

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE FILOSOFIA E CIÊNCIAS HUMANAS
DEPARTAMENTO DE GEOCIÊNCIAS
CURSO DE BACHARELADO EM OCEANOGRAFIA

RESPOSTAS MOLECULARES EM OSTRAS DO PACÍFICO
Crassostrea gigas (THUNBERG 1793) EXPOSTAS A
PARACETAMOL

Álvaro Cavaler Pessoa de Mello

Florianópolis

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE FILOSOFIA E CIÊNCIAS HUMANAS
DEPARTAMENTO DE GEOCIÊNCIAS
CURSO DE BACHARELADO EM OCEANOGRAFIA

RESPOSTAS MOLECULARES EM OSTRAS DO PACÍFICO
Crassostrea gigas (THUNBERG 1793) EXPOSTA A PARACETAMOL

Trabalho acadêmico de conclusão de curso submetido à Universidade
Federal de Santa Catarina para a obtenção do grau de Bacharel em Oceanografia

Álvaro Cavaler Pessoa de Mello

Orientador: Professor Dr. Afonso Celso Dias Bainy

Florianópolis
2015

AGRADECIMENTOS

Este trabalho conta com a colaboração de diversas pessoas que estenderam a mão e tornaram possível a realização deste trabalho. As discussões, sugestões, o companheirismo foram fundamentais ao longo desses anos para meu desenvolvimento científico, acadêmico e psicológico. Tenho certeza que essas pessoas fizeram parte da minha trajetória e a elas, meus sinceros agradecimentos:

Ao meu orientador Afonso Celso Dias Bainy, pela confiança em meu trabalho e por me dar a oportunidade de fazer parte de uma grande equipe como o LABCAI.

Aos meus pais e irmãs por sempre estarem ao meu lado me dando apoio.

A Maíra, minha companheira com quem aprendi muito ao longo dos últimos anos, pela paciência, pelas sugestões em meu trabalho.

Aos amigos do Ocean's Eleven, Hiroshi, Giovanni, Alex, Thaís, Gabrielle, Giulliane, Vanessa, Renan, pelos momentos de alegria e diversão necessários ao longo desses anos de faculdade.

Aos LABCAIanos Miguel, Daína, Jacó, Fabrício, Flávia, Clei, Marília pelos ensinamentos e companheirismo nesses anos de LABCAI.

Aos demais pesquisadores do LABCAI, pelos momentos de discussão e confraternização ao longo desses anos.

Ao grupo do LMM, pelo apoio técnico, fornecimento de ostras, microalgas e aclimações.

À banca examinadora por ceder parte de seu tempo e esforço na avaliação deste TCC.

RESUMO

O paracetamol, analgésico mais vendido no mundo, tem sido detectado em ecossistemas aquáticos em vários países. Entretanto, pouco se sabe sobre os efeitos desses compostos em organismos aquáticos, incluindo os moluscos bivalves. Neste estudo foram investigadas as respostas moleculares em *Crassostrea gigas* expostas a paracetamol (PAR) em laboratório. Os animais foram expostos a duas concentrações de PAR ($1\mu\text{g L}^{-1}$ e $100\mu\text{g L}^{-1}$) sendo que um controle (CT) foi utilizado para comparar os resultados. A glândula digestiva e as brânquias dos animais foram retiradas após 1, 4 e 7 dias do início da exposição. O RNA foi isolado, e o DNA complementar foi sintetizado para a realização de uma análise de transcrição dos genes cicloxigenases (*COX*), os citocromo p450 (*CYPs*) *CYP30C1*, *CYP3071A1*, *CYP2AU2*, *CYP356A1*, catalase (*CAT*), caspase (*CASP*), proteínas ligantes de ácido graxo (*FABP*), *glutathione - S transferase pi* (*GST pi*), *glutathione - S transferase omega* (*GST omega*), proteínas de choque térmico (*HSP 70*) e superóxido dismutase (*SOD*). Após 1 dia de exposição ao PAR na concentração de $1\mu\text{g L}^{-1}$ foi observado um menor nível de transcritos dos genes *CYP30C1*, *CYP3071A1*, *SOD* e *FABP* nas brânquias, enquanto na glândula digestiva na concentração $100\mu\text{g L}^{-1}$ foi observado um aumento dos transcritos do gene *COX*. Após 4 dias, nas ostras expostas a $100\mu\text{g L}^{-1}$, foi observado um maior nível de transcritos dos genes *COX*, *CASP*, *GST pi* em brânquias e *GST pi* e *SOD* em glândula digestiva. Após 7 dias de exposição os níveis de transcritos do gene *GST pi* foram menores na concentração de $1\mu\text{g L}^{-1}$ em brânquias, enquanto na glândula digestiva foram observados maiores níveis de transcritos dos genes *GST pi* e menores de *GST omega* nas concentrações de $100\mu\text{g L}^{-1}$ e $1\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. A diminuição dos transcritos de *CYPs* após 1 dia e o aumento da *CASP* após 4 dias nas brânquias podem estar relacionados a uma possível ativação do sensor *inositol requiring kinase (IRE1alpha)* do retículo endoplasmático, evento conhecido como estresse do retículo endoplasmático. Na glândula digestiva a indução da *GST pi* pode indicar que esta tem um importante papel na detoxificação do PAR em ostras, semelhantemente ao observado em mamíferos.

Palavras chave: Paracetamol, RT-PCR, biomarcadores,.

ABSTRACT

Paracetamol, best-selling analgesic in the world, is widely found in aquatic ecosystems. However, little is known about the effects of these compounds on aquatic organisms including bivalves. We investigated the molecular responses of *Crassostrea gigas* exposed to paracetamol (PAR) in laboratory. The animals were exposed to two concentrations of PAR ($1 \mu\text{g L}^{-1}$ and $100 \mu\text{g L}^{-1}$), wherein a control (CT) was used to compare the results. The digestive gland and gills of the animals were taken 1, 4 and 7 days of exposure. These tissues were underwent a different transcriptional analysis for cyclooxygenase (*COX*), cytochromes P450s (*CYPs*) *CYP30C1*, *CYP3071A1*, *CYP2AU2*, *CYP356A1*, catalase (*CAT*), caspase (*CASP*), fatty acid binding proteins (*FABP*), glutathione - S transferase π (*GST \pi*), glutathione - S transferase ω (*GST \omega*), heat shock proteins (*HSP 70*) and superoxide dismutase (*SOD*) genes. After 1 day of exposure to the PAR at a concentration of $1 \mu\text{g L}^{-1}$ lower transcripts of *CYP30C1*, *CYP3071A1*, *SOD* and *FABP* were observed in gills, while in the digestive gland of the oysters exposed to PAR $100 \mu\text{g L}^{-1}$, higher *COX* transcripts were observed. After 4 days of exposure to PAR $100 \mu\text{g L}^{-1}$ higher transcript levels of *COX*, *CASP*, *GST \pi* were observed in the gills and, *GST \pi* and *SOD* in the digestive gland. After 7 days of exposure the transcript levels of *GST \pi* were lower in gills of oysters exposed to PAR $1 \mu\text{g L}^{-1}$, while in the digestive gland was observed higher levels of *GST \pi* and lower levels of *GST \omega* at $100 \mu\text{g L}^{-1}$ and $1 \mu\text{g L}^{-1}$ concentrations, respectively. The *CYP* inhibition after 1 day of exposure and *CASP* induction after 4 days of exposure observed in the gills might have been caused by an activation of the endoplasmic inositol requiring kinase (*IRE1\alpha*), an event known as endoplasmic reticulum stress. Induction in the digestive gland may indicate that *GST \pi* plays an important role in the PAR detoxification, similarly to what has been described in mammals.

Keywords: Paracetamol, RT-PCR, biomarkers.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Fontes de PPCps. Fonte EPA 2010..... 11
- Figura 2.** Parte interior da *Crassostrea gigas* com indicação de diferentes tecidos (Fonte: Gomes, 2013)..... 12
- Figura 3.** Evolução da produção de ostras comercializadas em Santa Catarina entre 1991 e 2014 (t). (Fonte: EPAGRI, 2014)..... 13
- Figura 4.** Estrutura do paracetamol. Fonte <Drugbank.ca>, acessado em: 8 de novembro de 2015..... 14
- Figura 5.** Via geral da conversão do ácido araquidônico em eicosanoides. COX- ciclooxigenases, HETE- ácido epoxieicosatrienóico, HPETE- ácido hidroxiepoxieicosatrienóico, LOX- Lipoxigenase, LT- leucotrieno; PG- prostaglandina; TX- tromboxano. Fonte: Traduzido de CALDER, 2006..... 16
- Figura 6.** Paracetamol. **PAR** – Paracetamol, **AS**- Sulfato de acetaminofeno; **AG**- Glicuronídeo de acetaminofeno; **NAPQI** – N-acetil-p-N-acetil-p-benzoquinonaimina; **AC** - Acetaminofeno-cisteína metabólito; **SULT** - Sulfotransferase; **UGT** – UDP-glicuronídeo transferase; **GST** - Glutathione S transferase. (Fonte: SHINODA et al., 2007)..... 17
- Figura 7.** Aquários com ostras expostas a PAR..... 20
- Figura 8.** Curva padrão e cálculo de eficiência da curva pelo software Rotor Gene 6000 Series..... 23
- Figura 9.** Exemplo de uma curva de *melting*. O eixo y representa a taxa de variação da fluorescência com a temperatura e o eixo x, a temperatura de aquecimento..... 24
- Figura 10.** Níveis de transcritos dos genes normalizadores em diferentes tratamentos (Controle, 1 µg L⁻¹, 100 µg L⁻¹) nos tempos de 1, 4 e 7 dias. *GAPDH* em brânquias (a),

b- GAPDH em glândula digestiva (b), β -Tubulina em glândula digestiva (c) de *C. gigas*. Os resultados foram normalizados em relação ao controle. Letras diferentes indicam diferença significativa em cada tempo ($p < 0,05$). N= 6 a 10..... 26

Figura 11. Níveis de transcritos dos genes CYP30C1 (a), CYP 3071A1 (b), CYP2AU2 (c), CYP356A1 (d), GST- ω (e), GST- π (f) em diferentes tratamentos (Controle, 1 $\mu\text{g L}^{-1}$, 100 $\mu\text{g L}^{-1}$) em brânquias de *C. gigas* nos tempos de 1, 4 e 7 dias. Os resultados foram calibrados em relação ao controle. Letras diferentes indicam diferença estaticamente significativa em cada tempo ($p < 0,05$). N= 5 a 10..... 28

Figura 12. Níveis de transcritos dos genes COX (a), FABP (b), SOD (c), HSP70 (d), CAT (e), Caspase (f) em diferentes tratamentos (Controle, 1 $\mu\text{g L}^{-1}$, 100 $\mu\text{g L}^{-1}$) em brânquias de *C. gigas* no tempo de 1, 4 e 7 dias. Os resultados foram calibrados em relação ao controle. Letras diferentes indicam diferença estaticamente significativa em cada tempo ($p < 0,05$). N= 5 a 10..... 29

Figura 13. Níveis de transcritos dos genes CYP30C1 (a), CYP 3071A1 (b), CYP2AU2 (c), CYP356A1 (d), GST- ω (e), GST- π (f) em diferentes tratamentos (Controle, 1 $\mu\text{g L}^{-1}$, 100 $\mu\text{g L}^{-1}$) em glândula digestiva de *C. gigas* nos tempos de 1, 4 e 7 dias. Os resultados foram calibrados em relação ao controle. Letras diferentes indicam diferença estaticamente significativa em cada tempo ($p < 0,05$). N= 5 a 10..... 31

Figura 14. Níveis de transcritos dos genes COX (a), FABP (b), SOD (c), HSP70 (d), CAT (e), Caspase (f) em diferentes tratamentos (Controle, 1 $\mu\text{g L}^{-1}$, 100 $\mu\text{g L}^{-1}$) em glândula digestiva de *C. gigas* no tempo de 1, 4 e 7 dias. Os resultados foram calibrados em relação ao controle. Letras diferentes indicam diferença estaticamente significativa em cada tempo ($p < 0,05$). N= 5 a 10..... 32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência de iniciadores (senso e anti-senso), utilizados para a quantificação de cada gene nas brânquias e glândula digestiva das ostras expostas a PAR.....

