

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA
CATARINA CENTRO DE CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS

Vera Helena Vidal Dias

**IMUNODETECÇÃO DO CITOCROMO P450 1A1 EM AMOSTRAS
TECIDUAIS DE CETÁCEOS ODONTOCETOS**

Florianópolis

2017

Vera Helena Vidal Dias

**IMUNODETECÇÃO DO CITOCROMO P450 1A1 EM AMOSTRAS
TECIDUAIS DE CETÁCEOS ODONTOCETOS**

Trabalho Conclusão do Curso de Graduação
em Ciências Biológicas do Centro de
Ciências Biológicas da Universidade Federal
de Santa Catarina como requisito para a
obtenção do Título de Licenciada em
Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Karim Hahn
Lüchmann

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

Florianópolis

2017

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

Dias, Vera Helena Vidal
Imunodeteccção do citocromo P450 1A1 em amostras
teciduais de cetáceos odontocetos / Vera Helena Vidal Dias
; orientadora, Karim Hahn Lüchmann,
coorientadora, Maria Risoleta Freire Marques, 2017.
68 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências
Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas, Florianópolis,
2017.

Inclui referências.

1. Ciências Biológicas. 2. Western blotting. 3. Cetáceos
odontocetos. 4. Citocromo P450. 5. Biomarcador. I.
Lüchmann, Karim Hahn . II. Marques,
Maria Risoleta Freire. III. Universidade Federal de Santa
Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal de Santa Catarina, onde realizei o meu sonho de estudar Ciências Biológicas, e, por ter me oportunizado inúmeras experiências de aperfeiçoamento profissional e pessoal.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Karim Hahn Lüchmann, que aceitou me orientar, por seu papel fundamental para o desenvolvimento deste trabalho, por todos os ensinamentos, paciência, confiança e dedicação.

À minha coorientadora Prof^a. Dr^a. Maria Risoleta Freire Marques pela confiança, pelos ensinamentos, pela atenção e compreensão durante toda a minha caminhada na graduação.

Ao Prof. Dr. Afonso Celso Dias Bainy pelos ensinamentos e incentivo para o desenvolvimento do presente trabalho.

A toda a equipe do LABCAI por ter me acolhido e auxiliado no meu desenvolvimento no mundo científico. Agradeço especialmente ao Jacó Joaquim Mattos por compartilhar conhecimentos teóricos e práticos que foram essenciais para o desenvolvimento do presente trabalho e que com certeza levarei comigo pelo resto da vida. Também agradeço ao Jacó e aos colegas Fabrício, Flávia e Isis por me possibilitarem o uso das amostras de tecido hepático de dois espécimes de *Mugil liza*. Um agradecimento especial também é destinado para a Bárbara por disponibilizar a amostra de pele proveniente de biópsia de um espécime de *Tursiops truncatus* e pelos conhecimentos compartilhados. E, por fim, agradeço especialmente a Daína pelo suporte no trabalho de bancada, apoio e pelos ensinamentos.

À banca avaliadora, composta pela Dr^a. Juliana Riguetto Moser e Dr^a. Marília Nardelli Siebert, por ter aceitado o convite de colaborar em um momento importante na minha trajetória acadêmica e pelos conhecimentos compartilhados.

A todos os amigos que torcem por mim, emanam energias positivas e fazem a minha vida mais alegre e completa. Especialmente Susana, Bruno, Carla, Luana, Mariela, David, Mário e Sandra a minha gratidão.

À minha irmã, Alessandra, por ser minha querida parceira, pelas conversas, incentivos e lindas poesias.

À minha avó, Vera Liane, e ao meu avô Romeu, por serem exemplos para mim e por todo o amor e apoio.

Ao Renan por todo o seu companheirismo, apoio, motivação e carinho. A sua presença torna os meus dias mais alegres e esperançosos.

E principalmente, agradeço à minha mãe, Rosimeri, e ao meu pai, Rodrigo, por

serem o meu porto seguro e por me mostrarem que sou capaz de realizar meus sonhos. Com certeza sem o apoio de vocês este trabalho não seria possível. Gratidão por cada palavra de confiança, cada olhar repleto de amor, pelos conselhos e carinhos.

Por fim, agradeço aos órgãos fomentadores financeiros, CAPES, FAPESC e *Society for Marine Mammalogy*, que possibilitaram a realização deste trabalho.

Gratidão!

RESUMO

As atividades humanas podem liberar substâncias que quando no ambiente se caracterizam como contaminantes e com frequência se dispersam no meio aquático. Alguns contaminantes podem causar efeitos tóxicos nos seres vivos expostos, como os cetáceos odontocetos, e são conhecidos como poluentes. A exposição aos poluentes desencadeia uma cascata de respostas, cada uma das quais pode, em teoria, servir como biomarcador. O citocromo P450 compreende uma larga e extensa família de proteínas, que desempenha papel central na fase I do metabolismo de biotransformação de xenobióticos. A indução do membro CYP1A1 pode ser utilizada como biomarcador em amostras de tecidos de cetáceos. No entanto, sua utilização em estudos ecotoxicológicos necessita de ferramentas que possibilitem detectar a sua expressão ou os níveis de sua atividade catalítica. A técnica de *Western blotting* se caracteriza por ser um eficiente e importante procedimento para a imunodeteção de proteínas. Dentro deste contexto, o presente trabalho tem por objetivo imunodetectar CYP1A1 em amostras teciduais de cetáceos odontocetos. Tendo em vista que a metodologia de *Western blotting* apresenta várias etapas, a sua aplicação demanda uma série de ajustes finos até que as condições ótimas de cada etapa sejam definidas. Assim, o presente trabalho contou com a prévia padronização da técnica de *Western blotting* em amostras teciduais de *Tursiops truncatus*. Foi imunodetectada a expressão de CYP1A1 em amostras de fígado, pele, pulmão, baço e rim de *T. truncatus*, assim como no fígado de *Stenella frontalis*, indicando que possivelmente estes espécimes foram expostos a contaminantes químicos, tais como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. A imunodeteção da expressão de CYP1A1 não foi verificada no cérebro, gordura e músculo estriado esquelético de *T. truncatus* e no fígado de *Sotalia guianensis*. Estudos complementares são necessários para determinar quanto os tecidos extra-hepáticos que contêm CYP1A1 contribuem para o metabolismo de biotransformação de xenobióticos. Contudo, os avanços metodológicos advindos deste trabalho servem como base para outros trabalhos que visam imunodetectar CYP1A1 em amostras teciduais de cetáceos odontocetos por *Western blotting*. O presente estudo também se destaca como um dos pioneiros em aplicar as espécies *S. frontalis* e *S. guianensis*, endêmicas do Oceano Atlântico, em estudo com o biomarcador CYP1A1.

Palavras-chave: Biotransformação. Cetáceos odontocetos. Citocromo P450. *Sotalia guianensis*. *Stenella frontalis*. *Tursiops truncatus*. *Western blotting*. Xenobióticos.

ABSTRACT

Human activities can release substances within the environment that are characterized as contaminants and often disperse in the aquatic environment. Some contaminants may cause toxic effects on exposed organisms, such as odontocete cetaceans, and are known as pollutants. The exposure to pollutants starts a cascade of responses, serving each as a biomarker. Cytochrome P450 comprises a large and extensive family of proteins, which plays a central role in phase I of the biotransformation metabolism of xenobiotics. CYP1A1 induction can be applied as a biomarker in samples of cetacean tissues. However, the CYP1A1 use in ecotoxicological studies requires tools that can detect its expression or levels of its catalytic activity. The Western blotting technique is an efficient and important procedure for proteins immunodetection. Therefore, the present study aims to immunodetect CYP1A1 in tissue samples of odontocete cetaceans. Considering Western blotting methodology is performed by several steps, its application requires fine adjustments until achieving optimum conditions for each step. Thus, the present study took into consideration a prior standardization of Western blotting technique in tissue samples of *Tursiops truncatus*. The CYP1A1 expression was immunodetected in liver, skin, lung, spleen and kidney samples of *T. truncatus*, as well as in the liver of *Stenella frontalis*. These results possibly indicate that these specimens were exposed to chemical contaminants such as polycyclic aromatic hydrocarbons. The immunodetection of CYP1A1 expression was not verified in brain, body fat and skeletal striated muscle samples of *T. truncatus* and liver samples of *Sotalia guianensis*. Further studies are essential to determine how extrahepatic tissues containing CYP1A1 contribute to the biotransformation metabolism of xenobiotics. However, the methodological advances resulted from this study can be applied for other studies aiming to immune detect tissue samples of odontocete cetaceans by Western blotting. The present study also stands out as one of the pioneers by applying endemic species to the Atlantic Ocean, such as the *S. frontalis* and *S. guianensis*, in a study with the CYP1A1 biomarker.

Keywords: Biotransformation. Cytochrome P450. Odontocete cetaceans. *Sotalia guianensis*. *Stenella frontalis*. *Tursiops truncatus*. Western blotting. Xenobiotics.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Foto de um indivíduo da espécie <i>Tursiops truncatus</i> | 15 |
| Figura 2 - Distribuição geográfica de indivíduos da espécie <i>Tursiops truncatus</i> | 16 |
| Figura 3 - Foto de um indivíduo da espécie <i>Stenella frontalis</i> | 16 |
| Figura 4 - Distribuição geográfica de indivíduos da espécie <i>Stenella frontalis</i> | 17 |
| Figura 5 - Foto de um indivíduo da espécie <i>Sotalia guianensis</i> | 18 |
| Figura 6 - Distribuição geográfica de indivíduos da espécie <i>Sotalia guianensis</i> | 19 |
| Figura 7 - Esquematização das etapas da técnica de <i>Western blotting</i> | 24 |
| Figura 8 - Esquema representando a transferência das proteínas do gel SDS-PAGE para a membrana | 25 |
| Figura 9 - Esquema dos processos de ligação dos anticorpos primário e secundário na proteína de interesse e seguinte detecção | 27 |
| Figura 10 - Imunodeteção de CYP1A1 em amostras teciduais de <i>Tursiops truncatus</i> nas condições do experimento “A”, com as menores concentrações de proteína | 36 |
| Figura 11 - Imunodeteção de CYP1A1 em amostras teciduais de <i>Tursiops truncatus</i> nas condições do experimento “A”, com as maiores concentrações de proteína | 37 |
| Figura 12 - Imunodeteção de CYP1A1 amostras teciduais de <i>Tursiops truncatus</i> nas condições do experimento “B” | 38 |
| Figura 13 - Imunodeteção de CYP1A1 em amostras teciduais de <i>Tursiops truncatus</i> nas condições do experimento “C” | 39 |
| Figura 14 - Imunodeteção de CYP1A1 em amostras teciduais de <i>Tursiops truncatus</i> nas condições do experimento “D” | 40 |
| Figura 15 - Imunodeteção de amostras teciduais de <i>Tursiops truncatus</i> e de fígado de <i>Stenella frontalis</i> e <i>Sotalia guianensis</i> | 41 |
| Figura 16 - Imunodeteção de amostras teciduais de <i>Tursiops truncatus</i> e de amostra de fígado de <i>Sotalia guianensis</i> | 42 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AHR - Receptor de hidrocarboneto aromático

CAPS - Ácido 3- (ciclohexilamino)-1-propanosulfônico (do inglês: *3-(cyclohexylamino)-1-propanesulfonic acid*)

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

CYP - Citocromo P450

CYP450 1A - Citocromo P450 família 1, subfamília A

CYP450 1A1 - Citocromo P450 família 1, subfamília A, isoforma 1

DTT - Ditioneítrito

IUCN - União Internacional para a Conservação da Natureza (do inglês: *International Union for Conservation of Nature*)

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

EDTA - Ácido etilendiamino tetra-acético (do inglês: *ethylenediamine tetraacetic acid*)

EROD - 7-etóxi-resorufina-O-deetilase

LABCAI - Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica

PAHs - Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (do inglês: *polycyclic aromatic hydrocarbons*)

PCBs - Bifenilos policlorados (do inglês: *polychlorinated biphenyls*)

PCDFs - Dibenzofuronos policlorados (do inglês: *polychlorinated dibenzofurans*)

PMSF - Fluoreto de fenilmetano sulfonilo (do inglês: *phenylmethane sulfonyl fluoride*)

POPs - Poluentes orgânicos persistentes

PVDF - fluoreto de polivinilideno (do inglês: *polyvinylidene difluoride*)

RNA_m - Ácido ribonucleico mensageiro

SDS - Dodecil sulfato de sódio (do inglês: *sodium dodecyl sulfate*)

