, London, p. 371, 1993.

Polette, M. Turismo e indicadores ambientais: uma chance para alcançar a sustentabilidade. In: IV SIMPÓSIO SOBRE RECURSOS NATURAIS E SÓCIO-ECONÔMICOS DO PANTANAL. Corumbá, MS, 2004.

Pretti, E.; Cavalcante, D.; Simonato, J. D.; Martinez, C. B. R. Ensaio do cometa e indução de anormalidades eritrocíticas nucleares para detecção de genotoxicidade e mutagenicidade no peixe neotropical *Prochilodus lineatus* expostos à fração solúvel da gasolina. In Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil, 23 a 28 de Setembro de 2007, Caxambu, MG, 2007.

Quddus Khan, M. A.; Al-Ghais, S. M.; Catalin, B.; Khan, H. Y. Effects of petroleum hydrocarbons on aquatic animals. In: Oil Pollution and its Environmental Impact in the Arabian Gulf Region. Elsevier, cap. 12, p. 159, 2005.

Raposo, J. B. Metabolismo e mecanismos de ação de compostos hepatotóxicos. In: SEMINÁRIO DE BIOQUÍMICA DO TECIDO ANIMAL, PPGCV / UFRGS, p. 19, 2002.

Rhomberg, L. Use of biomarkers in quantitative risk assessment. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, EPA/600/A-93/263, NTIS PB94117447, 1993.

Roth, C. M. Quantifying gene expression. *Current Issues Molecular Biology*, v. 4, p. 93-100, 2002.

Schäfer, S.; Köhler A. Gonadal lesions of female sea urchin (*Psammechinus miliaris*) after exposure to the polycyclic aromatic hydrocarbon phenanthrene. *Marine Environmental Research*, v. 68, n. 3, p. 9, 2009.

Schmittgen, T; Zakrajsek, B. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-

PCR. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, v. 46, p. 69-81, 2000.

Schlenk, D.; Handy, R.; Steinert, S.; Depledge, M. H.; Benson, W. Biomarkers. In: Giulio R. T. e Hinton D. E. *The Ecotoxicology of fishes*, CRC Press, cap. 16, p. 683-689, 2008.

Schmittgen, T.; Livak, K. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature-Protocols*, v. 3, n. 6, p. 1101-1108, 2008.

Shennan, J. L. Hydrocarbons as substrates in industrial fermentation. *Petroleum Microbiology*, Macmillan, p. 643-683, 1984.

Shubo, T. Sustentabilidade do abastecimento e da qualidade da água potável urbana. 113f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Escola Nacional de Saúde Pública Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2003.

Silva, C. A.; Ribeiro, C. A. O.; Katsumiti, A.; Araújo, M. L. P.; Zandoná, E. M.; Costa Silva, G. P.; Maschio, J. Roche, H.; Silva De Assis, H. C. Evaluation of waterborne exposure to oil spill 5 years after an accident in Southern Brazil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 72, p. 400-409, 2009.

Soares-Gomes, A.; Neves, R. L.; Aucélio, R.; Van Der Ven, P. H.; Pitombo, F. B.; Mendes, C. L. T.; Ziolli, R. L. Changes and variations of polycyclic aromatic hydrocarbon concentration in fish, barnacles and crabs following an oil spill a mangrove of Guanabara Bay, Southeast Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, v. 60, p. 1359-1363, 2010.

Soriano, J. A.; Viñas, L.; Franco, M. A.; González, J. J.; Ortiz, L.; Bayona, J. M.; Albaigés, J. Spatial and temporal trends of petroleum hydrocarbons in wild mussels from the Galician coast (NW Spain) affected by the Prestige oil spill. *Science of Total Environment*, v. 370, p. 80-90, 2006.

Sousa, A. C. C. Responsabilidade Social e Desenvolvimento Sustentável: A Incorporação dos Conceitos à Estratégia Empresarial. 204f. Dissertação (Mestre em Ciências em Planejamento Energético) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, 2006.

Souza, T. S.; Fantanetti, C. S. Ensaio do Cometa para avaliação da qualidade das águas do rio Paraíba do Sul numa área sob influência da

uma refinaria de petróleo. In: 4ºPDPETRO, 21 a 24 de Outubro, Campinas, SP, 2007.

Steckert, A. V. Análise ecotoxicológica da água e verificação do dano ao DNA em peixes expostos a agrotóxicos em cultura de arroz irrigado, Araranguá, SC. 40 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, 2007.

Sudip, K. S.; Om, V. S.; Rakesh, K. J. Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. Review TRENDS in Biotechnology. v. 20. n.6, p 243-245, 2002.

Sun, L.; Zuo, Z.; Luo, H.; Chen, M.; Zhong, Y.; Chen, Y.; Wang, C. Chronic Exposure to phenanthrene influences the spermatogenesis of male *Sebasticus marmoratus*: U-shaped effects and the reason of them. Environmental Science and Technology, v. 45, p. 10212-10218, 2011.

Torre, C. D.; Corsi, I.; Arukwe, A.; Valoti, M.; Focardi, S. Interactions of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) with xenobiotic biotransformation system in European eel *Anguilla anguilla* (Linnaeus, 1785). Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 71, p. 789-805, 2008.

USEPA. Sediment Quality criteria for the protection of benthic organisms: PHENANTHRENE. United States Environmental Protection Agency, Washington, p. 86, 1993.

USEPA. Technical support document for water quality-based toxic control, Environmental Protection Agency, Washington, 135 p., 1984.

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.

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, n. 1, p. 36-43, 2007.

Walker, C. H.; Hopkin, S. P.; Sibly, R. M.; Peakall, D. B. Principles of ecotoxicology. 3 ed. CRC Press, p.127-129, 2006.

WHO. Non-Heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. Environmental Health Criteria, World Health Organization, Geneva, n. 202, 1997.

Whyte, J. J.; Jung, R. E.; Schmitt, C. J.; Tillitt, D. E. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. *Critical Reviews in Toxicology*, v. 30, n. 4, p. 347-570, 2000.

Wong, M. L.; Medrano, J. F. Real-Time PCR for mRNA quantification. *BioTechniques Review*, v. 39, p. 75-85, 2005.

Wu, B.; Zhang, R.; Cheng, S.; Ford, T.; Li, A.; Zhang, X. Risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons in aquatic ecosystems. *Ecotoxicology*, v. 10, p. 646-653, 2011.