22

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Ácido araquidônico
AC	Acetaminofeno-cisteína metabólito
AG	Glicuronídeo de acetaminofeno
AINES	Anti-inflamatórios não esteroidais
APAP, PAR	Acetaminofeno ou paracetamol
AS	Sulfato de acetaminofeno
CAT	<i>Catalase</i>
CASP	<i>Caspase</i>
cDNA	Fita complementar do DNA
COX	Ciclooxigenases
CYP	<i>Citocromo P450</i>
DNA	Ácido desoxiribonucléico
FABP	<i>Fatty acid binding protein ou proteína ligante de ácidos graxos</i>
GAPDH	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase ou Gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase</i>
GSH	Glutationa Reduzida
GST	<i>Glutationa S transferase</i>
HSP	<i>Heat shock protein ou proteínas de choque de térmico</i>
LOX	Lipooxigenase
mRNA	RNA mensageiro
NAPQI	N-acetil-para-benzoquinonaimina
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PG	Prostaglandina
PPCP	Produtos farmacêuticos de cuidado pessoal
RNA	Ácido ribonucléico
RT PCT	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
SOD	<i>Superóxido dismutase</i>
SULT	Sulfotransferase
UGT – UDP	Glicuronídeo transferase

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1. Organismo sentinela	12
2.1.1 Crassostrea gigas	13
2.2. Biomarcadores Moleculares	14
2.3. Paracetamol	14
2.4. Mecanismo de ação do paracetamol	15
2.5. Mecanismo de eliminação do Paracetamol	16
2.6. Transcrição gênica	18
3. OBJETIVOS	19
3.1 Objetivo geral	19
3.2 Objetivo específico	19
4. MATERIAIS E MÉTODOS	19
4.1. Coleta e exposição	19
4.2. Extração de RNA e síntese de cDNA	21
4.3. PCR quantitativo em tempo real (RT-PCR)	21
4.4. Cálculo da eficiência dos iniciadores	23
4.5. Melting	24
4.6. Cálculo dos níveis de transcritos	24
4.7. Análise Estatística	24
5. RESULTADOS	26
5.1. Brânquias	26
5.2. Glândula Digestiva	30

6. DISCUSSÃO	33
7. CONCLUSÕES	36
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	36
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

1. INTRODUÇÃO

A zona costeira é uma área de extrema importância ao ser humano por apresentar inúmeros serviços ecossistêmicos. Entre estes destacam-se: pesca, fornecimento de energia e areia, vias para transporte, recreação e turismo (HOLLIGAN; BOOIS, 1993). Porém os serviços ecossistêmicos podem estar ameaçados pela intensa urbanização que ocorre nesta área. Devido à introdução de milhares de substâncias químicas presentes no esgoto sanitário, efluentes industriais e agrícolas, a poluição é um dos maiores problemas da zona costeira, podendo afetar a saúde dos organismos aquáticos (FREIRE et al., 2008), e conseqüentemente, do ser humano.

Segundo a Pesquisa Nacional de Saneamento Básico (PNSB, 2008), apenas 55,2% dos municípios brasileiros têm serviço de saneamento por rede coletora. A região Sul, por sua vez, apresenta um dos piores índices de tratamento de esgoto, resultando em cerca de 6,3 milhões de pessoas sem acesso ao serviço.

Os fármacos estão incluídos na categoria dos PPCP (*Pharmaceutical and Personal Care Products*) e são lançados no ambiente aquático principalmente através de esgotos municipais e hospitalares (CHRISTEN et al., 2010). Apesar dos baixos valores no meio ambiente, na faixa de partes por bilhão (ppb) a partes por milhão (ppm), seus efeitos ainda não são conhecidos por serem uma classe de contaminantes ambientais emergentes (PETROVIC, 2003).

Os PPCPs encontrados no ambiente aquático são oriundos de resíduos hospitalares, introdução direta por banho, lançamentos de medicamentos usados no controle de pragas, lixiviação de aterros, lançamentos da aquicultura (Fig. 1) (EPA, 2010).



Fig 1: Fontes de PPCPs. Fonte EPA 2010.

O paracetamol (PAR) é um anti-inflamatório não esteroidal (AINEs) amplamente utilizado como composto analgésico e antipirético, usado para reduzir febre e dores de cabeça. É facilmente encontrado em drogarias e não é necessária prescrição médica para o uso desse medicamento. Dessa forma, tem sido considerado o fármaco mais consumido no mundo e mais detectado no ambiente aquático (SOLÉ et al., 2010; CONTARDO-JARA et al., 2011; QUINN et al., 2011; GONZALEZ-REY; BEBIANNO, 2012). Fato preocupante porque este fármaco apresenta resistência à degradação no ambiente (BENDZ et al., 2005; SMPA, 2004; MAURER et al., 2007) e tem a capacidade de se bioacumular em tecidos biológicos (SCHWAIGER et al., 2004; SMPA, 2004). O uso ilimitado deste medicamento está ocasionando efeitos indesejáveis aos organismos aquáticos como, por exemplo, a indução de genes de resistência a antibióticos (BILA; DEZOTTI, 2003; REIS-FILHO et al., 2007; KRATZ, 2008).

No Brasil existem poucos estudos sobre a presença e os efeitos dos PPCPs no ambiente e nos organismos aquáticos (STUMPF et al., 1999; TERNES et al., 1999; PAMPLONA et al., 2010). Quando se trata de organismo de água marinha os estudos se tornam ainda mais escassos. Dessa forma esse trabalho propõe estudar os efeitos do fármaco PAR através da avaliação de possíveis biomarcadores moleculares em ostras *C. gigas*.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Organismo sentinela*

As características de um organismo sentinela ideal são: ampla distribuição geográfica, bioacumulação em seus tecidos, fácil identificação e tamanho suficiente para retirada de material (BEEBY, 2001). Sendo assim, os bivalves apresentam-se como uma boa escolha de organismos sentinela para programas de monitoramento do ambiente aquático (CARAJAVILLE et al., 2000). A *C. gigas* ocupa uma posição de destaque, por ser uma das espécies de molusco marinho mais cultivada no mundo (MAO et al., 2006).

2.1.1 *Crassostrea gigas*

A *C. gigas* (Fig. 2) pertence ao filo *Mollusca*, ordem *Ostreoida*, família *Ostreidae*, gênero *Crassostrea* (MARSHAL; GOFAS, 2015).



Fig. 2. Parte interior da *Crassostrea gigas* com indicação de diferentes tecidos (Fonte: GOMES, 2013).

A ostra *C. gigas* tem grande importância econômica e social para o estado de Santa Catarina. Com 129 ostreicultores, em 2014, a produção atingiu 3.670 t rendendo um valor estimado de 27 milhões de reais (EPAGRI, 2014) (Fig. 3).

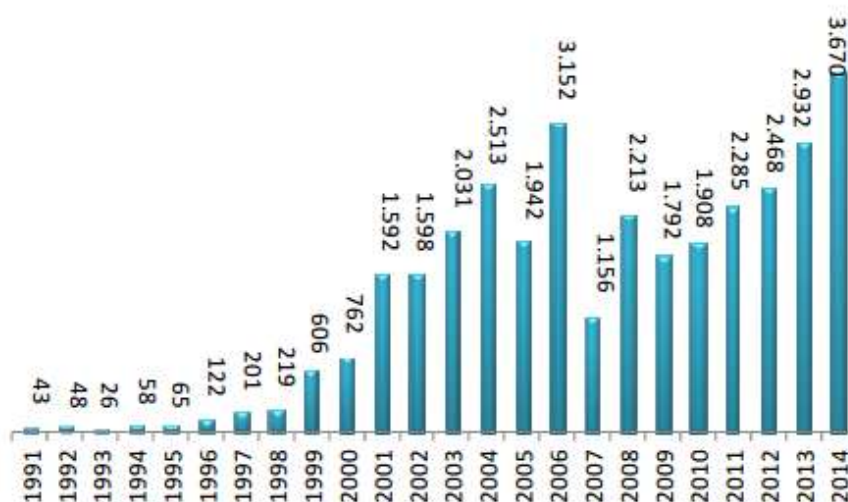


Fig. 3. Evolução da produção de ostras comercializadas em Santa Catarina entre 1991 e 2014 (t). (Fonte: EPAGRI, 2014).

2.2 Biomarcadores Moleculares

O uso de biomarcadores moleculares tem sido proposto como uma ferramenta de sinal de alerta precoce dos efeitos biológicos em programas de avaliações de qualidade ambiental (CARAJAVILLE et al., 2000). Biomarcadores são alterações biológicas a nível molecular, celular e/ou fisiológico que expressam os efeitos tóxicos causados pelos xenobióticos (LAM; GRAY, 2003; NIGRO et al., 2006). Por serem sensíveis a níveis de contaminação baixa podem ser usados de maneira preditiva e, ainda, para análise da remediação de áreas impactadas. Além disso, os biomarcadores moleculares têm a vantagem de medirem alterações nos organismos e não os metabólitos que podem ser excretados ou biotransformados pelo organismo (CARAJAVILLE et al., 2000).

2.3. Paracetamol (PAR)

O PAR, também conhecido como acetaminofeno ou APAP, é amplamente usado como medicamento contra febre e dor (AGHABABIAN, 2010; AHMAD, 2010). Este composto possui forma molecular $C_8H_9NO_2$ e consiste em um anel benzênico com um grupo hidroxila, e um átomo de nitrogênio do grupo amida na posição *para* (1,4) (FAYS et al., 2015) (Fig. 4).

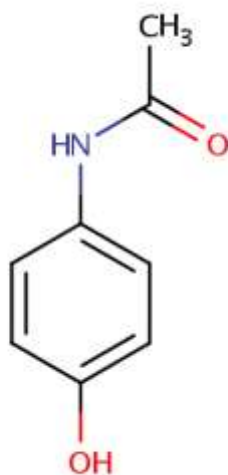


Fig. 4. Estrutura do paracetamol (fonte: WISHART et al 2006 em <Drugbank.ca>, acessado em: 8 de novembro de 2015).

2.4 Mecanismo de ação do paracetamol

Fármacos são designados a alvos específicos nos caminhos metabólicos e moleculares em humanos e animais. Quando introduzidos no ambiente eles podem afetar o mesmo ou um caminho semelhante em vertebrados e invertebrados com alvos idênticos ou similares (CHRISTEN et al., 2010).