U.D.A - Unidades densitométricas arbitrárias

UFSC - Universidade Federal de Santa Catarina

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 12 |
| 1.1 CONTAMINANTES QUÍMICOS E CETÁCEOS ODONTOCETOS | 12 |
| 1.1.1 <i>Tursiops truncatus</i> | 14 |
| 1.1.2 <i>Stenella frontalis</i> | 16 |
| 1.1.3 <i>Sotalia guianensis</i> | 18 |
| 1.2 BIOMARCADORES | 19 |
| 1.3 CITOCROMO P450 | 20 |
| 1.4 IMUNODETECÇÃO DE CYP1A1 | 22 |
| 1.4.1 <i>Western Blotting</i> | 23 |
| 1.5 OBJETIVOS | 28 |
| 1.5.1 Objetivo geral | 28 |
| 1.5.2 Objetivos específicos | 28 |
| 2 MATERIAL E MÉTODOS | 29 |
| 2.1 COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO | 29 |
| 2.2 HOMOGENEIZAÇÃO DAS AMOSTRAS | 30 |
| 2.3 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS | 31 |
| 2.4 <i>WESTERN BLOTTING</i> | 31 |
| 2.4.1 Experimento A | 32 |
| 2.4.2 Experimento B | 33 |
| 2.4.3 Experimento C | 34 |
| 2.4.4 Experimento D | 34 |
| 2.4.5 Experimento E | 35 |
| 3 RESULTADOS | 36 |
| 3.1 EXPERIMENTO A | 36 |
| 3.2 EXPERIMENTO B | 38 |
| 3.3 EXPERIMENTO C | 38 |
| 3.4 EXPERIMENTO D | 39 |

| | |
|---|-----------|
| 3.5 EXPERIMENTO E..... | 40 |
| 4 DISCUSSÃO | 43 |
| 4.1 PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE WESTERN BLOTTING | 43 |
| 4.2 IMUNODETECÇÃO DE CYP1A1 NOS TECIDOS DE <i>TURSIOPS TRUNCATUS</i> | 45 |
| 4.2.1 Imunodeteccção de CYP1A1 no fígado | 45 |
| 4.2.2 Imunodeteccção de CYP1A1 na pele | 46 |
| 4.2.3 Imunodeteccção de CYP1A1 na gordura | 47 |
| 4.2.4 Imunodeteccção de CYP1A1 no pulmão | 48 |
| 4.2.5 Imunodeteccção de CYP1A1 no músculo estriado esquelético | 49 |
| 4.2.6 Imunodeteccção de CYP1A1 no baço | 49 |
| 4.2.7 Imunodeteccção de CYP1A1 no cérebro | 50 |
| 4.2.8 Imunodeteccção de CYP1A1 no rim | 51 |
| 4.3 COMPARAÇÕES DA IMUNODETECÇÃO DE CYP1A1 ENTRE AS ESPÉCIES DE CETÁCEOS ODONTOCETOS: <i>TURSIOPS TRUNCATUS</i> , <i>STENELLA FRONTALIS</i> E <i>SOTALIA GUIANENSIS</i> | 52 |
| 5. CONCLUSÃO | 54 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 55 |
| APÊNDICE A | 65 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONTAMINANTES QUÍMICOS E CETÁCEOS ODONTOCETOS

As atividades humanas podem liberar diversas substâncias que quando no ambiente se caracterizam como contaminantes. De acordo com Chapman (2007), contaminantes são substâncias presentes onde não deveriam estar ou em concentrações acima do nível natural. Os contaminantes frequentemente se dispersam no ambiente aquático por meio de descargas diretas ou indiretas, como por processos hidrológicos e atmosféricos (UNO; ISHIZUKA; ITAKURA, 2012).

Há contaminantes que podem causar efeitos tóxicos nos organismos expostos e são conhecidos como poluentes (CHAPMAN, 2007). Dentre os poluentes, há aqueles que apresentam grande potencial de bioacumulação, uma meia-vida extremamente longa e são encontrados em locais distantes da fonte de emissão, ou seja, conseguem ser transportados com facilidade pelos diferentes compartimentos ambientais. Esses poluentes são conhecidos como poluentes orgânicos persistentes – POPs (WAUGH et al., 2011).

Exemplos de POPs são produtos químicos industriais, como os bifenilos policlorados (PCBs), uma classe de compostos organoclorados (substâncias orgânicas que contém cloro) utilizada principalmente como óleo isolante em equipamentos elétricos (MONTONE, s.d.). Também são POPs subprodutos químicos produzidos não intencionalmente, como as dioxinas e os furanos, os quais resultam principalmente dos processos de incineração, siderurgia e combustão da madeira (MONTONE, s.d.). E, por fim, cabe citar POP's provenientes de pesticidas organoclorados utilizados para controlar pragas e aumentar a produção de alimentos, como: DDT, heptacloro, aldrin, dieltrin, clordano, toxafeno e mirex (FELIX; NAVICKIENE; DÓREA, 2007).

Para além dos POP's, vale ressaltar a presença ambiental dos contaminantes químicos que compõe a família dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs). Estes são representados por mais de cem compostos orgânicos, constituídos por carbono e hidrogênio, que possuem dois ou mais anéis aromáticos condensados. São formados, principalmente, em processos de combustão incompleta da matéria orgânica. Apesar de serem considerados quimicamente estáveis, os PAHs são suscetíveis à oxidação e fotodegradação pela luz (IPCS, 1998). Vários PAHs e seus derivados são potencialmente carcinogênicos e mutagênicos (CARUSO; ALABURDA, 2008).

Cetáceos odontocetos, conhecidos popularmente como golfinhos ou botos, bioacumulam uma variedade de contaminantes químicos - principalmente por meio de suas dietas durante seus longos períodos de vida (HOUDE et al., 2005). Isto ocorre porque muitas vezes eles absorvem contaminantes a uma taxa maior do que a capacidade de metabolização e excreção e, assim, armazenam em suas largas reservas lipídicas (ZHOU et al., 2008). Como descreve ZHOU et al. (2008): “*a bioacumulação resulta de um equilíbrio dinâmico entre a exposição ao ambiente externo e a absorção, excreção, armazenamento e degradação dentro de um organismo*”.

Tendo em vista que os cetáceos odontocetos são predadores de topo de cadeia trófica, eles também estão sujeitos ao processo de biomagnificação. Este processo é caracterizado pela transferência dos contaminantes presentes nas presas ao predador de maneira sucessiva até o topo da cadeia alimentar (BEYER et al., 2014).

Os cetáceos, assim como os demais mamíferos, são endotérmicos e para manter a temperatura corporal constante necessitam de mais energia para o mesmo peso corporal do que um ectotérmico. Essa maior demanda energética dos endotérmicos se relaciona com sua maior taxa metabólica, em função dos gastos envolvidos na termorregulação. Logo, é possível relacionar a taxa metabólica com a taxa de absorção de contaminantes (MUIR et al., 1999). Ou seja, supõe-se que, de maneira geral, animais endotérmicos bioacumulam mais contaminantes do que os ectotérmicos.

Todo este cenário aparentemente desfavorável aos cetáceos odontocetos é somado à capacidade extremamente baixa que os mamíferos marinhos possuem de metabolizar compostos organoclorados quando comparados com as aves e os mamíferos terrestres (TANABE et al., 1988).

A exposição aos poluentes pode afetar a sobrevivência dos organismos ambientalmente expostos por meio de numerosos mecanismos que incluem, por exemplo, a toxicidade direta, que pode gerar múltiplos efeitos a curto e/ou a longo prazo (HOOK; GALLAGHER; BATLEY, 2014).

Estudos têm sugerido que os cetáceos podem ter prejuízos reprodutivos e redução nas taxas de crescimento populacional em função da exposição aos poluentes químicos (HALL et al., 2006; SCHWACKE et al., 2002; TARPLEY et al., 1995). Adicionalmente, alguns estudos apontam que a exposição aos poluentes também gera outros efeitos nos cetáceos, como: alterações no sistema endócrino, aumento de neoplasias, lesões na pele e deficiência de vitamina A (BIRKUN et al., 1999; BROUWER et al., 1998; DE GUISE et al., 1995; FOSSI;

MARSILI, 2003; GUITART et al., 1996; MARTINEAU et al., 1994, 2002; ROSS et al., 1996). Ainda, tem sido demonstrado que a exposição aos poluentes químicos aumenta o nível do estresse oxidativo em cetáceos (HOOK; GALLAGHER; BATLEY, 2014; KELLY et al., 1998; WINSTON, 1991). O estresse oxidativo se caracteriza pela formação de espécies reativas de oxigênio, ou seus subprodutos, que causam lesão celular e/ou tecidual (KELLY et al., 1998; WINSTON, 1991).

Apesar de ainda não poder ser considerada a causa da morte de muitos indivíduos, há um consenso de que os poluentes contribuem para a imunossupressão, fazendo com que os cetáceos estejam mais suscetíveis às infecções de diversos patógenos (AGUILAR; BORRELL, 1994; LAHVIS et al., 1995; MARSILI et al., 2014; MORI et al., 2008).

A avaliação dos níveis de contaminantes e da saúde em populações de cetáceos é continuamente um interesse conservacionista (ASSUNÇÃO et al., 2007). Como as espécies de cetáceos são expostas aos diferentes poluentes, elas e outras espécies marinhas são utilizadas como sentinelas em programas de monitoramento do ambiente marinho (VELDHOEN; IKONOMOU; HELBING, 2012). Espécies sentinelas são caracterizadas por refletirem as perturbações do meio ambiente podendo servir como indicadores da conservação do ecossistema (DEEM, S.; KARESH W.; WEISHMAN W., 2001). Exemplos são: *Balaenoptera physalus* (FOSSI et al., 2006, 2010, 2014), *Delphinapterus leucas* (MCKINNEY et al., 2004), *Physeter macrocephalus* (MARSILI et al., 2014), *Stenella coeruleoalba* (FOSSI et al. 2006, 2012a, 2013) e *Tursiops truncatus* (FOSSI et al., 2006, 2014).

A seguir serão apresentadas três espécies de cetáceos odontocetos da família Delphinidae que podem ser utilizadas no monitoramento do ambiente marinho e em estudos ecotoxicológicos. Cabe ressaltar que como este táxon é constituído por uma megafauna carismática sua aplicação em programas de conservação é possível como espécie bandeira, de modo a assegurar apoio social. Adicionalmente, a conservação deste táxon também terá como consequência a conservação de outras espécies do mesmo ecossistema, assim, estas espécies também são consideradas espécies guarda-chuvas (ZACHARIAS; ROOF, 2001).

1.1.1 Tursiops truncatus

A espécie *Tursiops truncatus* (Montagu, 1821) apresenta de dois a quatro metros de comprimento, de 135 a 635 kg e é conhecido popularmente como boto-da-tainha ou golfinho-nariz-de-garrafa (Figura 1). A expectativa de vida da espécie é de 40 a 50 anos (NOAA, 2015).

Figura 1 - Foto de um indivíduo da espécie *Tursiops truncatus*.



Fonte: Henry Ausloos, s.d.

A espécie tem larga distribuição geográfica (Figura 2) e é comum em águas costeiras de regiões tropicais e temperadas (WELLS; SCOTT, 1999, 2009 apud YORDY et al., 2010). Na Lista Vermelha da União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN, 2017a) o seu estado de conservação é classificado como menos preocupante (“*least concern*”). Tais características tornam esta espécie relativamente fácil de observar e estudar (YORDY et al., 2010).

Cabe ressaltar a população de *T. truncatus* que reside no Complexo Lagunar de Santo Antônio dos Anjos-Imaruí-Mirim, na costa sul do estado de Santa Catarina. Alguns indivíduos desta população realizam, em parceria com o pescador artesanal, a pesca cooperativa. Apesar desta interação ocorrer ao longo de todo o ano, no período migratório das tainhas (*Mugil spp.*), que se inicia no outono e vai até o início do inverno, ela é ainda mais intensa. Durante a pesca cooperativa os botos cercam os cardumes de tainhas contra uma barreira dinâmica de pescadores e, por meio de um comportamento estereotipado, indicam o local e o momento apropriado para o pescador lançar sua rede. E, assim, as tainhas que conseguem fugir da rede são facilmente capturadas pelos botos (SIMÕES-LOPES; FABIÁN; MENEGHETI, 1998).

Figura 2 – Distribuição geográfica de indivíduos da espécie *Tursiops truncatus*.



A distribuição de indivíduos da espécie *T. truncatus* é feita pela marcação de cor alaranjada. Fonte: Adaptado de IUCN (2012, versão 2017-2).