Em humanos, a ação anti-inflamatória dos AINEs se baseia na capacidade de promover a inibição não seletiva das isoformas da ciclooxigenase (*COX-1* e *COX-2*), que regulam a biosíntese das prostaglandinas (PGs) a partir do ácido araquidônico (AA) ligado aos fosfolípidos de membrana (FENT et al., 2006; RAO; KNAUS, 2008). Efeitos similares foram observados com homólogos *COX 1* e *2* em alguns peixes (ZOU et al., 1999; ROBERTS et al., 2000). Em mamíferos, a primeira é expressa constitutivamente ao longo do corpo e é de importância para a proteção gastrointestinal. A segunda é expressa nos locais de inflamação, sendo que sua expressão é aumentada por citocinas, fatores de crescimento e estímulos inflamatórios (HAWKEY, 2001). A partir do AA, os eicosanóides, mediadores inflamatórios de origem lipídica e sintetizados a partir dos ácidos graxos ômega-6 ou ômega-3 (CALDER 2006), se formam através de três vias de metabolização que regulam a inflamação, transporte de íons e a função reprodutiva. As vias de metabolização são: PGs e tromboxano (via das *COXs*), leucotrienos e lipoxinas (via lipoxigenase, *LOX*) e ácidos epoxieicosatrienóicos (via *CYP P450*) (HECKMANN et al., 2008) (Fig. 5).

Inflamação e n-3 ácidos graxos poli-insaturados

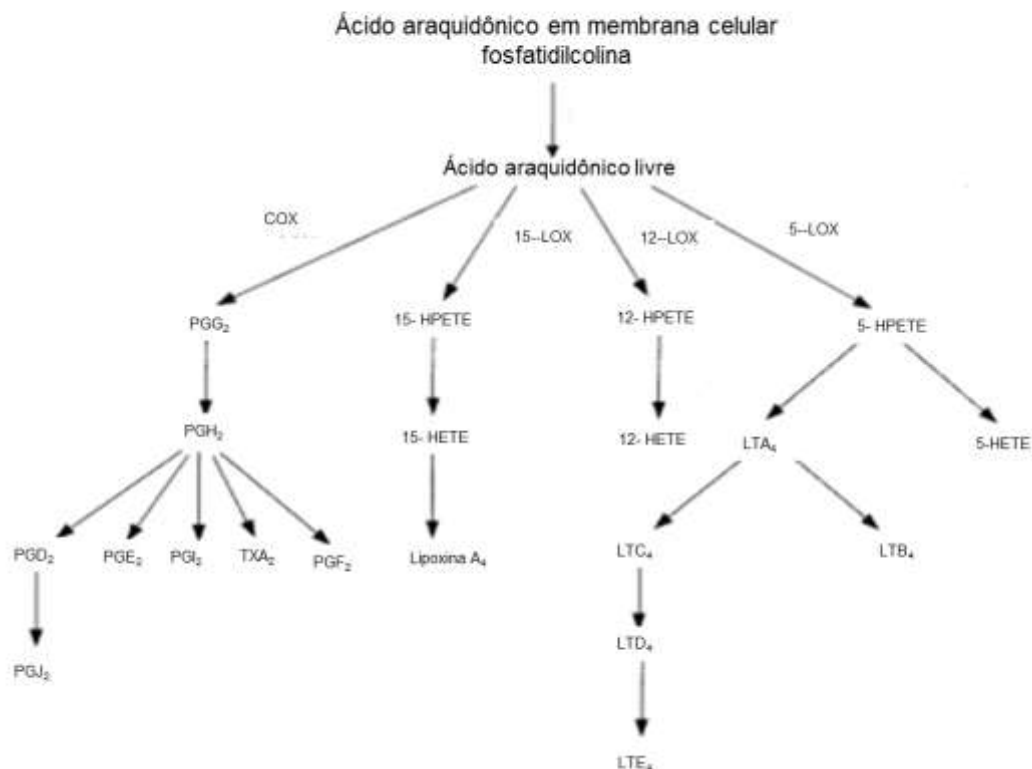


Fig. 5. Via geral da conversão do ácido araquidônico em eicosanóides. *COX*- cicloxigenases, HETE- ácido epoxieicosatrienóico, HPETE- ácido hidroxiepoxieicosatrienóico, *LOX*- Lipoxigenase, LT- leucotrieno; PG- prostaglandina; TX- tromboxano. Fonte: Traduzido de CALDER, 2006.

Estudos recentes sugerem que o acetaminofeno é altamente seletivo para *COX-2* em humanos (HINZ; CHEREMINA; BRUNE, 2008).

Pedibhota et al. (1995) realizou um estudo em moluscos e deduziu que a atividade *COX* nestes animais é, também, aparentemente responsável pela formação de prostaglandinas. Estas são encontradas em uma diversidade de vertebrados e invertebrados (FENT et al., 2006). Em invertebrados, as PGs atuam como hormônios em funções fisiológicas associadas a reprodução (desenvolvimento das gônadas e desova) transporte de água, equilíbrio iônico e defesa química (OSADA; NOMURA, 1990; ROWLEY et al., 2005).

2.5 Mecanismo de eliminação do Paracetamol

Apesar de sua segurança quando utilizado corretamente, o envenenamento por PAR é um dos eventos mais comuns relatados nos centros de intoxicações. Uma

intoxicação aguda resulta em uma lesão hepática, que pode evoluir para insuficiência hepática fulminante, levando à morte (HONDGMAN; GARRARD, 2012).

Em humanos, aproximadamente 85 % de uma dose terapêutica de acetaminofeno é submetida a conjugação (biotransformação de fase II) formando metabólitos glicuronados e sulfatados que são eliminados pelos rins (HONDGMAN; GARRARD, 2012).

Até 10 % do PAR sofre oxidação (biotransformação de fase I) para um intermediário reativo, N-acetil-para-benzoquinonaimina (NAPQI), que normalmente é conjugado com glutathiona formando metabólitos de cisteína e mercapturatos não tóxicos (GELOTTE et al., 2007). A figura 6 mostra o mecanismo de eliminação do PAR em humanos.

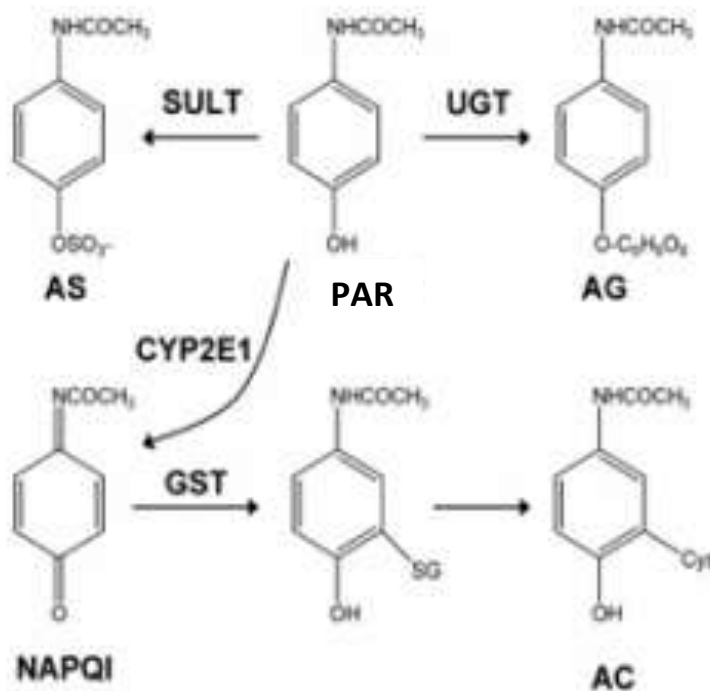


Fig. 6. Metabolismo do Paracetamol. **PAR** – Paracetamol, **AS** - Sulfato de acetaminofeno; **AG** - Glicuronídeo de acetaminofeno; **NAPQI** – N-acetil-p-N-acetil-p-benzoquinonaimina; **AC** - Acetaminofeno-cisteína metabólito; **SULT** - Sulfotransferase; **UGT** – UDP-glicuronídeo transferase; **GST** - Glutathiona S transferase. (Fonte: SHINODA et al., 2007).

A ativação metabólica de PAR para NAPQI pelo *Citocromo p450* (principalmente *CYP2E1*, *CYP3A4* e *CYP1A2*) é um evento crítico de início de toxicidade hepática (WANG et al., 2015). Isso acontece pois em doses tóxicas de PAR, a produção continuada de NAPQI resulta na depleção de glutathiona (GSH). Quando os

estoques de glutatona se esgotam em cerca de 70%, o NAPQI liga-se a proteínas celulares e leva a lesão celular (MITCHEL et al., 1973).

A depleção da glutatona é apenas uma parte de uma cascata de eventos intracelulares que incluem estresse oxidativo mitocondrial, geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, ativação de proteína de estresse e mediadores de transcrição gênica, e mobilização de sistema imune inato do fígado. O balanço entre essas inúmeras possibilidades pode determinar a recuperação ou morte celular (HONDGMAN; GARRARD, 2012).

2.6. Transcrição gênica

O genoma dos diferentes organismos possui milhares de genes, porém apenas uma fração destes é expressa a cada momento. Dado o alto custo da síntese de proteínas, a regulação da transcrição gênica é essencial para a célula utilizar a energia disponível da melhor maneira possível (SCHWANHÄUSSER et al., 2011). É estimado que a partir dos blocos de construção (nucleotídeos e aminoácidos) a síntese de proteínas consome mais de 90% de fosfatos de alta energia, enquanto que para a transcrição são necessários 10% (SCHWANHÄUSSER et al., 2011).

O aumento ou a diminuição da transcrição gênica caracteriza-se entre as primeiras respostas moleculares dos organismos frente a qualquer estímulo endógeno ou ambiental. Assim, quando organismos são expostos a contaminantes, uma maneira precoce de avaliar mais precisamente o risco potencial de exposição a estes compostos é através da avaliação da transcrição de determinados genes alvo de ação dos contaminantes, ou mesmo de uma avaliação global de transcritos (SARKAR; AMULYA; SHRIVASTAVA, 2006). Portanto, tem sido mais frequente a utilização destas ferramentas moleculares como biomarcadores de exposição e efeito aos diferentes tipos de contaminantes ambientais (CARAJAVILLE et al., 2000).

Estudos recentes demonstram a utilização dos níveis de transcritos para avaliação dos impactos causados por derivados de petróleo e substâncias presentes no esgoto sanitário (FLORES-NUNES et al., 2015; MATTOS et al., 2010; MEDEIROS et al., 2008; SERRANO et al., 2015).

3. OBJETIVOS

3.1. *Objetivo geral*

Esse trabalho propõe estudar os efeitos do fármaco PAR através da avaliação de possíveis biomarcadores moleculares em ostras *C. gigas*.

3.2. *Objetivos específicos*

Analisar os níveis de transcritos dos genes (*COX*), os *citocromo p450 (CYPs)* *30C1*, *C3071A1*, *2AU2*, *356A1*, *catalase (CAT)*, *Caspase (CASP)*, proteínas ligantes de ácido graxo (*FABP*), *glutathiona - S transferase π (GST π)*, *glutathiona - S transferase ω (GST ω)*, proteínas de choque térmico (*HSP 70*) e *superóxido dismutase (SOD)* em brânquias e glândula digestiva de ostras *C. gigas* expostas a diferentes concentrações de PAR.

Avaliar comparativamente, nesses tecidos, os níveis de transcritos após 1, 4 e 7 dias de exposição ao PAR nestas duas concentrações.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. *Exposição e Coleta*

As ostras *C. gigas* (6 – 7 cm) foram coletadas na praia Sambaqui - área de cultivo do Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Posteriormente foram selecionadas, limpas de incrustações e transportadas até uma sala de aclimação, onde permaneceram por um período de 12 dias sob condições controladas: água do mar filtrada (0,45 μm), temperatura constante (24°C), salinidade (30 psu), aeração constante e alimentação de manutenção (mix: 50% de 10×10^4 cél mL^{-1} *Isochrysis galbana*; 50% de 10×10^4 cél mL^{-1} *Chaetoceros muelleri*).

Após a aclimação, as ostras foram transportadas para a sala de bioensaios do Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica (LABCAI). A exposição foi realizada em três aquários de vidro de 60 litros (n=50 ostras/aquário) (Fig. 7), sendo que cada um continha 50 L de água do mar natural filtrada. Foram realizados dois tratamentos com concentrações distintas (1 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$) de PAR (N-Acetil-4-aminofenol) e um controle (água do mar + etanol 0,002%). Durante o

período de exposição, as ostras foram alimentadas uma vez ao dia, duas horas antes da troca de água, com a mesma dieta da aclimatação. Primeiramente toda a água dos aquários era retirada, a seguir ocorria limpeza das paredes internas destes e das valvas das ostras com água do mar. Essa água da limpeza era retirada e, em seguida, adicionada uma água contendo a mistura de microalgas sem o contaminante. Depois de 2 horas era realizada uma nova limpeza das paredes internas dos aquários e das valvas das ostras. Novamente o aquário era totalmente esvaziado e, em seguida, preenchido com água contendo PAR nas concentrações citadas; e no controle foi usado somente o veículo etanol.



Fig. 7. Aquários com ostras expostas a PAR.

Grupos de 10 ostras foram coletados de cada tratamento (PAR) e controle (CT) após 1, 4 e ao final de 7 dias. Os animais foram medidos, pesados e dissecados para a retirada das brânquias e glândula digestiva. As amostras destes tecidos foram colocadas em tubos criotubos (2 ml) com RNAlater® e armazenados em freezer (-20°C) para posterior extração de RNA. Após cada período de exposição, o nível de água de cada aquário foi reduzido em 10 litros, mantendo, assim, a proporção 1 animal: 1 litro de água.

4.2. Extração de RNA e síntese de cDNA

Para a análise da transcrição gênica foram utilizadas amostras de brânquias e glândula digestiva (100 mg) de 10 animais de cada grupo para cada tempo.

O RNA foi extraído de acordo com o protocolo do fabricante com o reagente de lise QIAzol (QIAGEN, 2009a). A concentração em cada amostra foi determinada utilizando um espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 a 260 nm (fator: RNA - 40).

Para a síntese do cDNA foi utilizado 1µg de RNA de cada amostra seguindo os procedimentos da QuantiTect® (QIAGEN, 2009b). A quantificação de cada amostra de cDNA transcrito foi medida usando espectrofotômetro NanoDrop a 260 nm (fator: ADNcs - 33). O cDNA sintetizado então foi diluído para uma concentração de 12,5 ng µL⁻¹

A partir de algumas amostras de cDNA, a curva padrão foi preparada por diluição seriada com as seguintes concentrações 400 – 200 – 100 – 50 - 25 ng foi usada em cada uma das corridas de RT-PCR.

4.3. PCR quantitativo em tempo real (RT-PCR)

Iniciadores foram desenhados utilizando-se o software PrimerQuest® OligoAnalyzer® com base nas sequências de mRNA completos ou parciais de cada gene obtidos através da base de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI). Os genes analisados foram *CAS*, *CAT*, *COX*, *CYP 2A2*, *CYP 30C1*, *CYP 3071A1*, *CYP 356A1*, *FABP*, *GST π*, *GST ω*, *HSP 70* e *SOD* (Tabela 1).

Tabela 1: Sequência de iniciadores (senso e anti-senso), utilizados para a quantificação de cada gene nas brânquias e glândula digestiva das ostras expostas a PAR.

Gene	Iniciador	Número de acesso
Genes de interesse		
<i>COX senso</i>	CCGTATTCTGTGAAGGGTCTGATGGCAA	FJ375303.2
<i>COX anti-senso</i>	GAACCCAACCTCTCCACCAAACGTAGAA	
<i>Caspase senso</i>	AAGCGATGAGCCCAGAGTGTGTTTCT	HQ425703.1
<i>Caspase anti-senso</i>	CGCTGTCTGTATTGTAGTGGCAACTGGT	
<i>CYP 30C1 senso</i>	TCTAAAGCCGGACTCTTGAAGCCAGA	EKC28276.1
<i>CYP 30C1 anti-senso</i>	TTTCGCCTTTCAGGTGCGTGGTTC	
<i>CATALASE senso</i>	AGCTAATCGTTTGTCTGCCGAGGA	EF687775.1
<i>CATALASE anti-senso</i>	ACACTTTGGTCACATCGAACGGGT	
<i>SOD senso</i>	GGCCCTCAATCCATCATTGGAAGA	AJ496219
<i>SOD anti-senso</i>	TGATACCGATCATCCACAAGCCA	
<i>CYP356A1 senso</i>	ATGAAACCCGCGAAACCAGA	EF645271
<i>CYP356A1 anti-senso</i>	TAAATTCGGCTTCACGCCCT	
<i>CYP3071A1 senso</i>	ACCGTGTGTGTTTAGGCTCG	EKC42568.1
<i>CYP3071A1 anti-senso</i>	CTGTTTGTTAGTCCTGCGTTCGG	
<i>CYP2AU2 senso</i>	GCCACTTCTAGTCCATCTTCACCTGC	EKC26764.1
<i>CYP2AU2 anti-senso</i>	GCTCTTCGATTACTT CATTGCGAACCC	
<i>FABP senso</i>	TCCGACGGAAAGATGATGACGCTTT	EU069496
<i>FABP anti-senso</i>	ACGCCATTGCATGTTGCTGT	
<i>GST Ω senso</i>	TGATGAGTTCACCACCGCAA	AJ557140
<i>GST Ω anti-senso</i>	TTCAAACCATGGCCACAGCA	
<i>GST π senso</i>	CACCATTACGACTTTGTGGCAGA	AJ557140
<i>GST π anti-senso</i>	TCAGCCATTTTCGGTAG	
<i>HSP 70 senso</i>	ACCCGTTCCAGAGTTCTTGGGTTT	ABJ55915
<i>HSP 70 anti-senso</i>	ATCGGACGAGGGCCACAGTTATT	

Genes Normalizadores

<i>β-TUB senso</i>	CCAGCAGATGTTTCGACGCCAAGAA	AB296534
<i>β-TUB anti-senso</i>	AACRGGCAGCAACGGTGAGGTAG	
<i>GAPDH senso</i>	AAGCAACAAGGATTGGCGTGGT	CAD67717
<i>GAPDH anti-senso</i>	AACTGGTACGCGGAAAGCCATT	

As reações em PCR em tempo real das amostras foram realizadas com 100 ng de cDNA molde por reação. Foi seguida a metodologia do kit QuantiFast® SYBR® Green PCR (QIAGEN, 2011) e utilizou-se um termociclador em tempo real Rotor Gene Q Qiagen® e o software Rotor Gene 6000 Series.

O volume total em cada reação foi de 20 µL, sendo 8µl de amostra (100 ng de cDNA), 10 µL de Syber Green, onde contém dentro de outras substâncias o fluoróforo a ser detectado no equipamento, e 1 µL de cada iniciador (senso e anti-senso). As condições de ciclagem foram definidas como: 1) Ativação da PCR por calor (95 °C por 5 min.); 2) Desnaturação (95 °C por 10 s) e 3) Combinado de anelamento/extensão (60°C por 30 s). Para todas as reações foram realizados 40 ciclos de desnaturação e anelamento/prolongamento.

4.4. Cálculo da eficiência dos iniciadores

O software Rotor Gene 6000 Series calcula a eficiência dos iniciadores a partir da curva padrão. Para um determinado *threshold* são obtidos valores de ciclo (eixo x) que corresponde ao ciclo de amplificação do RT-PCR. O cálculo da eficiência dos iniciadores é feito com base na quantidade de cDNA e no ciclo de amplificação no *threshold* (CT). A eficiência da amplificação do RT-PCT deve estar entre 90 e 110% (PAOLETTI E MAZZARA, 2005) (Figura 8).

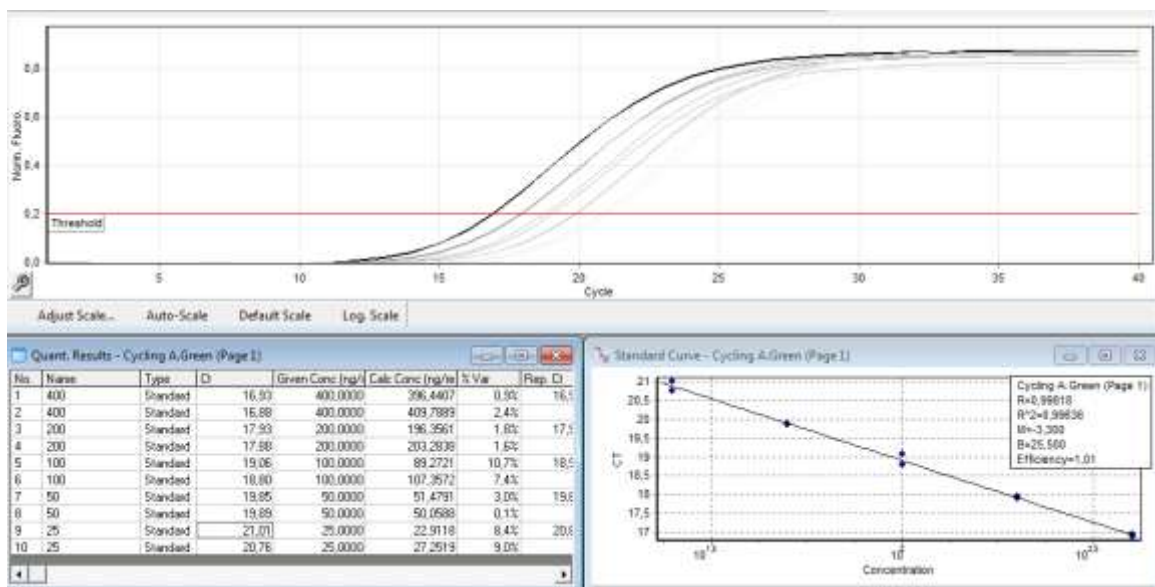


Fig 8. Curva padrão e cálculo de eficiência da curva pelo software software Rotor Gene 6000 Series.

4.5. Melting

A análise da curva de *melting* foi feita após a corrida do RT-PCR seguindo a seguinte programação: rampa de aquecimento iniciando em 55 °C, com aumento de 1°C a cada passo, 5 s de intervalo entre os passos, finalizando em 95 °C (Figura 5). O *melting* é realizado para observar se existem diferentes produtos da RT-PCR e verificar a qualidade dos iniciadores.