1.1.2 *Stenella frontalis*

A espécie *Stenella frontalis* (G. Cuvier, 1829) apresenta cerca de 2,27 m de comprimento, 135 kg e é conhecida popularmente como golfinho-pintado-do-atlântico (Figura 3). As pintas características desta espécie não estão presentes nos indivíduos jovens, conforme vão envelhecendo, as pintas surgem e aumentam em quantidade. A sua expectativa de vida é desconhecida, no entanto a maturidade sexual é atingida entre os 8 e 15 anos de idade (NOAA, 2015b).

Figura 3 - Foto de um indivíduo da espécie *Stenella frontalis*.



Fonte: James D. Watt, s.d.

A espécie é encontrada no oceano Atlântico, desde o sul do Brasil até os Estados Unidos, e lateralmente segue até a costa oeste da África (Figura 2). Embora os seus limites de distribuição na costa do Brasil e no oeste da África ainda não sejam bem conhecidos (HAMMOND et al., 2012), sabe-se que a espécie prefere o habitat costeiro e águas quentes (MORENO et al., 2005). Adicionalmente, no Brasil os registros da espécie apontam para uma distribuição descontínua, na qual os espécimes se encontram nas regiões sul (21 a 33 °S) e norte (norte de 6 °S) (MORENO et al., 2005). Esta falta de precisão quanto à distribuição da espécie dificulta estimar a sua abundância e, conseqüentemente, o estabelecimento de estado de conservação da espécie (HAMMOND et al., 2012). De fato, a IUCN (2017b), por meio de sua Lista Vermelha, afirma ter dados insuficientes (“*data deficient*”) para estabelecer o seu estado de conservação.

Curiosamente, nas Bahamas tem sido observado acasalamentos entre o golfinho-pintado-do-atlântico com botos-da-tainha (*Tursiops truncatus*). De modo que se sugere que o golfinho-pintado-do-atlântico está mais relacionado com o gênero *Tursiops* do que com outros membros do gênero *Stenella* (HERZING, 2011 apud THE SOCIETY FOR MARINE MAMMALOGY, s.d.).

Figura 4 – Distribuição geográfica de indivíduos da espécie *Stenella frontalis*.



Fonte: A distribuição de indivíduos da espécie *S. frontalis* é representada pela marcação de cor alaranjada. Adaptado de (IUCN, 2012, versão 2017-2).

1.1.3 *Sotalia guianensis*

A espécie *Sotalia guianensis* (Van Bénédén, 1864, Figura 3) apresenta de 1,64 a 1,75 m de comprimento, o peso total máximo é de 121 kg e é conhecida popularmente como boto-cinza. A expectativa de vida da espécie é de cerca de 35 anos (ICMBio, s.d.).

Figura 5- Foto de um indivíduo da espécie *Sotalia guianensis*.



Fonte: Projeto Toninhas, s.d.

A distribuição do boto-cinza ocorre em áreas costeiras desde Honduras, na América Central, até o estado de Santa Catarina, no sul do Brasil (Figura 4). Seu habitat geralmente se restringe aos locais com profundidade inferior a 30 metros (MOURA, 2009). Uma característica singular desta espécie é apresentar um forte padrão de fidelidade ao habitat (AZEVEDO et al., 2007; FLORES; BAZZALO, 2004). Desse modo, os contaminantes detectados nesta espécie são bastante representativos do ambiente local (MOURA, 2009). Cabe destacar também que as regiões costeiras, habitat exclusivo da espécie, recebem muitos contaminantes provenientes das atividades humanas, como dejetos urbanos, agrícolas e industriais. Tais características fazem com que a espécie seja significativamente exposta aos contaminantes químicos que estão no seu ambiente (MOURA, 2009).

Ainda são poucas as informações com relação às populações de *S. guianensis*, principalmente no que se refere às taxas de mortalidade não natural e abundância (SECCHI, 2012). Tal fato impede a sua classificação quanto ao estado de conservação pela IUCN (2017c) que declara ainda ter dados insuficientes (“*data deficient*”) sobre a espécie. Todavia pesquisas vêm sendo desenvolvidas para melhor entender a sua biologia e ecologia, identificar potenciais

ameaças e medidas de conservação (DAURA-JORGE et al., 2005; MOURA, 2009; WEDEKIN et al., 2007; WEDEKIN; DAURA-JORGE; SIMÕES-LOPES, 2010)

Figura 6 – Distribuição de indivíduos da espécie *Sotalia guianensis*.



A distribuição de indivíduos da espécie *S. guianensis* é demonstrada na imagem por meio da marcação de cor alaranjada. Fonte: Adaptado de (IUCN, 2012, versão 2017-2).

1.2 BIOMARCADORES

Espécies de cetáceos também podem ser utilizadas em estudos que envolvem o uso de biomarcadores. Um biomarcador é caracterizado por ser uma alteração numa resposta biológica - molecular, celular, fisiológica ou comportamental - que pode ser medida e relacionada à exposição ou aos efeitos tóxicos de contaminantes ambientais (PEAKALL, 1994). Quando em nível molecular, os biomarcadores apresentam a vantagem de representar sinais de alerta precoces à exposição (OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

Muitos dos efeitos deletérios causados por poluentes químicos só se manifestam nos seres vivos após longo período de tempo. Assim, quando o efeito finalmente se torna perceptível, o processo destrutivo pode ter chegado ao ponto em que não pode ser revertido por ações de remediação. Logicamente, até que o efeito biológico frente à exposição aos poluentes seja perceptível em nível de ecossistemas, comunidade ou população, ele já afetou os órgãos, tecidos, células, organelas e, primeiramente, as moléculas do ser vivo. Portanto, os biomarcadores, por serem indicadores em/de curto prazo de efeitos adversos em/de longo prazo, permitem que ocorra intervenção antes que efeitos prejudiciais irreversíveis sejam inevitáveis (MCCARTHY; SHUGART, 1990).

Uma situação de estresse causada por poluentes normalmente desencadeia uma

cascata de respostas, cada uma das quais pode, em teoria, servir como biomarcador (McCARTHY et al., 1991 apud OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Assim, num contexto ambiental, os biomarcadores são capazes de demonstrar os compostos que entraram num organismo, foram distribuídos nos tecidos e, por ventura, provocaram um efeito tóxico em seus alvos (MCCARTHY; SHUGART, 1990). Ou seja, por meio de análises das respostas de biomarcadores podem ser obtidas informações sobre a exposição ou os efeitos tóxicos de químicos ambientais.

Cabe pontuar que a presença de xenobióticos (químicos que não são produzidos naturalmente pelo organismo) numa porção do ecossistema aquático muitas vezes não constitui, por si só, um risco para os seres vivos (OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Isso porquê uma vez que a exposição tenha ocorrido e as substâncias estão biodisponíveis, pode ocorrer uma sequência de respostas biológicas. O bem-estar do organismo será afetado ou não a partir da influência de muitos fatores, alguns intrínsecos (por exemplo, sexo, idade, período reprodutivo e dieta) e outros extrínsecos (como, dose e duração da exposição ao poluente, e a própria interação dos poluentes e seus derivados) (SHUGART et al., 1992, HEUGENS et al., 2001 apud OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Logo, percebe-se que a utilização de biomarcadores em estudos ecotoxicológicos parece ser vantajosa.

Adicionalmente é importante ter em vista que muitas variáveis não relacionadas à poluição, como a própria temperatura da água, podem ter um impacto adicional interferindo na resposta dos biomarcadores. Assim como várias substâncias podem afetar os mesmos biomarcadores, de modo que as respostas, na maioria das vezes, não são específicas para compostos químicos individuais. Desse modo, é importante que as condições experimentais sejam cuidadosamente analisadas ou controladas (OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Stegeman et al. (1992 apud OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003) destaca a importância de considerar a biologia básica e fisiologia do organismo teste, visando que fontes de variação descontrolada (como, crescimento, desenvolvimento, reprodução e fonte de alimento) possam ser minimizadas.

1.3 CITOCROMO P450

A exposição aos xenobióticos e a absorção destes pelos organismos pode gerar respostas que envolvem a ação de uma série de enzimas, as quais compõe o sistema de biotransformação de xenobióticos. Esse sistema é frequentemente dividido em reações de fase

I e de fase II (WOLKERS et al., 1998). Sua característica mais importante é a habilidade de facilitar a excreção dos poluentes, ao transformar xenobióticos lipofílicos em compostos mais solúveis em água (BUCHELI; FENT, 1995).

O citocromo P450 (CYP) desempenha um papel central na fase I da biotransformação, tanto de compostos endógenos (como vitaminas e ácidos graxos e biliares) quanto de exógenos (poluentes ambientais, drogas e álcoois, por exemplo) (NEBERT et al., 1991, 2004; WOLKERS et al., 1998). Esse grupo de enzimas compreende uma larga e extensa família de heme proteínas, localizadas predominantemente na membrana do retículo endoplasmático (BUCHELI; FENT, 1995; STEGEMAN et al., 1992 apud OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). O CYP foi encontrado originalmente em fígado de mamíferos, e, em seguida, foi registrado em outros animais, plantas, bactérias e fungos (NELSON et al., 1996).

As enzimas que constituem o CYP possuem tipicamente atividade monooxigenase, ou seja, introduzem um átomo de oxigênio em substratos lipofílicos, criando um grupo funcional para ligação de moléculas polares de origem endógena, como: açúcares, aminoácidos e sulfatos. A reação seguinte é catalisada pelas enzimas de fase II que formam um produto hidrofílico. A conversão de químicos lipofílicos em hidrofílicos facilita suas eliminações pelas células (ALMAZROO; MIAH; VENKATARAMANAN, 2017; BENEDETTI et al., 2009). Assim, uma variedade de CYPs pode influenciar a capacidade dos cetáceos de detoxificar e eliminar contaminantes (MCKINNEY et al., 2006). O CYP é considerado o sistema mais importante de enzimas metabólicas ou detoxificantes em mamíferos (STEGEMAN et al., 1992 apud FOSSI et al., 2012a).

Cabe pontuar que a adição de um átomo de oxigênio durante a fase I pode levar a formação de intermediários reativos com efeitos tóxicos, mutagênicos ou carcinogênicos (GOKSØYR, 1995). Assim, apesar do metabolismo mediado por CYP resultar principalmente em detoxificação, ele também pode estar envolvido no aumento do estresse oxidativo e noutros efeitos tóxicos (UNO et al., 2006).

As enzimas que compõe o CYP são divididas em diversas famílias e subfamílias de acordo com suas sequências de aminoácidos (NEBERT et al., 1991). O CYP1A, família 1, subfamília A (NEBERT et al., 1991) costuma ser induzida por hidrocarbonetos aromáticos planares (como certos bifenilos policlorados - PCBs), hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) e dioxinas, via ativação do receptor hidrocarboneto aril (AHR) (GOKSOYR, 1995). CYP1A é considerado o biomarcador mais bem estudado para a contaminação ambiental em ecossistemas aquáticos e também um dos mais sensíveis biomarcadores em peixes (OOST;

BEYER; VERMEULEN, 2003). Existem evidências de que a expressão e a atividade de CYP1A induzida em peixes estão relacionados aos dos poluentes nos animais e no meio ambiente de uma maneira dose-dependente (STEGEMAN; LECH, 1991). Cabe destacar que, em geral, as características associadas à indução de CYP1A em peixes são semelhantes às dos mamíferos (STEGEMAN; HAHN, 1994 apud OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

Em mamíferos, existem duas enzimas CYP1A, CYP1A1 e CYP1A2, que são imunoquímica e filogeneticamente relacionadas, mas sem especificidade idêntica ao substrato (NELSON et al., 1996). Assim, a expressão e a indução de CYP1A1 e CYP1A2 podem variar entre os tecidos (MILLER et al., 2005).

A indução do membro CYP1A1, em cetáceos, pode ocorrer em questão de horas após o início da exposição aos xenobióticos e conforme a metabolização ocorre seus níveis de expressão diminuem (ANGELL et al., 2004). Tendo em vista que a principal influência para a expressão de CYP1A1 é o nível de contaminantes ao qual o organismo é exposto (STEGEMAN; HAHN, 1994 apud ANGELL et al., 2004), a quantificação desta proteína em amostras de tecidos de cetáceos tem sido utilizada como biomarcador (ANGELL et al., 2004; FOSSI et al., 1992, 2008, 2010; MONTIE et al., 2008; WAUGHT et al., 2011; WHITE et al., 1994).