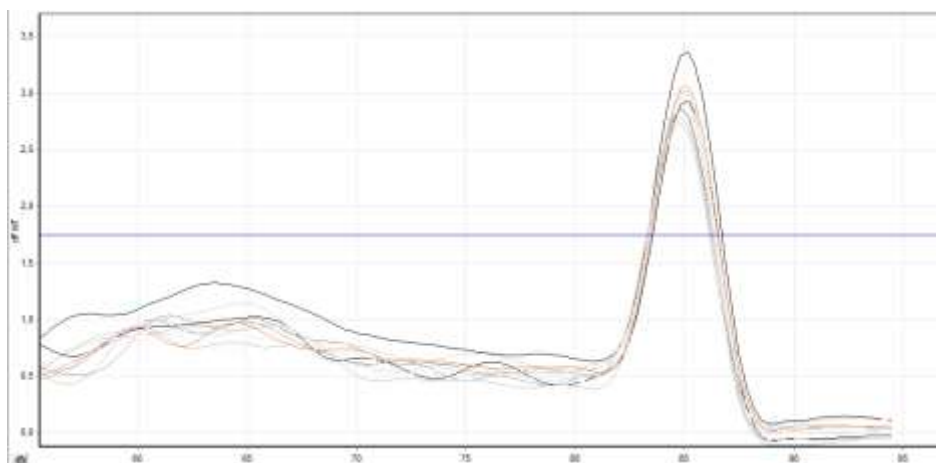


Fig. 9. Exemplo de uma curva de *melting*. O eixo y representa a taxa de variação da fluorescência com a temperatura e o eixo x, a temperatura de aquecimento.

4.6. Cálculo dos níveis de transcritos

Os resultados CT foram exportados para uma planilha de Excel. A transcrição dos genes normalizadores *GAPDH* e *B-Tubulina* foi utilizada para o cálculo da transcrição diferencial entre os grupos pelo método do $2^{-\Delta\Delta CT}$ (SCHMITTGEN; LIVAK, 2001).

Os resultados para cada um dos genes de interesse foram então calibrados em relação à média dos seus respectivos controles para uma melhor visualização dos gráficos.

4.7. Análise Estatística

A análise das diferenças significativas foram realizadas comparando o nível de transcrição de cada gene entre os diferentes tratamentos. Não foram realizadas análises estatísticas da transcrição gênica diferencial entre os diferentes tempos e nem entre os diferentes tecidos pois a extração do RNA em cada tempo e tecido ocorreram em dias diferentes.

Os *outliers* foram retirados através do teste de Grubss, resultando num n de 5 a 10 animais para a análise estatística.

A análise estatística e os gráficos foram elaborados utilizando o software GRAPHPAD PRISM 5.01. O teste Shapiro-Wilk foi utilizado para verificar a normalidade, e o de Bartlett's, homocedasticidade. Os dados não normais foram ainda transformados usando $Y = \text{LOG}(Y)$. Os dados homocedásticos foram submetidos a uma ANOVA de uma via com pós teste de Tukey ($p < 0,05$). Os resultados que não se apresentaram normais ou homocedásticos foram submetidos ao teste não paramétrico Kruskal-Wallis com pós teste de Duns ($p < 0,05$)

5. RESULTADOS

Todas as análises de RT-PCR apresentaram eficiências entre 95 e 105 % e somente um pico de fluorescência na curva de *melting*. Nas análises dos resultados obtidos com a glândula digestiva dos animais expostos por 24 h, foi utilizado o normalizador β -*Tubulina*. O gene *GAPDH* foi utilizado como gene normalizador nos demais grupos (Fig. 10).

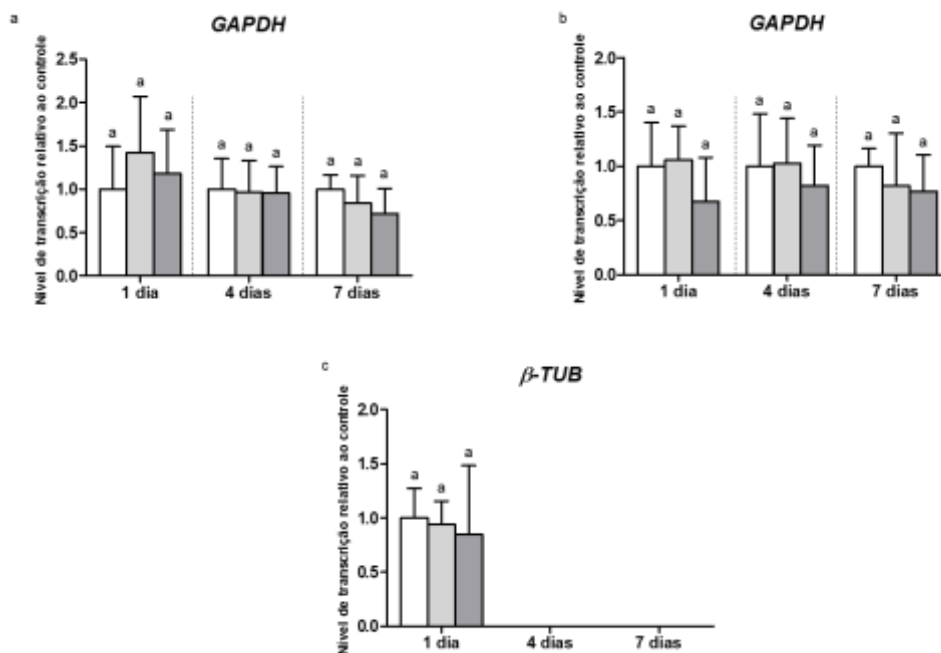


Fig. 10. Níveis de transcritos dos genes normalizadores em diferentes tratamentos (Controle, 1 $\mu\text{g L}^{-1}$, 100 $\mu\text{g L}^{-1}$) nos tempo de 1, 4 e 7 dias. *GAPDH* em brânquias (a), b- *GAPDH* em glândula digestiva (b), β -*Tubulina* em glândula digestiva (c) de *C. gigas*. Os resultados foram normalizados em relação ao controle. Letras diferentes indicam diferença significativa em cada tempo ($p < 0,05$). N= 6 a 10.

5.1. Brânquias

Nas brânquias dos animais expostos por 24h os genes que apresentaram transcrição significativamente menores de mRNA no tratamento 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ em relação controle (CT) foram *CYP 3071A1* (0,3 vezes) (Fig. 11a), *CYP 30C1* (0,2 vezes) (Fig. 11b), *FABP* (0,4 vezes) (Fig. 12b), *SOD* (0,7 vezes) (Fig. 12c), O gene *FABP* também apresentou menores níveis de transcrição do tratamento 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ em relação ao controle (0,5 vezes) (Fig. 12b).

Nas brânquias dos animais expostos por 4 dias a $100 \mu\text{g L}^{-1}$ PAR foram observados níveis mais elevados de transcritos dos genes *COX* (1,5 vezes) (Fig. 12a), *GST π* (1,4 vezes) (Fig. 11b) e *CASP* (1,8 vezes) (Fig. 12f).

Após 7 dias de exposição a PAR $1\mu\text{g L}^{-1}$ foi observado uma menor taxa de transcritos do gene *GST π* (0,6 vezes) (Fig. 11f).

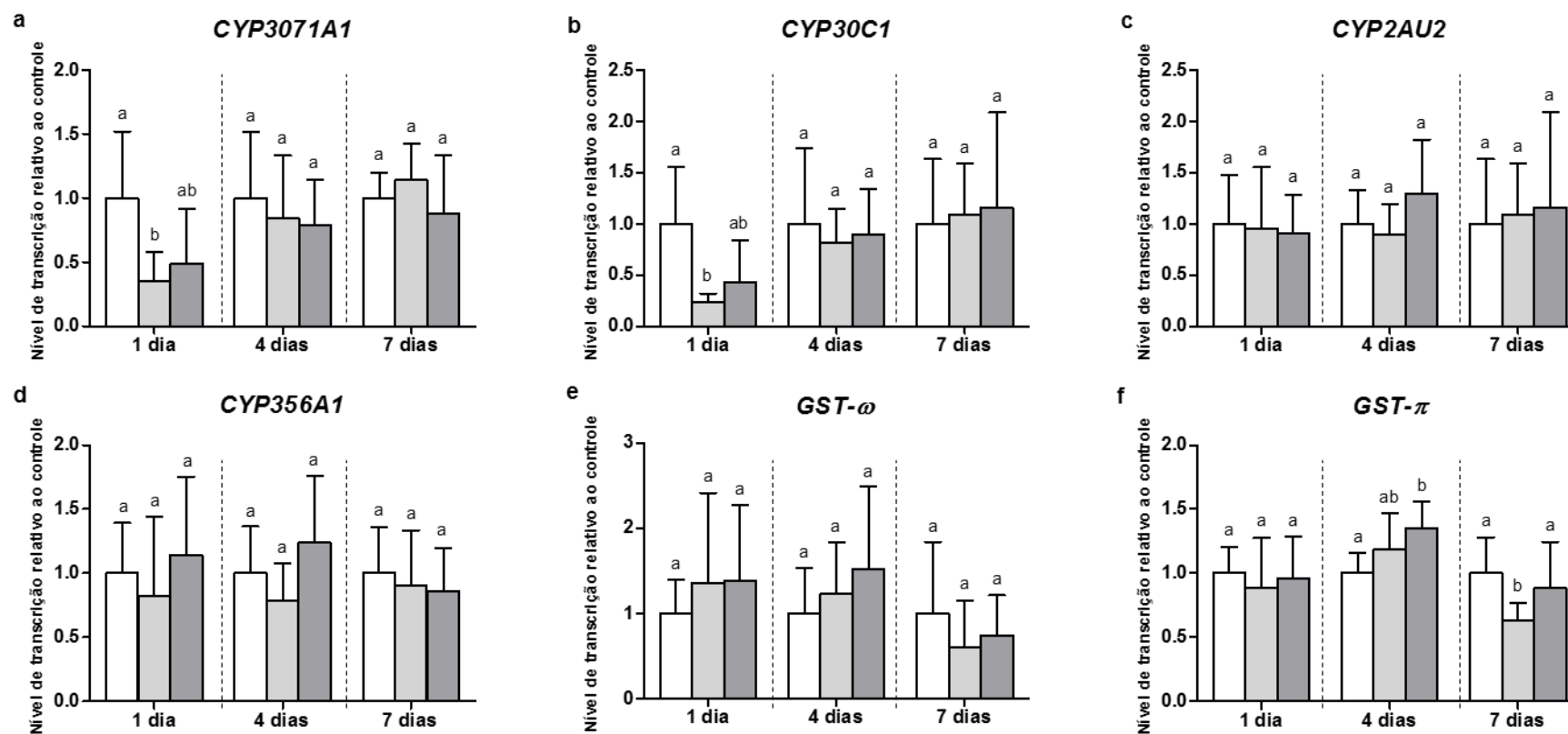


Fig. 11. Níveis de transcritos dos genes *CYP30C1* (a), *CYP 3071A1* (b), *CYP2AU2* (c), *CYP356A1* (d), *GST-ω* (e), *GST-π* (f) em diferentes tratamentos (Controle, 1 µg L⁻¹, 100 µg L⁻¹) em brânquias de *C. gigas* nos tempos de 1, 4 e 7 dias. Os resultados foram calibrados em relação ao controle. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa em cada tempo (p < 0,05). N= 5 a 10.

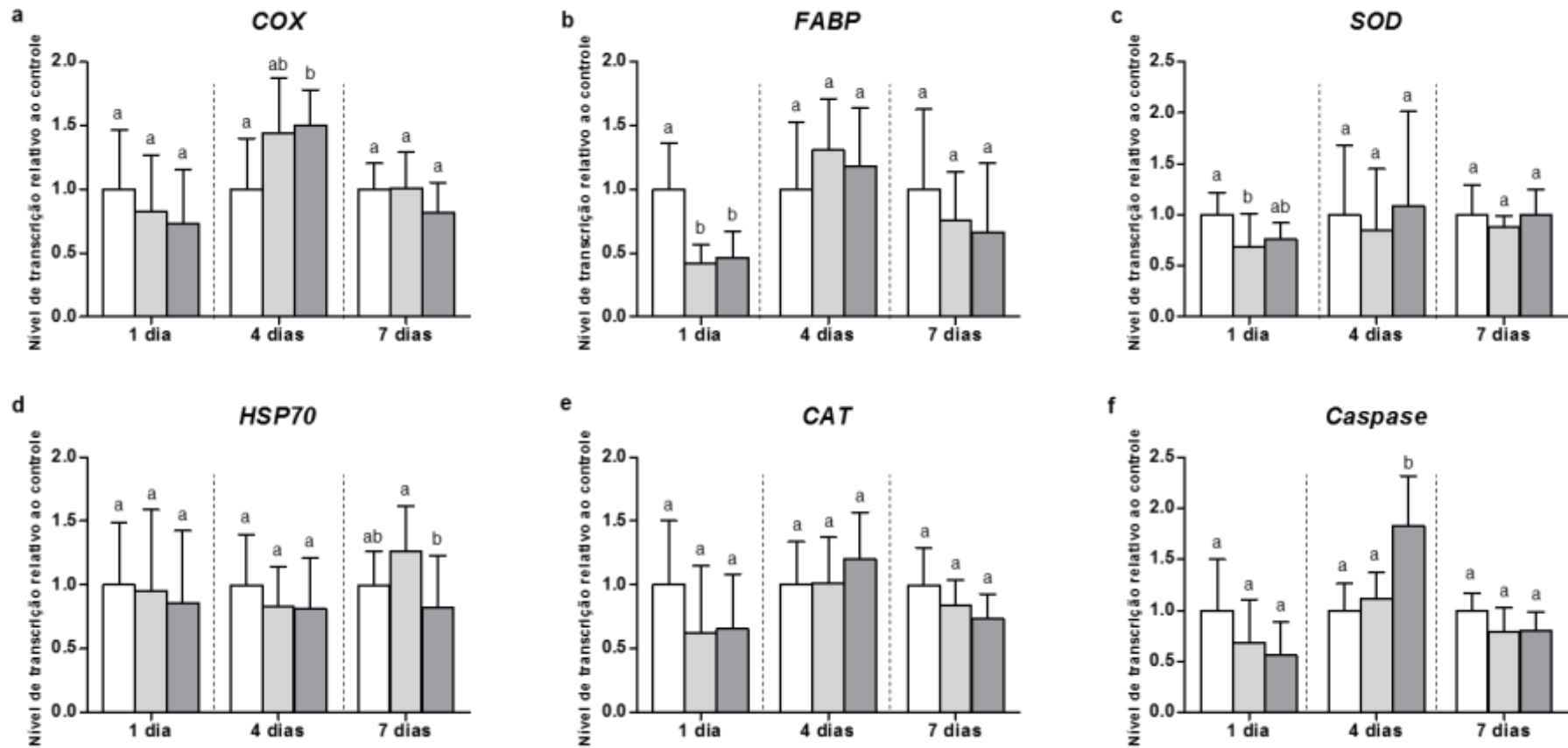


Fig. 12. Níveis de transcritos dos genes *COX* (a), *FABP* (b), *SOD* (c), *HSP70* (d), *CAT* (e), *Caspase* (f) em diferentes tratamentos (Controle, 1 µg L⁻¹, 100 µg L⁻¹) em brânquias de *C. gigas* no tempo de 1, 4 e 7 dias. Os resultados foram calibrados em relação ao controle. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa em cada tempo ($p < 0,05$). N= 5 a 10.

5.2. *Glândula digestiva*

Após 1 dia de exposição ao PAR $100 \mu\text{g L}^{-1}$ foi observado um aumento nos transcritos do gene *COX* (3,6 vezes) (Fig. 14a).

Um maior nível de transcritos dos genes *GST π* (Fig. 13f) e *SOD* (Fig. 14c), de 1,8 e 1,5 vezes, respectivamente, em relação ao controle foi observado na glândula digestiva das ostras expostas por 4 dias a PAR $100 \mu\text{g L}^{-1}$.

Após 7 dias de exposição a PAR as diferenças significativas nos níveis de transcritos observadas foram: *GST π* (1,3 vezes maior) no tratamento de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ (Fig. 14f) e *GST ω* (0,5 vezes menor) no tratamento $1 \mu\text{g L}^{-1}$ em relação ao controle (Fig. 14e)

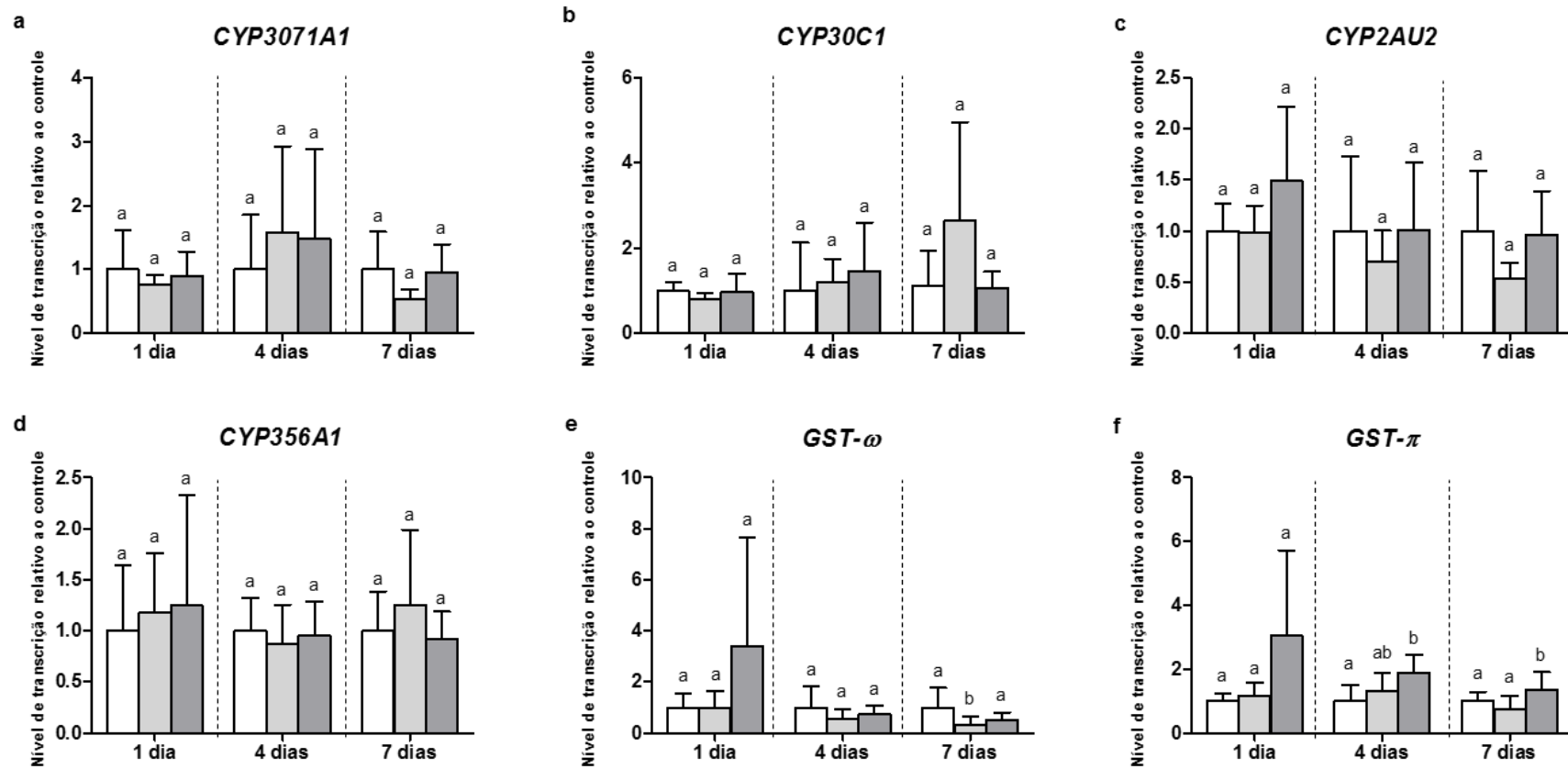


Fig. 13. Níveis de transcritos dos genes *CYP30C1* (a), *CYP 3071A1* (b), *CYP2AU2* (c), *CYP356A1* (d), *GST- ω* (e), *GST- π* (f) em diferentes tratamentos (Controle, 1 $\mu\text{g L}^{-1}$, 100 $\mu\text{g L}^{-1}$) em glândula digestiva de *C. gigas* nos tempos de 1, 4 e 7 dias. Os resultados foram calibrados em relação ao controle. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa em cada tempo (p < 0,05). N= 5 a 10.

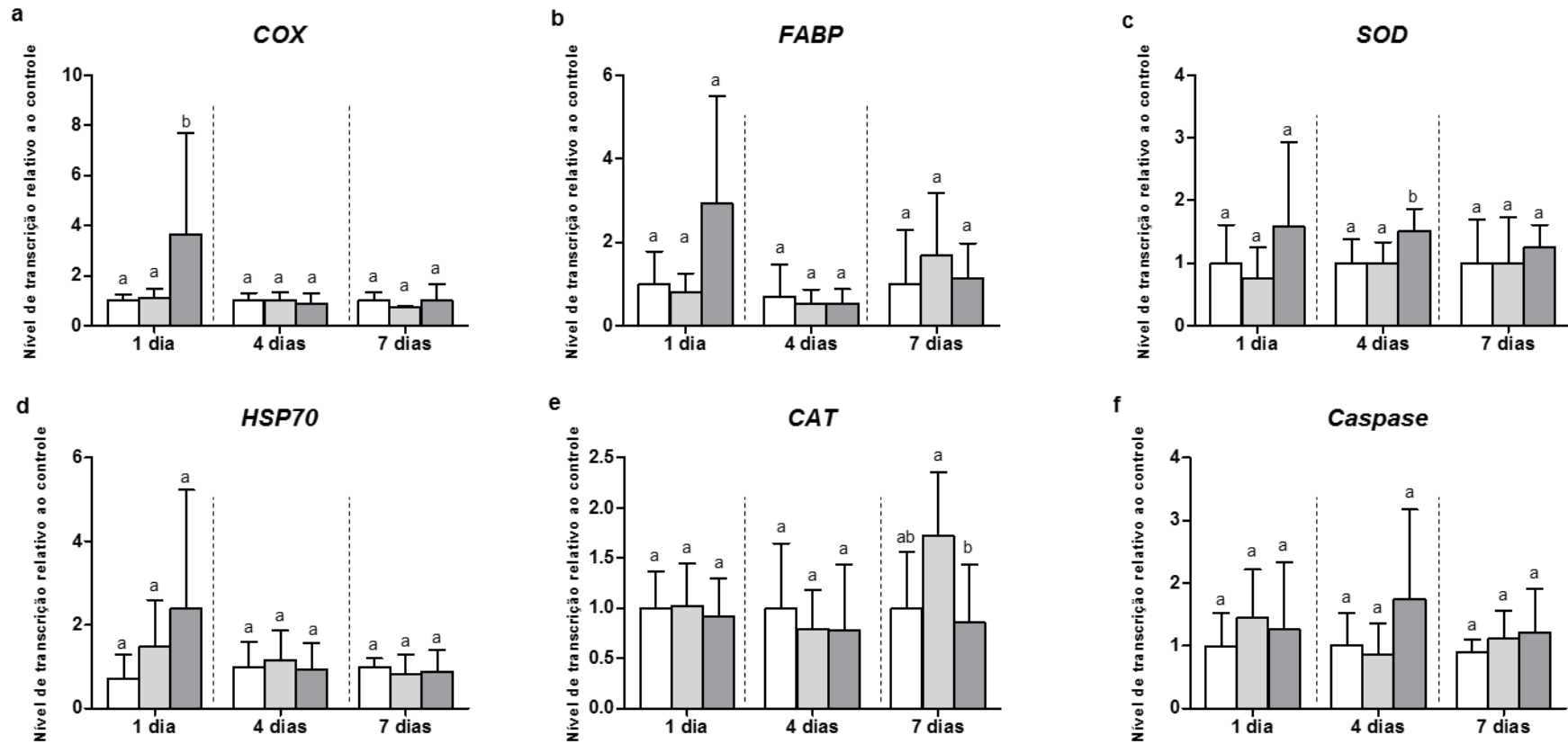


Fig. 14. Níveis de transcritos dos genes *COX* (a), *FABP* (b), *SOD* (c), *HSP70* (d), *CAT* (e), *Caspase* (f) em diferentes tratamentos (Controle, 1 µg L⁻¹, 100 µg L⁻¹) em glândula digestiva de *C. gigas* no tempo de 1, 4 e 7 dias. Os resultados foram calibrados em relação ao controle. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa em cada tempo ($p < 0,05$). N= 5 a 10.