1.4 IMUNODETECÇÃO DE CYP1A1

A utilização de CYP1A1 em estudos ecotoxicológicos necessita de ferramentas que possibilitem detectar a sua expressão ou os níveis de sua atividade catalítica. Para tanto, há algumas técnicas disponíveis como: ensaios da função catalítica através da atividade da EROD (7-etóxi-resorufina-*O*-deetilase) e quantificações imunoquímicas de CYP1A1 pelas técnicas de *Western blotting* e radioimunoensaio, por exemplo. Adicionalmente, a detecção de CYP1A1 também pode ser feita por imunohistoquímica.

Em cetáceos, essas técnicas normalmente utilizam amostras de fígado ou biópsias de pele e gordura (WILSON; MOORE; STEGEMAN, 2010). Entretanto, poucos trabalhos buscaram detectar CYP1A1 ou associar a atividade catalítica em outros tecidos de cetáceos. Em 1994, Stegeman e colaboradores (apud WILSON; MOORE; STEGEMAN, 2010) detectaram CYP1A1 em órgãos extra-hepáticos da baleia *Globicephala melaena*. Em 2001, Hyyti e colaboradores identificaram os níveis da expressão da proteína CYP1A1 em fígado, pulmão, rins, glândulas adrenais, baço, coração, útero, placenta, testículo e epidídimo de focas (*Pusa hispida* e *Halichoerus grypus*) através de imunohistoquímica. Wilson e colaboradores (2005) detectaram CYP1A1 em beluga (*Delphinapterus leucas*) utilizando imunohistoquímica em

amostras de fígado, pulmão, bexiga e testículo. E ainda, Wilson, Moore e Stegeman (2010) detectaram CYP1A1 por *Western blotting* e relacionaram o resultado com a atividade EROD no golfinho-de-laterais-brancas (*Lagenorhynchus acutus*) em tecidos de vários órgãos, como: cérebro, coração, intestino, rim, fígado, pulmão, ovário, pâncreas, baço, estômago, testículo, timo e útero.

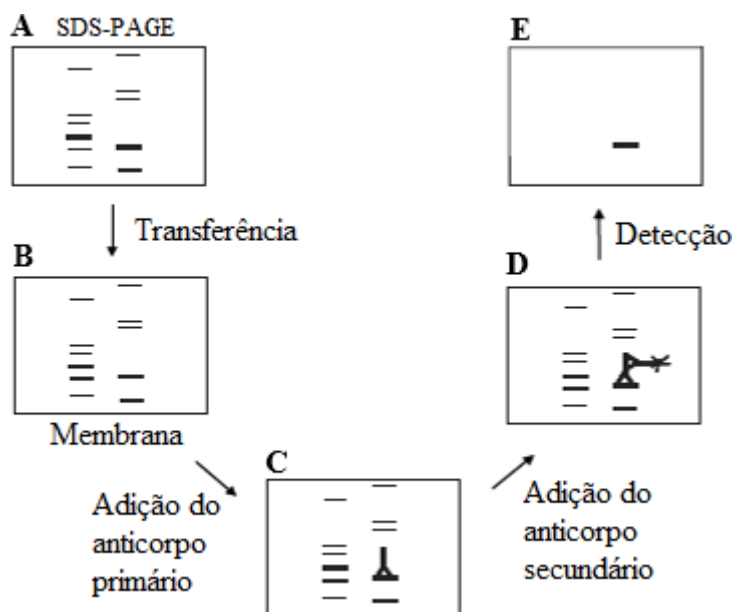
Os estudos supracitados, além de outros, que utilizaram a imunodeteção de CYP1A1 por *Western blotting* em cetáceos podem ser observadas no quadro apresentado no APÊNDICE A. O quadro apresenta algumas especificações destes estudos, nomeadamente: as espécies estudadas, o número amostral e o tecido biológico utilizado. Dentre os 17 trabalhos apresentados, cinco (29,41%) utilizaram *T. truncatus* (BACHMAN et al., 2015; FOSSI et al., 2006; 2008; 2014; GARRICK et al., 2006), um estudou *S. frontalis* e nenhum trabalho foi realizado com *S. guianensis*.

A seguir serão descritas algumas características da técnica de imunodeteção de proteínas por *Western blotting*.

1.4.1 Western Blotting

A técnica de *Western blotting* se caracteriza por ser um eficiente e importante procedimento para a imunodeteção de proteínas. Por meio desta técnica é possível detectar e caracterizar uma diversidade de proteínas, inclusive aquelas que apresentam baixa abundância. A técnica tem como característica central a transferência de proteínas presentes em um gel de poliacrilamida de dodecilsulfato de sódio (SDS) para uma membrana adsorvente. As proteínas na membrana são uma réplica exata do gel. A membrana por se tratar de material sólido e, portanto, mais resistente e maleável que o gel, possibilita que sejam desenvolvidos os procedimentos para a detecção de proteínas de interesse. Além disso, na membrana as proteínas ficam facilmente acessíveis aos diferentes anticorpos (KURIEN; SCOFIELD, 2006). A Figura 7 esquematiza as principais etapas da técnica.

Figura 7 – Esquemática das etapas da técnica de *Western blotting*.



A imagem esquematiza as principais etapas da técnica de *Western blotting*. (A) Eletroforese unidimensional em gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE, *SDS-polyacrylamide gel electrophoresis*); as bandas apresentadas são hipotéticas. (B) Exata réplica do gel SDS-PAGE na membrana, após a transferência. (C) Ligação do anticorpo primário com a proteína de interesse. (D) Ligação do anticorpo secundário acoplado com uma enzima reveladora, como fosfatase alcalina ou peroxidase, no anticorpo primário. (E) Detecção da proteína-alvo, por meio da emissão de um sinal fotossensível. Fonte: Adaptado de Kurien; Scofield (2006).

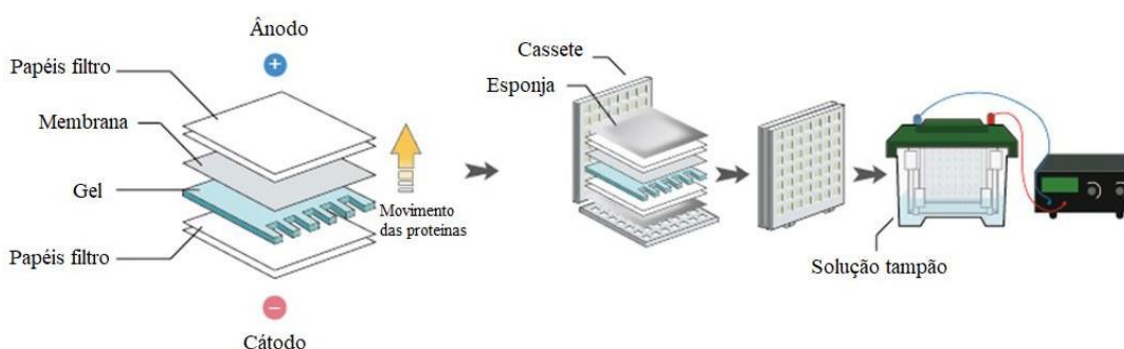
A metodologia de *Western blotting* foi desenvolvida em 1979 por Towbin e colaboradores. O primeiro método de transferência de uma biomolécula para uma membrana e a seguinte detecção foi desenvolvido quatro anos antes, em 1975, utilizando uma sequência de DNA e por ter sido realizada pelo britânico Edwing Southern, passou a ser chamada de *Southern blotting*. Em seguida, foi descrita outra técnica de transferência para verificar a expressão de RNAm, sendo denominada *Northern blotting*. A nomenclatura buscou elaborar um trocadilho entre os pontos cardenais e o método de detecção de DNA (BASTOS; MASSON, 2013). Logo, torna-se evidente o motivo do nome *Western blotting*.

A primeira etapa da técnica consiste na separação das proteínas de uma amostra, de acordo com suas respectivas massas moleculares por meio da eletroforese unidimensional em gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE). Para tanto, é aplicada em cada amostra uma solução tampão que permite o desovelamento das proteínas. Este tampão conta com um detergente, como o SDS, que rompe as ligações não covalentes das proteínas, e na presença

de um agente redutor, como o beta-mercaptoetanol, que rompe as ligações dissulfídica (S-S) entre os resíduos de cisteína. Para completar a desnaturação, as amostras são fervidas. Ao final deste processo, as proteínas se encontram separadas e linearizadas. Cabe destacar que o SDS adiciona carga negativa homogênea às proteínas, por meio das interações hidrofóbicas que estabelece, na proporção de uma molécula de detergente para cada dois resíduos de aminoácidos das proteínas. A partir desta ação, o SDS mascara a carga intrínseca das proteínas possibilitando a migração em direção ao polo positivo do campo elétrico. Portanto, as proteínas de um mesmo tamanho tendem a correr na mesma velocidade, uma vez que se apresentam na mesma forma, pois retornaram a estrutura primária (estão desenoveladas), e têm a mesma quantidade de carga negativa (fornecida pelo SDS) (BASTOS; MASSON, 2013).

Após a separação, é feita a transferência das proteínas que estão no gel para a membrana. A transferência ocorre por meio da aplicação de um campo elétrico, num ambiente em que o gel e a membrana permanecem em contato direto e imersos em tampão básico (Figura 8). Por meio de interações hidrofóbicas as proteínas se ligam fortemente à membrana. Os dois tipos de membrana mais utilizados são nitrocelulose e PVDF - fluoreto de polivinilideno. A membrana de nitrocelulose é a mais utilizada e é vantajosa em termos financeiros, enquanto a membrana de PVDF tem maior sensibilidade, capacidade de ligação com as proteínas e tempo de retenção destas (BASTOS; MASSON, 2013). A eficiência da transferência é determinada principalmente pelos seguintes fatores: a) concentração de poliacrilamida do gel; b) composição do tampão; c) temperatura; e d) tempo de transferência (KURIEN; SCOFIELD, 2006).

Figura 8 – Esquema representando a transferência das proteínas do gel SDS-PAGE para a membrana.



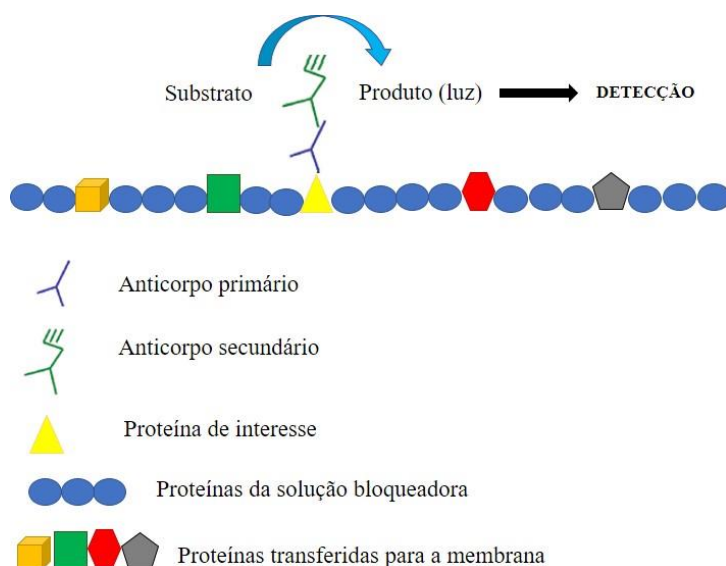
Nota-se que as proteínas migram do cátodo para o ânodo durante a transferência. Para tanto, são dispostos em ordem dentro de um cassete uma esponja, seguida de papéis filtro, da membrana, do gel, novamente papéis filtro e a esponja. O cassete é inserido dentro de uma cuba que contém solução tampão e onde será aplicado o campo elétrico. Fonte: Adaptado de Angel (s.d., disponível em: <https://angel.co/projects/452711-western-blot-drytransfer?src=user_profile>).

Feita a transferência, a membrana é incubada com uma solução, conhecida como bloqueadora, composta normalmente por leite desnatado ou albumina bovina. A solução bloqueadora tem como função se associar às regiões livres da membrana, ou seja, que não contêm proteínas. Tal associação visa inibir a ligação inespecífica entre os anticorpos que serão aplicados à membrana (BASTOS; MASSON, 2013).

Após o bloqueio, realiza-se a incubação com o anticorpo primário, que vai reagir com o epítipo - porção específica de um antígeno ao qual o anticorpo reconhece e se liga - da proteína que se deseja detectar, formando um complexo anticorpo-antígeno. Os anticorpos podem ser divididos em monoclonais, reagem apenas com um epítipo da proteína, e, policlonais, reconhecem diferentes porções da proteína. Enquanto os monoclonais são produzidos em laboratório por meio de células derivadas de um único linfócito B, célula do sistema imunológico que atribui a todos os anticorpos uma única especificidade, os policlonais são produzidos em mamíferos - coelhos, camundongos, equinos, bovinos, ovinos – ou em aves, geralmente galinha (VASCONCELOS, 2010).