6. DISCUSSÃO

A família CYP450 tem um papel importante na biotransformação de diversos xenobióticos e drogas terapêuticas. Após 1 dia de exposição a PAR, na concentração de $1\mu\text{g L}^{-1}$, foi observada uma diminuição na transcrição de dois genes *CYPs* (*CYP3071A1* e *CYP30C1*) (Fig. 11a e 11b) nos animais expostos, diferentemente do observado por SERRANO et al. (2015), onde ostras *C. gigas* expostas a ibuprofeno apresentaram induções dos genes *CYP2AU2*, *CYP356A1* e *CYP3071A1* em brânquias.

Em humanos cerca 10% do PAR é metabolizado à NAPQI pelas enzimas da família citocromo P450 (GELOTTE et al., 2007). Altas concentrações de NAPQI causam a redução na quantidade de GSH luminal do retículo endoplasmático causando um desbalanço no tampão redox desta organela. O estado redox deste último é altamente ligado a homeostase dos dobramentos de proteínas (CAO; KAUFMAN, 2014). Pequenas mudanças neste estado, causadas por agente redutores ou oxidantes, podem levar a uma desregulação no dobramento de proteínas (CAO; KAUFMAN, 2014), que por sua vez podem ativar o sensor *inositol requiring kinase* (IRE1), localizado na membrana do retículo endoplasmático (HUR et al., 2012). Estudos anteriores demonstraram que a ativação da IRE1 protegeu ratos contra hepatotoxicidade induzida por PAR através da degradação de RNA mensageiros de dois *CYPs* (*IA2* e *2E1*) envolvidos na geração do metabólito NAPQI (HUR et al., 2012). Portanto, pode-se especular que um mecanismo semelhante tenha ocorrido nas brânquias de ostras expostas ao PAR causando a diminuição da transcrição dos genes *CYP30C1* e *CYP3071A1*. Estudos subsequentes sobre a capacidade de *CYP30C1* e *CYP3071A1* gerar metabólitos de PAR pró-oxidativos são necessários para comprovar esta hipótese.

A hipótese de uma ativação da IRE1 nas brânquias também pode estar associada ao aumento na transcrição do gene *CASP* observado nos animais expostos por 4 dias a PAR $100\mu\text{g L}^{-1}$ (Fig. 12f), com base nos resultados de UPTON et al. (2012) que observaram que a ativação da IRE1 α causou indução do gene *CASP* através da degradação de microRNAs anti-caspase. Desta forma possivelmente estaria sendo estabelecida uma condição inicial do estabelecimento de morte celular.

A COX-2 é responsável pela oxidação e conversão do ácido araquidônico dos fosfolípidos de membrana em prostaglandinas G2 e prostaglandinas H2 (CALDER, 2006). Em mamíferos o PAR age inibindo a ciclogênase-2 interferindo na síntese de prostaglandinas (FENT et al. 2006; GIERSE et al. 1999; RAO; KNAUS 2008).

Neste trabalho, foi observado um aumento no nível de transcrição do gene *COX* na glândula digestiva após 1 dia de exposição a PAR 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Fig. 14a) e nas brânquias após 4 dias (Fig. 12a) de exposição nesta mesma concentração. SERRANO et al. (2015) também observaram um aumento no nível de transcrição do gene *COX* em brânquias de *C. gigas* expostas a ibuprofeno – analgésico que também age inibindo a síntese de prostaglandinas. Segundo os autores, esse aumento possivelmente está associado a um mecanismo compensatório pela inibição da atividade COX. A indução da transcrição gênica em resposta a inibição farmacológica de enzimas é consistente com a relação inversa entre a atividade enzimática e o nível de transcrição de seus genes codificadores (LEE, 2007). Para reforçar esta hipótese, a inibição da enzima COX foi observada por GAGNÉ et al. (2005) em mexilhões de água doce injetados com ibuprofeno, evidenciando a possibilidade de um efeito inibitório da COX em bivalves, similarmente ao que acontece em mamíferos. No entanto, são necessários outros estudos para confirmar esta hipótese, uma vez que a atividade enzimática COX não foi quantificada no presente estudo.

As proteínas ligantes de ácidos graxos (FABPs) são pequenas proteínas citosólicas que se ligam não-covalentemente a ligantes hidrofóbicos, principalmente ácidos graxos de cadeia longa e colesterol (ESTEVES; EHLRICH, 2006). Estas proteínas desempenham um papel funcional no transporte intracelular e metabolismo de lipídeos. As FABPs transportam uma variedade de compostos hidrofóbicos além dos ácidos graxos, desde moléculas endógenas como o grupo heme, ácidos biliares e eicosanóides, até drogas exógenas e poluentes ambientais (ESTEVES; EHLRICH, 2006). Nesse estudo foi mostrada uma diminuição da transcrição do gene *FABP* nos animais expostos por 1 dia nas duas concentrações de PAR (Fig. 12b), diferentemente do observado por outros autores que verificaram uma indução do gene *FABP* em resposta a ibuprofeno (SERRANO et al., 2015) e esgoto sanitário (MEDEIROS et al., 2008; FLORES-NUNES, 2013), porém o mecanismo da modulação gênica do *FABP* não é conhecido (FLORES-NUNES, 2013).

A *SOD* é uma das principais enzimas antioxidantes, apresentando um importante papel na dismutação de radicais super-óxidos ($\text{O}_2^{\bullet-}$) para peróxido de hidrogênio (H_2O_2), prevenindo a reação Haber–Weiss e a geração de radicais hidroxila ($\bullet\text{OH}$) (FRIDOVICH, 1995). Os animais expostos às menores concentrações de PAR por 1 dia apresentaram uma diminuição na transcrição do gene *SOD* (Fig. 12c), porém um estudo

realizado por SERRANO (2014) os mesmos organismos não apresentaram alterações na atividade enzimática da SOD.

As *GSTs* catalizam a conjugação de endobióticos e xenobióticos com glutationas reduzidas (GSH) convertendo-as para conjugados mais excretáveis. As *GSTs* têm um importante papel na eliminação do PAR pois conjugam seus metabólitos facilitando sua eliminação (GELOTTE et al., 2007). Neste trabalho foram observados diferentes resultados na transcrição das isoformas de *GST* ω e *GST* π nos dois tecidos nos diferentes tratamentos. Quando os animais foram expostos a menores concentrações de PAR durante 7 dias, foi observada uma menor transcrição de ambas isoformas (Fig 11f e Fig. 13e), enquanto que quando os animais foram expostos durante 4 e 7 dias a PAR 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ foi observado uma maior transcrição de *GST* π na glândula digestiva (Fig 13f). Com base nestes resultados pode-se sugerir a existência de diferentes mecanismos de regulação da transcrição ou de sensibilidade a presença do PAR entre as brânquias e a glândula digestiva.

Aparentemente, quando o PAR é transportado para a glândula digestiva o padrão de transcrição gênica é alterado. O resultados do gene *GST* π sugerem um mecanismo de detoxificação do PAR na glândula digestiva dos animais expostos à maior concentração. SERRANO (2014) não observou alterações na atividade da enzima *GST* em brânquias de *C. gigas* expostas a PAR, porém a atividade quantificada foi da *GST* total e não das isoforma *GST* π .

O gene *GST* π também foi induzido após 4 e 7 dias em brânquias de ostras expostas a ibuprofeno (SERRANO et al., 2015), o que torna a quantificação da isoforma *GST* π como um possível biomarcador de exposição a anti-inflamatórios não esteroidais.

7. CONCLUSÕES

As brânquias e a glândula digestiva apresentaram padrões de respostas diferentes nos níveis de transcritos sugerindo que a glândula digestiva age como principal órgão de detoxificação.

As respostas observadas nas glândulas digestivas sugerem que o gene *GST π* age como uma importante via de detoxificação do organismo na contaminação por PAR, sendo assim, um possível biomarcador de contaminação de PAR.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estudos subseqüente são necessários para investigar a transcrição gênica da *COX* paralelamente a sua atividade enzimática em moluscos sob efeito de anti-inflamatórios não esteroidais.

A razão GSH/GSSG (GSSG: Glutathiona oxidada) têm um importante papel no balanço redox celular, sendo que baixas razões podem causar estresse celular. Neste estudo não foram quantificados os níveis de GSH e GSSG, mas seria de grande interesse avaliar se o PAR afeta estes níveis em ostras e, ainda, se causa um estresse do retículo endoplasmático.

A inibição dos gene *CYPs* em brânquias pode ter ocorrido por um mecanismo de defesa da homeostase celular, através da degradação do RNA mensageiro feita pela *IRE1α*. A *IRE1α* também é, possivelmente, a responsável pelo aumento da transcrição gênica do gene *Caspase* em 4 dias. Sendo assim, são necessários estudos sobre a ativação da *IRE1α* em moluscos expostos a PAR.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

- AGHABABIAN, R. V. (ORG). **Essentials of Emergency Medicine**. 2^a ed. Canadá: Jones & Bartlett Publishers, 2010, 814p. ISBN 978-1-4496-1846-9.
- AHMAD, J. **Hepatology and Transplant Hepatology: A Case Based Approach**. USA: Springer, 2010, 194 p. ISBN 978-1-4419-7085-5.
- BEEBY, A. What do sentinels stand for? **Environmental Pollution**, v.112, p.285-298, 2001.
- BENDZ, D. et al. Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment, a case study: Hörje River in Sweden. **Journal of Hazardous Materials**, v. 122, p.195-204, 2005.
- BILA D.M.; DEZOTTI M. Fármacos no médio ambiente. **Química Nova**, v. 26, p. 523-530, 2003.
- CAO, S. S.; KAUFMAN R.J. Endoplasmic Reticulum Stress and Oxidative Stress in Cell Fate Decision and Human Disease. **Antioxid Redox & Signaling**, v. 21, ed. 3, p. 396-413, 2014
- CALDER, P.C. n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. **American Society for Clinical Nutrition**, v.83, n. 6 p. 1505-1519, 2006
- CARAJAVILLE, M.P. et al. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. **The Science of the Total Environment**, v. 247, p. 295-311, 2000.
- CHRISTEN, V. et al. Highly active human pharmaceuticals in aquatic systems: A concept for their identification based on their mode of action. **Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)**, v. 96, n. 3, p. 167–81, 2010.
- CONTARDO-JARA, A. V. et al. Exposure to human pharmaceuticals Carbamazepine, Ibuprofen and Bezafibrate causes molecular effects in *Dreissena polymorpha*. **Aquatic Toxicology**, v.105, p. 428-437, 2011
- Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina. EPAGRI. 2014. **Síntese informativa da Maricultura**.
- ESTEVES, A.; EHRLICH, R. Invertebrate intracellular fatty acid binding proteins. **Comparative Biochemistry And Physiology Part C**, v.142, p.262-74, 2006.
- EPA – United States Environmental Protection Agency. 2010. PPCPs: Basic Information. 2010.
- FAYS, L. et al. Use of paracetamol during pregnancy and child neurological development. **Developmental medicine and child neurology**, v. 57, ed 8, p. 718–724, 2015. PMID 25851072.