Em seguida, é feita a incubação com o anticorpo secundário, que é específico para a espécie do animal em que foi desenvolvido o anticorpo primário e costuma estar complexado a uma enzima reveladora. Assim, por exemplo, se foi utilizado um anticorpo primário específico à proteína de interesse, produzido em coelho, será utilizado um anticorpo secundário anti-coelho, que reconhecerá qualquer anticorpo produzido em coelho. A enzima, conjugada ao anticorpo secundário, ao ser incubada com seu substrato específico produzirá um sinal que pode ser, por exemplo, fotossensível e poderá ser revelado em filme radiográfico (Figura 9). A este tipo de detecção é dado o nome de quimioluminescente. Entretanto, há outros métodos de detecção como o fluorescente no qual o anticorpo secundário está acoplado a uma sonda fluorescente que quando excitada no comprimento de onda apropriado emite a fluorescência que é captada por um foto sensor (BASTOS; MASSON, 2013; KURIEN; SCOFIELD, 2006). Ao final da aplicação da técnica a quantificação do sinal representa a medida de quanto da proteína-alvo está presente na amostra (BASTOS; MASSON, 2013).

Figura 9 - Esquema dos processos de ligação dos anticorpos primário e secundário na proteína de interesse e seguinte detecção.



Nota-se a ligação do anticorpo primário com a proteína de interesse, a seguinte ligação do anticorpo secundário e a liberação de luz quando a enzima é exposta ao substrato. A partir do processo de revelação a luz será detectada. Fonte: Adaptado de Bastos e Masson (2013).

Cabe elucidar que após a incubação da membrana na solução de bloqueio e com os anticorpos primário e secundário são realizadas uma série de lavagens na membrana, para a remoção das proteínas da solução de bloqueio que não se associaram a ela e dos anticorpos que não se ligaram aos seus antígenos correspondentes (BASTOS; MASSON, 2013).

Considerando que a metodologia de *Western blotting* apresenta várias etapas, a sua aplicação demanda uma série de ajustes finos até que as condições ótimas de cada etapa sejam definidas.

Dentro deste contexto, o presente trabalho teve como objetivo imunodetectar CYP1A1 em amostras teciduais de cetáceos odontocetos. E, para tanto, contou com a prévia padronização da técnica de *Western blotting* em amostras de baço, cérebro, fígado, gordura, músculo estriado esquelético, pele, pulmão e rim de *T. truncatus*. Em um contexto ecotoxicológico, esta padronização contribuirá para estudos futuros que visem à imunodetecção da proteína CYP1A1 nas espécies aqui estudadas. Portanto, sua aplicação poderá gerar subsídios para uma abordagem suplementar no monitoramento ambiental, e, consequentemente, para a conservação do ambiente marinho. Adicionalmente, os avanços metodológicos advindos deste trabalho poderão servir como base para o desenvolvimento de estudos sobre os mecanismos e efeitos tóxicos de químicos xenobióticos neste importante táxon.

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 Objetivo geral

O objetivo principal do presente trabalho foi imunodetectar a proteína CYP1A1 em amostras teciduais dos cetáceos odontocetos *T. truncatus*, *S. frontalis* e *S. guianensis*.

1.5.2 Objetivos específicos

- Padronizar a técnica de *Western blotting* em amostras de diferentes tecidos de *T. truncatus*, nomeadamente de: baço, cérebro, fígado, gordura, músculo estriado esquelético, pele, pulmão e rim.
- Identificar a expressão de CYP1A1 nas amostras de diferentes tecidos de *T. truncatus* e em fígado de *S. frontalis* e de *S. guianensis*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO

Para a realização deste estudo, foram utilizados quatro espécimes de *Tursiops truncatus*, um de *Stenella frontalis*, dois de *Sotalia guianensis* e dois de *Mugil liza*.

Um dos espécimes de *T. truncatus* foi encontrado na Praia do Mar Grosso, município de Laguna, Santa Catarina, recém morto (em código 2 de decomposição, ou seja, no máximo 24 horas após a morte). Tratava-se de um indivíduo macho adulto de idade avançada e residente do Complexo Lagunar Santo Antônio dos Anjos-Imaruí-Mirim. Procedeu-se a coleta de porções de diferentes tecidos deste espécime, nomeadamente de: baço, cérebro, fígado, gordura, músculo estriado esquelético, pele, pulmão e rim. Os tecidos coletados foram imediatamente transferidos para microtubos livres de nucleases contendo 1 mL da solução de RNAlater(Ambion), sendo armazenados em freezer -80°C até o início de suas aplicações nos experimentos.

Outro espécime de *T. truncatus* é macho, adulto e residente do Complexo Lagunar de Santo Antônio dos Anjos-Imaruí-Mirim, município de Laguna, Santa Catarina. Neste foi realizada a biópsia da pele mediante autorização do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA): SISBIO 47076-1. A biópsia faz parte da dissertação desenvolvida por Bárbara Rigueti (2017). De acordo com Rigueti (2017), a amostra foi transferida para microtubos de 2 mL livres de nucleases e imediatamente armazenada em nitrogênio líquido. Ao final do dia de coleta a amostra foi transferida para freezer -80°C até o início das atividades laboratoriais. Esta pele será denominada pele#2.

Os outros dois espécimes de *T. truncatus* se referem a fêmeas encontradas mortas (em código 2 de decomposição) na Praia de Flamingo, município de Matinhos, Paraná. Realizou-se a coleta de amostras do tecido hepático, que foram imediatamente armazenadas em RNAlater e, em seguida, em freezer -80°C até serem realizadas as análises. Uma das fêmeas era adulta e sua amostra será denominada Fígado#2, a outra era juvenil e sua amostra será chamada Fígado#3.

As amostras de tecido hepático dos espécimes de *S. frontalis* e *S. guianensis* são provenientes da coleção do Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica (LABCAI -UFSC). Sabe-se que os espécimes foram encontrados mortos (em código 2 de decomposição) e que feita a coleta as amostras foram transferidas para microtubos livres de nucleases e armazenadas em nitrogênio líquido. Procedeu-se também o

armazenamento das amostras em freezer -80°C até o início das atividades laboratoriais. A amostra de *S. frontalis* será denominada Fígado “A”, enquanto que a amostra de um espécime de *S. guianensis* será denominada Fígado “B1” e a amostra do outro de fígado “B2”.

Amostras de tecido hepático de dois espécimes de *M. liza* (conhecida popularmente como tainha), previamente expostos ao óleo diesel, foram utilizados como controles positivos durante a realização da técnica de *Western blotting* (número do protocolo da Comissão de Ética do Uso dos Animais, CEUA - UFSC: PP00921). Um dos espécimes será denominado CP-1 e o outro CP-2. Feita a coleta das amostras de tecido hepático estas foram imediatamente transferidas para microtubos livres de nucleases e mantidas em nitrogênio líquido. O armazenamento ocorreu em freezer -80°C até a aplicação das amostras nos experimentos.

2.2 HOMOGENEIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras de todos os tecidos foram descongeladas sobre o gelo e pesadas. Aproximadamente 150 mg de cada tecido foram selecionados para o procedimento, que iniciou com três lavagens para eliminar o excesso da solução de RNAlater utilizando-se o tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,4) e KCl 150 mM. As amostras foram, então, homogeneizadas em cinco vezes o tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), contendo KCl 150 mM, DTT (ditiotreitól) 1 mM e o inibidor de proteases PMSF (fluoreto de fenilmetano sulfonilo) na concentração de 0,5 mM. Foi utilizado o homogeneizador TissueTearor (Biospec) por meio de ciclos de ruptura, com as amostras mantidas no gelo para evitar o superaquecimento. As amostras foram centrifugadas a 9000 g, a 4°C durante 30 minutos. O sobrenadante (fração S9) de cada amostra, resultante do processo de centrifugação, foi transferido para um novo microtubo. A fração S9 foi centrifugada a 100.000 g, a 4°C , por 60 minutos. A fração sobrenadante (citossólica) foi transferida para um microtubo e o microssoma foi ressuspensionado em 100 μL de tampão Tris-HCl 0,1 M com 1 mM de EDTA (ácido etilendiamino tetra- acético), DTT 1 mM, KCl 0,1 M e glicerol 20%. As frações microssomal e citossólica homogeneizadas foram armazenadas no freezer -80°C até o prosseguimento das atividades. Por se tratar de uma proteína da membrana do retículo endoplasmático, para a imunodeteção de CYP1A1 utilizou-se a fração microssomal.

Cabe salientar algumas alterações nos procedimentos recém descritos: (a) para as amostras que não foram armazenadas em RNAlater, não foram realizadas as lavagens antes da aplicação do homogeneizador; (b) a quantidade de amostra adquirida na biópsia de pele de *T. truncatus* (pele#2) não foi suficiente para adquirir a fração microssomal, desse modo, utilizou-se a fração S9; (c) a pele#2 de *T. truncatus* foi homogeneizada em sete vezes o tampão de homogeneização e não em cinco vezes como as demais.

2.3 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

A quantificação das proteínas presentes na fração microsomal foi realizada por meio do método de Bradford (BRADFORD, 1976). Assim, em seguida, foi realizada a leitura em 595nm utilizando o espectrofluorímetro (SpectraMax, Molecular Devices). Os resultados foram comparados com uma curva padrão de proteínas, feita a partir de concentrações conhecidas da proteína albumina sérica bovina (Sigma). Com a dosagem de proteínas realizada foi possível determinar a concentração de proteína para cada amostra utilizada na técnica de *Western blotting*.

2.4 WESTERN BLOTTING

A técnica de *Western Blotting* foi padronizada a partir de modificações do protocolo de Kloepper-Sams et al. (1987).

Todas as amostras referentes à fração microsomal e a fração S9 (no caso da pele#2) resultantes da homogeneização descrita no item 2.2, foram diluídas em tampão de amostra desnaturante (Tris 0,5 M, pH 6,8, β -mercaptoetanol 10%, azul de bromofenol 0,005%, SDS 4% e glicerol 20%). Para garantir a desnaturação das proteínas, as amostras foram fervidas, em banho-maria, a cerca de 95°C durante três minutos, e imediatamente colocadas no gelo, para evitar a renaturação das proteínas. Os volumes de amostra e tampão de amostra foram correspondentes à determinada quantidade de proteínas requerida.

Cada amostra foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante, utilizando o sistema MiniPROTEAN II (BioRad Laboratories). As amostras ressuspensas em tampão de amostra desnaturante foram aplicadas no gel. A solução do gel de entrada com concentração final de acrilamida de 4% continha: tampão TRIS 0,5 M, pH 6,8, acrilamida 30%, SDS 10%, PSA 10% e TEMED (tetrametiletlenodiamina). A solução do gel de separação com concentração final de acrilamida de 12% continha: tampão TRIS 1,5 M, pH 8,8, acrilamida 30%, SDS 10%, PSA 10% e TEMED. O sistema foi montado em cuba apropriada e preenchido com tampão de corrida 1X, constituído de: TRIS 0,25 M, Glicina 1,92 M, SDS 1 %, pH 8,3. Após a eletroforese (80 V por aproximadamente 1 hora no gel de entrada, e, 120 V por cerca de 1 hora e 30 minutos no gel de separação), os géis foram submetidos à transferência das proteínas para uma membrana de nitrocelulose.

A transferência foi realizada em cuba apropriada, por meio de uma corrente elétrica de 0,40A, por 1 hora e 30 minutos ou 2 horas, como será explicado a seguir. Para tanto, o gel e a membrana foram acomodados no centro da cuba embebidos em tampão de transferência

CAPS 1X (ácido 3-(ciclohexilamino)-1-propanosulfônico), 0,1M, pH 11,0 com metanol 10%. A cuba foi colocada sobre um agitador magnético, permitindo a circulação da solução tampão. Durante a transferência também é importante manter a temperatura, evitando o aquecimento do sistema. Assim, além de ter uma placa de gelo dentro da cuba, esta foi mantida sobre uma bandeja com gelo.

Ao final da transferência, a membrana foi bloqueada com a solução de bloqueio, constituída por: Tris 1X 0,1M NaCl 1,5M, leite 5%, Tween 0,05%, pH 7,5. A membrana permaneceu submersa nesta solução: a) agitando lentamente durante uma hora, em temperatura ambiente; b) *overnight* a cerca de 4°C e estática; c) agitando vagarosamente a temperatura ambiente mais 30 minutos no dia seguinte.

Após o período de bloqueio, foram realizadas cinco lavagens na membrana com TBS-T (Tris 1X 0,1M, NaCl 1,5M, Tween 0,05%, pH 7,5). As lavagens e incubações, de 5 minutos, foram realizadas à temperatura ambiente e com agitação constante.

Em seguida, procedeu-se a incubação com o anticorpo primário policlonal anti-citocromo P450 1A1 produzido em coelho (ab124295, ABCAM). Este anticorpo primário reage com especificidade contra o CYP1A1 da espécie *Homo sapiens*, com um peso molecular de 73kDa, maior do que o previsto que corresponde a 58kDa. Feita a incubação, procederam-se novas lavagens, a incubação com o anticorpo secundário anti-coelho (Amersham Pharmacia) e a revelação pelo método de quimioluminescência, em filme radiográfico (ECL Hyperfilm, Amersham Pharmacia). Detalhes de como ocorreram esses procedimentos, de quais amostras foram utilizadas e com qual concentração proteica e diluição dos anticorpos utilizados serão detalhados a seguir para cada um dos experimentos.

Por fim, a imagem revelada foi analisada por densitometria, técnica que quantifica os resultados em termos da intensidade, por meio do software livre Image Studio Lite (LI-COR Biosciences, versão 5.2.5). As unidades densitométricas arbitrárias (U.D.A) identificadas, resultaram da subtração do valor do *background* no sinal identificado de cada banda imunoreativa.

2.4.1 Experimento A

Neste experimento foram utilizados todos os tecidos coletados de *T. truncatus*, com a maioria das amostras em duas concentrações de proteínas diferentes, sendo elas: 15 µg e 30 µg. As amostras que não foram aplicadas com estas concentrações continham baixa concentração de proteínas de modo que era impossível aplicar concentrações maiores do que as

que foram aplicadas, tendo em vista o tamanho do poço do gel de poliacrilamida. Assim, as amostras de gordura e de pele foram aplicadas com 10 µg de proteína, a amostra de cérebro foi aplicada com 15 µg e 20 µg de proteínas, e o pulmão com 15 e 20 µg de proteínas. Neste experimento, também foi utilizada a pele#2 de *T. truncatus* com 15 µg e 30 µg de proteínas. Por fim, aplicou-se o controle positivo CP-1 com 17 µg de proteínas.

Após o término da migração das amostras no gel de acrilamida, as proteínas foram transferidas para a membrana de nitrocelulose por 1 hora e 30 minutos. A transferência foi confirmada pela presença do marcador de peso molecular na membrana. A membrana foi incubada com o anticorpo anti-citocromo P450 1A1 (ab124295, ABCAM) na diluição de 1:1000 durante duas horas a temperatura ambiente. Após três lavagens com TBS-T, a membrana foi incubada por uma hora com o anticorpo secundário anti-coelho (Amersham Pharmacia) na diluição de 1:2000. Durante as incubações a membrana permaneceu a temperatura ambiente, agitando de maneira branda. Ao final, a membrana foi lavada três vezes com TBS-T e a revelação realizada conforme descrito abaixo.

Para a revelação foi preparada a solução contendo: luminol 1,25mM, ácido-p-cumárico 68µM, peróxido de hidrogênio 0,009%, TRIS-Base 0,1M, pH 8,5. A solução de revelação foi colocada sobre a membrana e permaneceu ali durante 3 minutos, agitando lentamente. Em seguida, o filme radiográfico foi exposto a membrana dentro do chassi, por 5 minutos. Procedeu-se a submersão do filme de maneira sequencial na solução reveladora (Carestream dental) por 1 minuto, na solução de ácido acético por 30 segundos, e, na solução fixadora (Carestream dental) por mais 1 minuto.

2.4.2 Experimento B

Neste experimento foram utilizadas apenas as amostras dos tecidos que foram imunodetectadas previamente no experimento "A": baço, pele, pulmão, rim e a pele#2 de *T. truncatus*. As amostras de baço e de rim foram utilizadas nas concentrações de 30 µg e 60 µg de proteínas, respectivamente, enquanto que o pulmão e a pele foram aplicados com a concentração máxima possível de proteínas: 20 µg e 10 µg, respectivamente. A amostra pele#2 foi aplicada com 30 µg de proteínas. Desta vez, foram utilizados os controles positivos CP-1 e CP-2 ambos com 30 µg de proteínas.

A partir deste experimento, a duração da transferência passou a ser de 2 horas. E também com o intuito de verificar a qualidade da transferência, ao final do procedimento, o gel foi corado com azul de *Coomassie* (metanol 10%, ácido acético 5% e azul de *Coomassie* 1%) *overnight* e descorado em água destilada.

O principal diferencial deste experimento se refere à imunodeteção, pois a partir deste experimento foi utilizado o kit ECL Select (Amersham Pharmacia), que possui maior sensibilidade para detectar proteínas em baixa abundância nas amostras. Ainda, após a detecção, a membrana de nitrocelulose foi corada com *Ponceau* (ácido acético 5%, *Ponceau* 0,1%).

A diluição do anticorpo anti-citocromo P450 1A1 (ab124295, ABCAM) se manteve em 1:1000. Entretanto, foi reduzido o tempo para 1 hora de incubação, de acordo com as orientações do kit ECL Select. Ainda seguindo as instruções, foram realizadas mudanças nas lavagens que sucedem a incubação dos anticorpos, as quais se constituíram por dois enxagues com TBS-T e mais seis lavagens, cada uma de 5 minutos, agitando a solução de TBS-T que cobria a membrana. Em seguida, foi realizada a incubação com o anticorpo secundário anti-coelho (Amersham Pharmacia), durante uma hora, com uma diluição de 1:100.000, também seguindo as orientações do kit ECL Select. Por fim, foram realizadas as lavagens e procedeu-se com a revelação. A membrana permaneceu cinco minutos na solução de revelação e, em seguida, ocorreram os procedimentos padrões de revelação como explicado no experimento “A”.

2.4.3 Experimento C

Neste experimento, amostras de *T. truncatus* previamente imunodetectadas durante o experimento “A” foram utilizadas. Com relação às amostras e suas concentrações proteicas, ocorreram apenas as seguintes alterações: a) a amostra do baço foi utilizada apenas com 30 µg de proteína; b) foi acrescentada a amostra Fígado#2 de *T. truncatus* com 45 µg de proteínas.

A principal diferença deste experimento em relação ao experimento “B” foi de que a diluição do anticorpo anti-citocromo P450 1A1 (ab124295, ABCAM) foi de 1:500. As demais etapas permaneceram inalteradas.

2.4.4 Experimento D

Após o experimento “C” foi realizada a remoção dos anticorpos primário e secundário da membrana, procedimento conhecido como *stripping*, e foi realizada nova incubação com os anticorpos. Após o *stripping*, a membrana foi incubada durante 2 horas com o anticorpo anti-citocromo P450 1A1 (ab124295, ABCAM) na diluição de 1:500. A incubação com o anticorpo secundário anti-coelho (Amersham Pharmacia) ocorreu na diluição de 1:50.000 da solução de bloqueio, durante 1 hora e 30 minutos. As lavagens e o procedimento

de revelação ocorreram do mesmo modo descrito no experimento “B”.

2.4.5 Experimento E

Com as condições ideais de incubação dos anticorpos primário e secundário determinadas, voltou-se a utilizar as amostras de todos os tecidos coletados de *T. truncatus*. Neste experimento também foram aplicados 30 µg de proteínas de fígado de dois espécimes de *S. guianensis* e de um espécime de *S. frontalis*. Quanto à concentração de proteínas das amostras de *T. truncatus*, buscou-se utilizar a maior possível para cada tecido. Assim, as amostras de músculo e rim foram utilizadas com 45 µg e 60 µg, respectivamente; a amostra de fígado foi utilizada com 45 µg e 50 µg; a amostra de baço com 30 µg; as amostras de cérebro e pulmão com 20 µg; e as amostras da pele e da gordura com 10 µg de proteínas. Utilizou-se apenas o controle positivo CP-2, com a concentração de 30 µg de proteínas.

Em concordância com o que foi analisado até o momento, as condições da técnica escolhidas para o último experimento foram: a) a transferência foi realizada durante 2 horas, com o cuidado de manter a temperatura constante do sistema e com o tampão de transferência circulando dentro da cuba; b) as lavagens após a incubação de cada anticorpo foram realizadas conforme as instruções do kit ECL Select; c) o anticorpo anti-citocromo P450 1A1 (ab124295, ABCAM) foi incubado durante 2 horas na diluição de 1:500 de solução de bloqueio, e o anticorpo secundário anti-coelho (Amersham Pharmacia) foi incubado durante 1 hora e 30 minutos na diluição de 1:50.000 de solução de bloqueio. A revelação foi realizada utilizando-se os reagentes do kit ECL Select (Amersham Pharmacia).

3. RESULTADOS

3.1 EXPERIMENTO A

Um dos resultados do experimento “A” é apresentado na Figura 10. Para este teste, foram aplicados 15 μg de proteína das amostras de diferentes tecidos de *Tursiops truncatus*, com exceção das amostras de pele e de gordura, que apresentavam 10 μg de proteínas. Para o controle positivo CP-1, referente ao fígado de *Mugil liza*, foram utilizados 17 μg de proteínas. Foi verificada a reatividade cruzada através da presença de bandas imunoreativas, que representam a expressão da proteína CYP1A1. Essas bandas correspondem à amostra do controle positivo CP-1 (fígado de *M. liza*, 7.396 U.D.A.) e à amostra de pele de *Tursiops truncatus* (4.726 U.D.A.). O peso molecular aparente de CYP1A1 em fígado de *M. liza* é de 52 kDa, enquanto a banda imunoreativa da amostra da pele apresenta um peso molecular aparente acima de 52 kDa.

Figura 10 – Imunodeteção de CYP1A1 em amostras teciduais de *Tursiops truncatus* nas condições do experimento “A”, com as menores concentrações de proteínas.

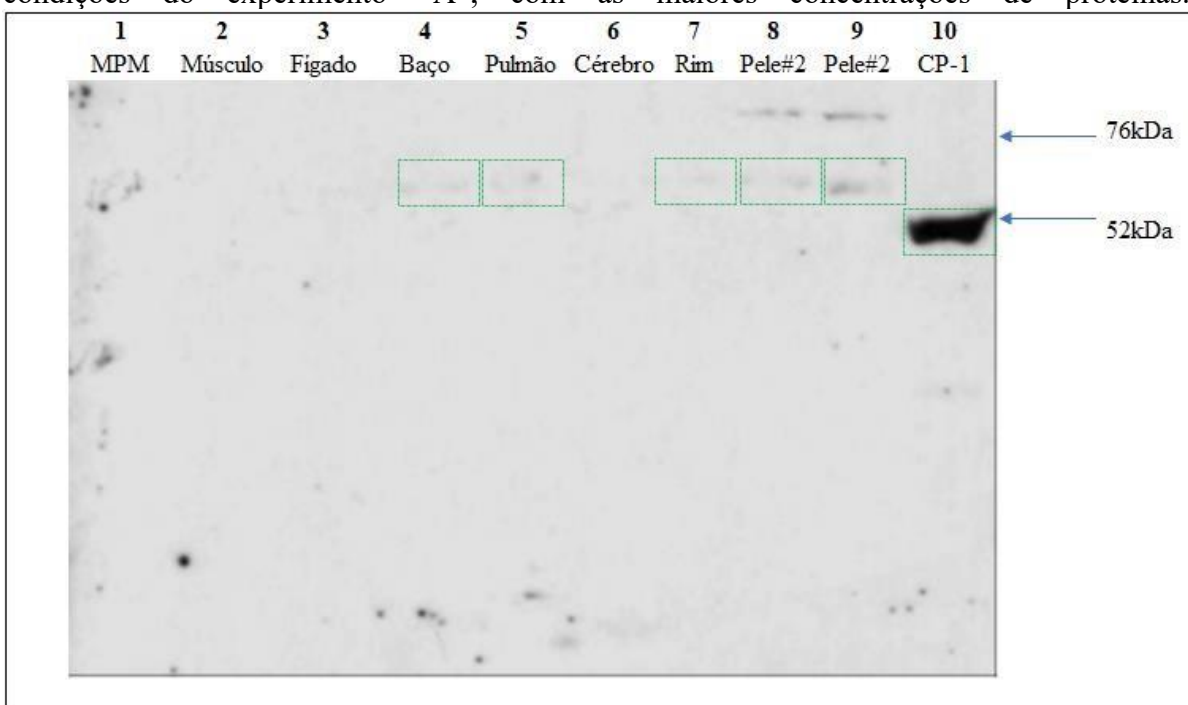


Na linha 1 está o marcador de peso molecular (MPM) e na linha 2 o controle positivo CP-1, com 17 μg de proteínas. As amostras de gordura (linha 7) e de pele (linha 10) apresentam uma concentração proteica de 10 μg . As demais amostras contêm 15 μg de proteínas.