FENT, K.; WESTON, A.; CAMINADA, D. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. **Aquatic Toxicology**, v. 76, n.2, p. 122–159, 2006.

FLORES-NUNES, F. **Avaliação de respostas bioquímicas, moleculares e da expressão proteômica em ostras *Crassostrea gigas* expostas ao esgoto sanitário**. 183f. Tese (Doutorado em Aquicultura) – Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, SC, 2013.

FLORES-NUNES, F. et al. Effect of linear alkylbenzene mixtures and sanitary sewage in biochemical and molecular responses in pacific oyster *Crassostrea gigas*. **Environment Science Pollution Research**, v. 22, p. 17386-17396, 2015. DOI 10.1007/s11356-015-4486-7

FREIRE, M. M.; SANTOS, V.G.; GINUINO, I.S.F.; ARIAS, A. R. L. Biomarcadores na avaliação da saúde ambiental dos ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, Rio de Janeiro, p. 347-354, 2008.

FRIDOVICH, I. Superoxide radical and superoxide dismutases. **Annual Review of Biochemistry**, v. 64, p. 97-112, 1995.

GAGNÉ, F. et al. Inflammatory properties of municipal effluents to *Elliptio complanata* mussels — lack of effects from anti-inflammatory drugs. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 141, p. 332-337, 2005.

GELLOTE, C.K. et al. Disposition of acetaminophen at 4, 6, and 8 g/day for 3 days in healthy young adults. **Clinical Pharmacology Therapeutics**, v. 81, ed. 6, p. 840-848, 2007.

GOMES, R.P. **Transcrição de genes *citocromo p450* em ostra *Crassostrea gigas***. 111f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Biociências) – Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, SC, 2013.

GIERSE, J.K. et al. Kinetic basis for selective inhibition of cyclo-oxygenases. **Biochemistry journal**, v. 339, p. 607-614, 1999.

GONZALEZ-REY, M; BEBIANNO, J.M. Does non-steroidal anti-inflammatory (NSAID) ibuprofen induce antioxidant stress and endocrine disruption in mussel *Mytilus galloprovincialis*? **Environmental Toxicological and Pharmacology**, v. 33, p. 361-371, 2012.

HAWKEY, C. J. COX-1 and COX-2 inhibitors. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 15, n. 5, p. 801-820, 2001

HECKMANN, L.H. Outlining eicosanoid biosynthesis in the crustacean *Daphnia*. **Frontiers in Zoology**, v. 5, p. 1-9, 2008.

HINZ, B.; CHEREMINA, O.; BRUNE, K. Acetaminophen (paracetamol) is a selective cyclooxygenase-2 inhibitor in man. **Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 22, n. 2 p. 383-390, 2008. DOI: 10.1096/fj.07-8506com.

HODGMAN, M.J.; GARRARD, A.R. A Review of Acetaminophen Poisoning. **Critical Care Clinics**, v. 28, ed. 4, p.499-516, 2012.

HOLLIGAN P.M., BOOIS, H. Land-Ocean Interactions in the Coastal Zone (LOICZ). **Science plan**, A study of global Change (IGBP report 25) of the International Council of Scientific Union (ICSU). Stockholm, Sweden: 2^a ed., 1993.

HUR, K.Y. et al. IRE1 α activation protects mice against acetaminophen-induced hepatotoxicity. **Journal of Experimental Medicine**, v. 209 ed. 2, p. 307-318, 2012.

KRATZ, W. Ecotoxicological risk of human pharmaceuticals in Brandenburg surface waters? In: Schmidt M., Glasson J. Emmelin L. & Helbron H. (eds.). Standards and thresholds for impact assessment. **Environmental Protection in the European Union**, v.3, p. 379-389, 2008.

LAM, P. K. S; GRAY, J. S. The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. **Marine pollution bulletin**, v. 46, n. 2, p. 182–6, 2003.

LEE, Y.S. et al. Acetaminophen selectively suppresses peripheral prostaglandin E₂ release and increases COX-2 gene expression in a clinical model of acute inflammation. **Pain** v. 129, ed. 3, p. 279–286, 2007.

MAO, Y. et al. Seasonal variation in metabolism of cultured Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in Sanggou Bay, China. **Aquaculture**, v. 253, n. 1-4, p. 322-333, 2006.

MARSHALL, B.; GOFAS, S. (2015). *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793). MolluscaBase (2015). Disponível em <<http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=140656>> acessado em 26 de novembro de 2015.

MATTOS, J. J. et al. Differential gene expression in *Poecilia vivipara* exposed to diesel oil water accommodated fraction. **Marine Environmental Research**, v. p. S31-S33, 2010.

MAURER, M. et al. Elimination of beta-blockers in sewage treatment plants. **Water Research**, v. 41, n. 7, p. 1614–1622, 2007.

MEDEIROS, I.D. et al. Differential gene expression in oyster exposed to sewage. **Marine Environmental Research**, v. 66, n.1, p. 156-157, 2008.

MITCHELL, J.R. et al. Acetaminophen-induce hepatic necrosis. IV. Protective role of glutathione. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 187, n. 1, p. 211-217, 1973

NIGRO, M. et. al. Cellular biomarkers for monitoring estuarine environments: transplanted versus native mussels. **Aquatic Toxicology**, v. 77, n. 4, p. 339–47, 2006.

OSADA, M.; NOMURA, T. The levels of prostaglandins associated with the reproductive cycle of the scallop *Patinopecten yessoensis*. **Prostaglandins**, v. 40, p. 229-239, 1990.

PAOLETTI, C.; MAZZARA, M. Definition of Minimum Requirements for Analytical Methods of GMO Testing European Network of GMO Laboratories (ENGL), 2005. Disponível em <<http://gmo-crl.jrc.it>> acessado em 8 de novembro de 2015.

PAMPLONA, J.H. et al. Subchronic effects of dipyrone on the fish species *Rhamdia quelen*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.74, p. 342-349, 2010.

PEDIBHOTLA, V.K., SARATH, G., SAUER, J.R., STANLEYSAMUELSON, D.W. Prostaglandin biosynthesis and subcellular-localization of prostaglandin-H synthase activity in the lone star tick, *Amblyomma americanum*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 25, n. 9, p. 1027-1039, 1995

PETROVIC, M. Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 10, p. 685–696, 2003.

PNSB. Pesquisa Nacional de Saneamento Básico. **IBGE**. Rio de Janeiro, 222p., 2008.

QIAGEN, **QIAzol handbook**: For efficient lysis of fatty tissues and all other types of tissue before RNA purification, 2009a.

QIAGEN, QuantiTect[®]. **Reverse transcription handbook**, 2009b, pp 31.

QIAGEN, QuantiFast[®] SYBR[®] Green PCR KIT, **Quick Start Protocol**, 2011, pp 3.

QUINN, B. et al. Effects of the pharmaceuticals gemfibrozil and diclofenac on biomarker in the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) and their comparison with standardised toxicity tests. **Chemosphere**, v. 84, p. 657-663, 2011.

RAO, P.P.N.; KNAUS E.E. Evolution of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs): Cyclooxygenase (COX) Inhibition and Beyond. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v. 11, ed. 2, p. 81-110, 2008.

ROWLEY, A.F. Prostaglandins in non-insectan invertebrates: recent insights and unsolved problems. **Journal of Experimental Biology**, v. 208 p. 3-14, 2005.

REIS-FILHO W.R. et al. Fármacos, ETEs e corpos hídricos. **Revista Ambiente & Agua - An International Journal of Applied Sciences**, v.2, n.3, p. 54-61, 2007.

ROBERTS, S.B et al. Cloning and characterization of prostaglandin endoperoxide synthase-1 and -2 from the brook trout ovary. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 160 (1/2), p. 89-97, 2000.

SARKAR, A.; RAY, D.; SHRIVASTAVA, N. A. Molecular Biomarkers: Their significance and application in marine pollution monitoring. **Ecotoxicology**, v. 15, p. 333-340, 2006.

SCHMITTGEN, T.D.; LIVAK, K.J. Analysis of Relative Gene Expression Data Using RealTime Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. **Methods**, v. 25, ed. 4 p. 402 – 408, 2001.

SCHWAIGER, J. et al. Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac Part I. Histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout. **Aquatic Toxicology**, v. 68, p. 141–150, 2004.

SCHWANHÄUSSER, B. et al. Global quantification of mammalian gene expression control. **Nature**, v. 341, p. 337-342, 2011. DOI:10.1038/nature10098

SHINODA, S. et al. Pharmacokinetics/pharmacodynamics of acetaminophen analgesia in japanese patients with chronic pain. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, n. 1 30, p. 157-161, 2007.

SERRANO, M.A.S. **Respostas enzimáticas e avaliação cito-genotóxica em ostras do pacífico *Crassostrea Gigas* (Thunberg 1793) expostas a fármacos**. 82f. Dissertação (Mestrado em aquicultura) - Universidade Federal de Santa Catarina Florianópolis, SC, 2014.

SERRANO, M.A.S et al. Differential gene transcription, biochemical responses, and cytotoxicity assessment in Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to ibuprofen. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 1-11, 2015.

SMPA, Swedish medical products agency. **Miljöpåverkan från läkemedel samt kosmetiska och hygieniska produkter**, Rapport, 2004.

SOLÉ, M. et al. Effects on feeding rate and biomarker responses of marine mussels experimentally exposed to propranolol and acetaminophen. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 396, n. 2, p. 649-56, 2010.

STUMPF, M. et al. Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Science of Total Environment**, v. 225, n.1-2, p. 135–141, 1999.

TERNES, T.A. et al. Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants–I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. **Science Total Environment**, v. 225, p. 81–90, 1999.

UPTON, J.P. et al. IRE1 α Cleaves Select microRNAs During ER Stress to Derepress Translation of Proapoptotic Caspase-2. **Science**, v. 338, n. 6108, p. 818-822, 2012

WANG, I. et al. Hepato-protective effect of resveratrol against acetaminophen-induced liver injury is associated with inhibition of CYP-mediated bioactivation and regulation of SIRT1–p53 signaling pathways. **Toxicology Letters**, v. 236, ed. 2, p. 82-89, 2015.

WISHART, D.S. et al. DrugBank: a comprehensive resource for in silico drug discovery and exploration. **Nucleic Acids Research**, v.24, 2006.

ZOU, J et al. Fish macrophages express a cyclo-oxygenase-2- homologue after activation. **Biochemistry**, v. 340 (pt 1), p. 153-159, 1999