Na Figura 11 é apresentado o resultado da imunodeteção utilizando-se 30 μg de proteínas, com exceção das amostras de cérebro e pulmão, que contêm 20 μg de proteínas, além da pele #2, com 15 μg de proteínas, e o controle positivo CP-1, com 17 μg de proteínas.

Novamente foi detectada uma banda imunoreativa no controle positivo CP-1, porém apesar de ter sido aplicada a mesma concentração de proteínas que no gel anterior, a banda ficou mais evidente, com 24.489 U.D.A. A amostra de pele#2 contendo 15 μg de proteínas (linha 8) apresenta duas bandas imunoreativas, uma ligeiramente acima dos 52 kDa (com 689 U.D.A.) e outra ultrapassando o peso molecular de 76 kDa (com 972 U.D.A.). A formação de duas bandas imunoreativas também ocorre com a amostra de pele#2 com 30 μg de proteínas (linha 9), sendo que logo acima dos 52 kDa a banda conta com 1.111 U.D.A. e ultrapassando o peso molecular de 76 kDa a banda contém 1.482 U.D.A. Logo, conclui-se que ocorreu a formação de ligações inespecíficas entre o anticorpo e a proteína de interesse, representada pela banda de maior peso molecular. Observou-se, ainda, que, a intensidade da banda da amostra de pele#2 com 15 μg de proteínas é menor do que com 30 μg de proteínas. Nas amostras de baço, pulmão e rim podem ser visualizadas marcações tênues (com 349, 277, 133 U.D.A., respectivamente), que indicam a presença de possíveis bandas, que contêm peso molecular aparente um pouco acima dos 52 kDa. Novamente, o peso molecular aparente de CYP1A1 em fígado de *M. liza* é de 52 kDa.

Figura 11 – Imunodeteção de CYP1A1 em amostras teciduais de *Tursiops truncatus* nas condições do experimento “A”, com as maiores concentrações de proteínas.

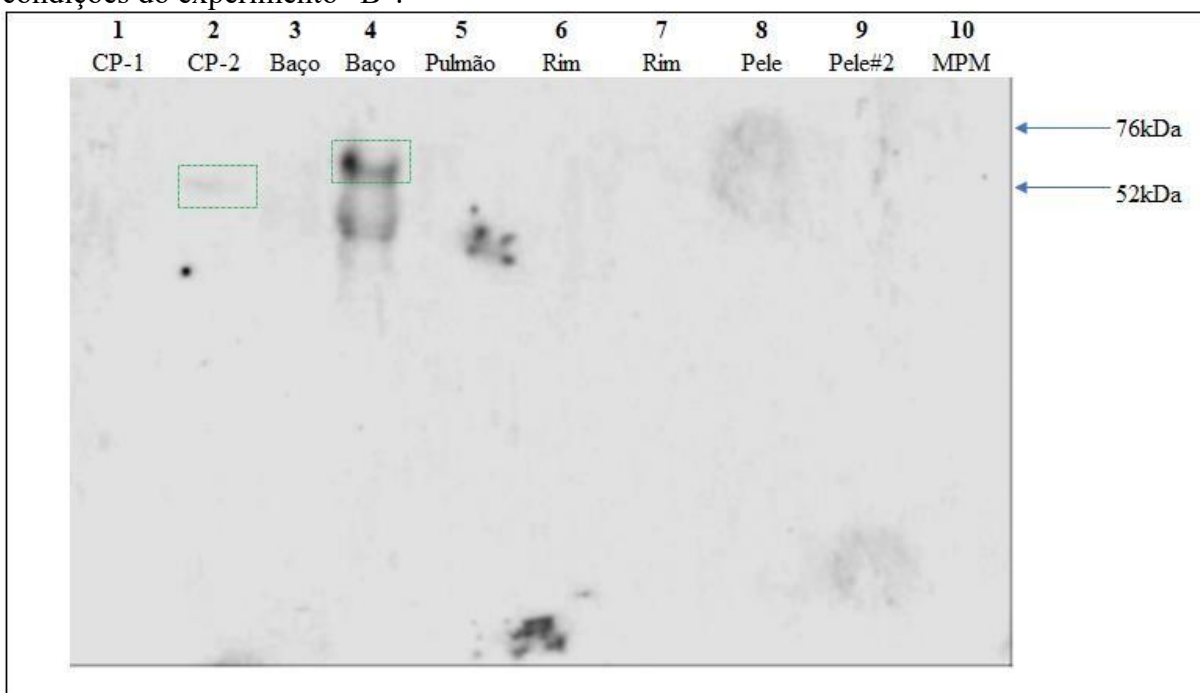


O marcador de peso molecular (MPM) está na linha 1 e o controle positivo CP-1 contém 17 μg de proteína e está na linha 10. As amostras de pulmão (linha 5) e de cérebro (linha 6) contêm 20 μg de proteínas e a pele #2 (linha 8) contém 15 μg de proteínas; as demais amostras contêm 30 μg de proteínas.

3.2 EXPERIMENTO B

Neste experimento, foram utilizadas apenas as amostras dos tecidos de *T. truncatus* que demonstraram apresentar bandas imunoreativas no experimento anterior. Essas amostras foram testadas com a máxima concentração de proteínas possível. Cabe salientar que a partir deste experimento foi utilizado o kit ECL Select (Amersham Pharmacia). Como pode ser observado na Figura 12, dentre os controles positivos, apenas o CP-2 (linha 2) apresentou uma banda imunoreativa, com 686 U.D.A. A amostra de baço com 60 μg de proteínas apresentou duas bandas imunorreativas, uma logo acima do peso molecular de 52 kDa (com 6.949 U.D.A.) e outra abaixo deste mesmo peso (com 5.169 U.D.A.). Assim, novamente, nota-se a presença de reações inespecíficas entre o anticorpo e a proteína de interesse.

Figura 12 – Imunodeteccção de CYP1A1 amostras teciduais de *Tursiops truncatus* nas condições do experimento “B”.



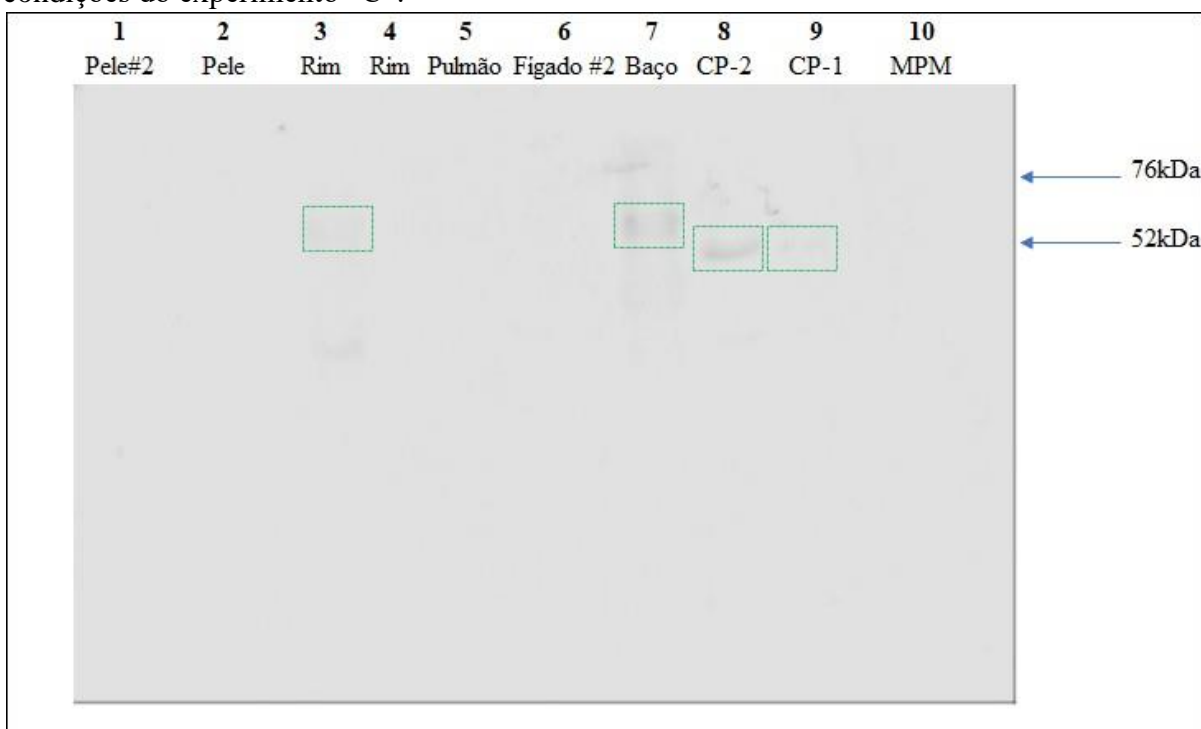
Os controles positivos, CP-1 e CP-2, apresentam 30 μg de proteínas e se localizam nas primeira e segunda linhas, respectivamente. Na linha 3 o baço foi aplicado com 30 μg de proteínas e na linha 4 com 60 μg . A amostra de pulmão contém 20 μg de proteínas. Nas linhas 6 e 7 estão as amostras de rim com 30 e 60 μg de proteínas respectivamente. A amostra de pele (linha 8) abriga uma concentração de 10 μg de proteínas, enquanto que a pele#2 (linha 9) conta com 30 μg de proteínas. Na linha 10 se encontra o marcador de peso molecular (MPM). Notam-se algumas manchas que são artefatos da técnica.

3.3 EXPERIMENTO C

Nesta etapa do trabalho, observou-se reatividade nas seguintes amostras: rim (60 μg de proteínas) e baço (30 μg de proteínas) de *T. truncatus*, e nos controles positivos (CP-1 e

CP-2, ambos com 30 μ g de proteínas) (Figura 13). A banda imunodetectada da amostra de rim apresenta 1.698 U.D.A., enquanto que a do baço contém 7.035 U.D.A, sendo que ambas apresentam um peso molecular aparente ligeiramente acima de 52 kDa. A banda identificada em CP-1, apesar de fraca (conta com 1.870 U.D.A.), está na mesma altura que a banda mais forte do CP-2 (de 9.509 U.D.A.). Foram observadas reações inespecíficas em todas as bandas imunoreativas para CYP1A1, com exceção daquela identificada na amostra CP-1.

Figura 13 – Imunodeteccção de CYP1A1 em amostras teciduais de *Tursiops truncatus* nas condições do experimento “C”.



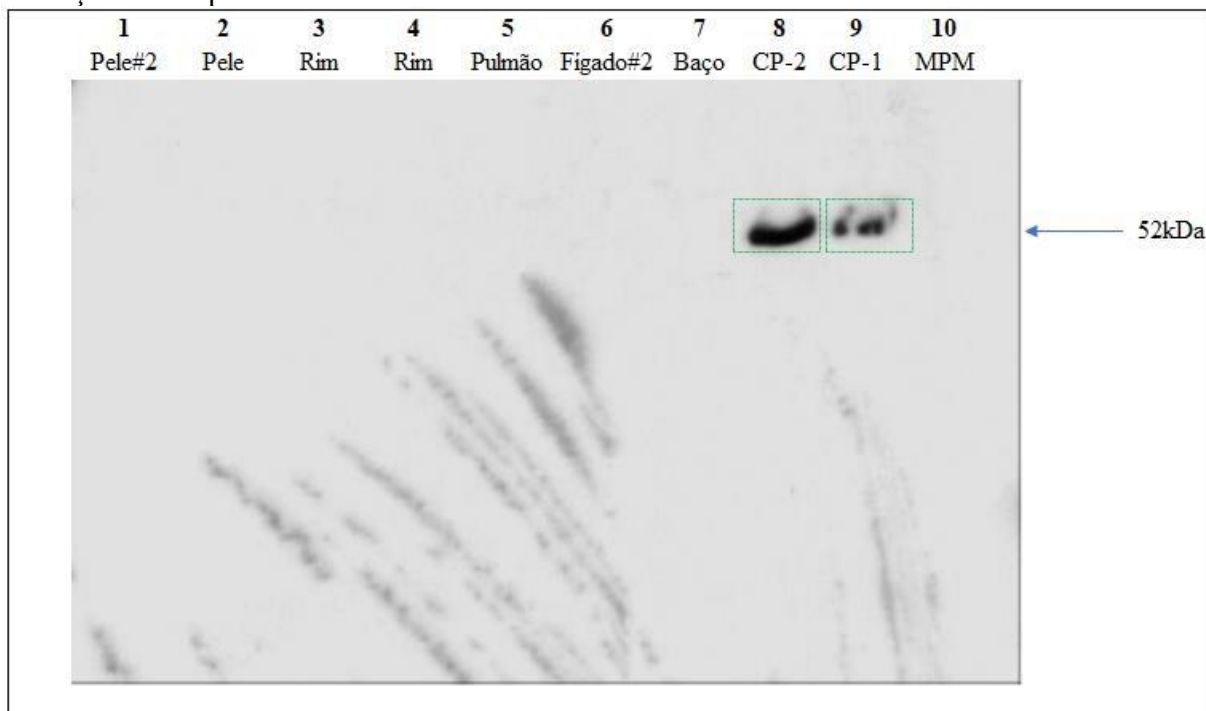
As amostras de pele#2 (linha 1) e de pele (linha 2) foram aplicadas com 30 μ g e 10 μ g de proteínas, respectivamente. O rim foi aplicado com 30 μ g de proteínas (linha 4), e com 60 μ g de proteínas (linha 3). A amostra de pulmão contém 20 μ g de proteínas (linha 5). O fígado#2 conta com 45 μ g de proteínas. O baço e os controles positivos, CP-1 e CP-2, contêm 30 μ g de proteínas.

3.4 EXPERIMENTO D

No quarto experimento realizado ao longo deste trabalho, foram detectados os controles positivos com bandas imunoreativas fortes e bem evidentes, com o peso molecular aparente de 52 kDa (Figura 14). Nota-se ainda que o controle positivo CP-2 apresenta uma marcação mais forte (de 103.900 U.D.A.) e contínua do que CP-1 (de 59.300 U.D.A.). Entretanto, não foi identificada reatividade entre o anticorpo primário e as proteínas de nenhum tecido de *T. truncatus*. Por fim, podem ser observadas algumas manchas que caracterizam

artefatos da técnica.

Figura 14 - Imunodeteção de CYP1A1 em amostras teciduais de *Tursiops truncatus* nas condições do experimento “D”.



A membrana deste experimento é a mesma que a do experimento “C”, de modo que a aplicação das amostras com suas respectivas concentrações de proteínas e disposição permanecem as mesmas. Além das duas bandas dos controles positivos, notam-se marcações no filme que são artefatos da técnica.

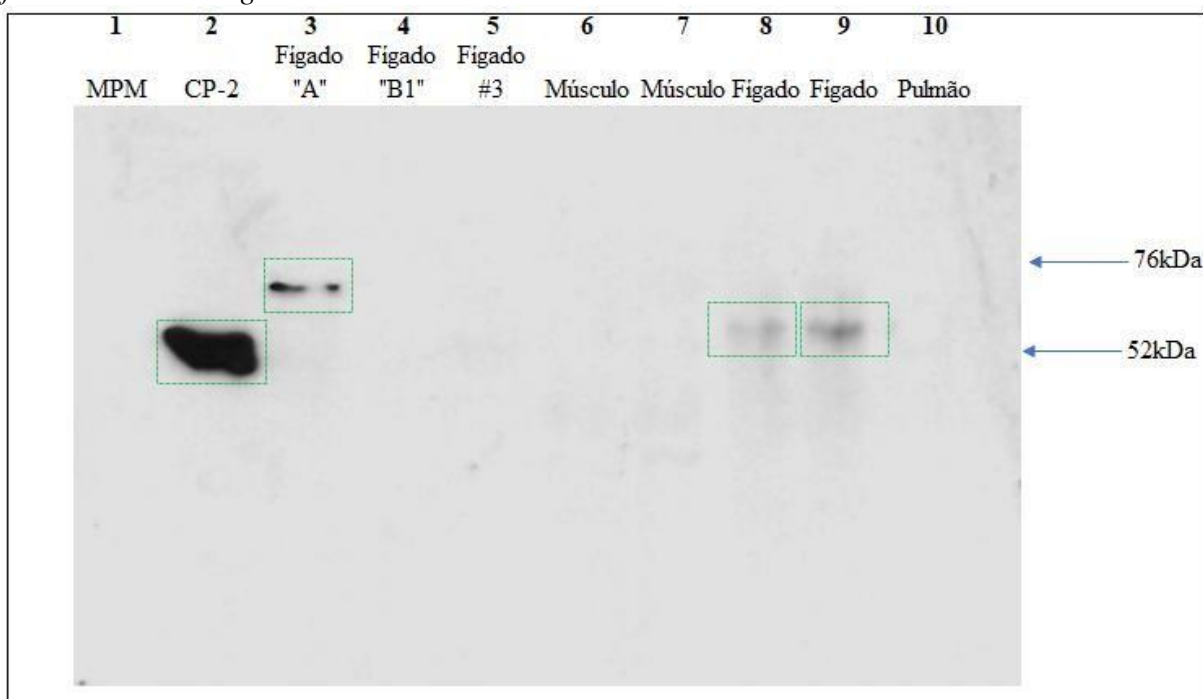
3.5 EXPERIMENTO E

Inicialmente foram realizadas etapas de padronização da técnica de *Western blotting* para imunodetectar a proteína CYP1A1 em diferentes tecidos de *T. truncatus*, como demonstrado ao longo dos experimentos A B, C e D. Posteriormente à padronização, realizaram-se testes com outras duas espécies de cetáceos odontocetos, *Stenella frontalis* e *Sotalia guianensis*. O presente experimento, demonstra estes últimos testes e está dividido em duas partes, cada uma delas representada pelas Figuras 15 e 16.

Na Figura 15 se observa a imunodeteção das seguintes amostras: controle positivo CP-2 (30µg de proteínas), fígado de *S. frontalis* (30µg de proteínas), fígado de *T. truncatus* (com 45µg de proteínas, linha 8, e 50 µg de proteínas, linha 9). A banda do controle positivo CP-2 se destaca nesta revelação, apresentando 139.873 U.D.A. A banda da amostra de fígado de *S. frontalis* (fígado “A”) apesar de não ser contínua, é relativamente forte, e apresenta 24.690 U.D.A e tem um peso molecular aparente inferior a 76 kDa. As amostras de *T. truncatus* continuam ligeiramente acima dos 52 kDa, sendo que a banda da amostra de fígado com 45 µg

de proteínas é mais fraca que a mesma amostra com 50 μg de proteína, apresentando 10.289 e 19.888 U.D.A, respectivamente. Adicionalmente, não foi identificada nenhuma reatividade na amostra de fígado de *S. guianensis* (fígado “B1”).

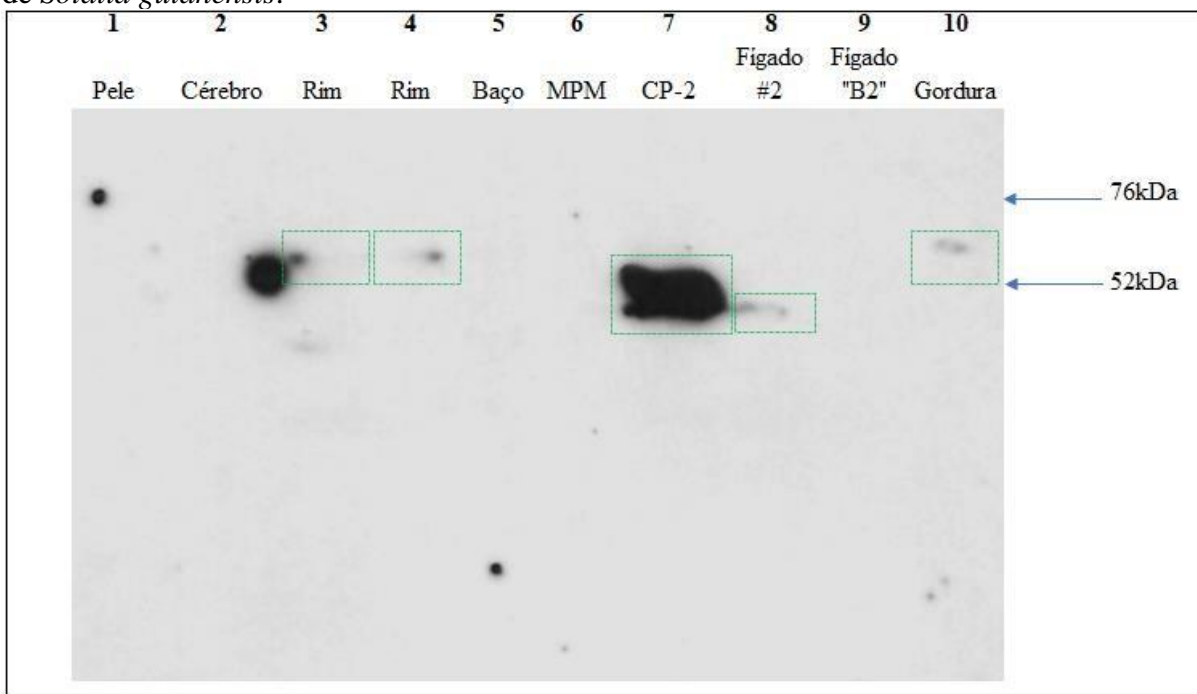
Figura 15 – Imunodeteção de amostras teciduais de *Tursiops truncatus* e de fígado de *Stenella frontalis* e *Sotalia guianensis*.



O marcador de peso molecular (MPM) foi aplicado na linha 1. Na linha 2 está o controle positivo CP-2, com 30 μg de proteínas. A amostra de fígado “A” (de *Stenella frontalis*) e de fígado “B1” (de *Sotalia guianensis*) contém 30 μg de proteínas. O fígado#3 (de *T. truncatus*) contém 45 μg de proteínas. As amostras do tecido muscular foram aplicadas nas linhas 6 e 7 com as concentrações de 45 e 60 μg de proteínas, respectivamente. As amostras de fígado contêm 45 μg (linha 8) e 50 μg (linha 9) de proteínas. O pulmão contém 20 μg de proteínas.

Na Figura 16 a banda imunoreativa do controle positivo CP-2 também se destaca, com 143.864 U.D.A. e peso molecular aparente de 52 kDa. Notam-se possíveis bandas nas amostras de rim de *T. truncatus* com 60 μg (linha 3) e 45 μg de proteínas (linha 4); sendo que a amostra com 60 μg de proteínas consiste em 12.690 U.D.A., enquanto que àquela com 45 μg conta com 6.611 U.D.A. Estas bandas têm um peso molecular aparente ligeiramente acima dos 52 kDa. Na linha 8, que corresponde à amostra de fígado#2 (de *T. truncatus*), nota-se uma banda com 8.080 U.D.A. e peso molecular aparente inferior a 52 kDa. E, por fim, na linha 10, onde está a amostra de gordura (de *T. truncatus*), há uma possível banda de peso molecular aparente um pouco superior àquela encontrado para as amostras de rim, com 5.791 U.D.A. Cabe salientar que aqui também não foi detectado CYP1A1 na amostra de fígado de *S. guianensis* (Fígado B2).

Figura 16 – Imunodeteção de amostras teciduais de *Tursiops truncatus* e de amostra de fígado de *Sotalia guianensis*.



A amostra de pele foi aplicada com 10 μg de proteínas, enquanto que a de cérebro foi aplicado com 20 μg , ambas amostras são de *T. truncatus*. A amostra de rim, de *T. truncatus*, na linha 3 contém 60 μg de proteínas, e, na linha 4 possui 45 μg de proteínas. O baço, de *T. truncatus*, foi aplicado com 30 μg de proteínas. O marcador de peso molecular (MPM) se encontra na linha 6 e o controle positivo CP-2 (com 30 μg de proteínas) está na linha 7. Em seguida, encontra-se o fígado#2 (de *T. truncatus*) com 45 μg de proteínas e o fígado "B2" (de *S. guianensis*) com 30 μg de proteínas. Por fim, na linha 10, está a amostra de gordura, de *T. truncatus*, com 10 μg de proteínas.

4. DISCUSSÃO

4.1 PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE WESTERN BLOTTING

A imunodeteção de CYP1A1 em amostras teciduais de cetáceos odontocetos permite a obtenção de informações sobre o nível de exposição aos contaminantes químicos ambientais e, possivelmente, a identificação de efeitos tóxicos à sua saúde e, por ventura, ao meio ambiente. A técnica de *Western blotting* possibilita imunodetectar CYP1A1 e traz informações sobre a abundância da proteína no tecido estudado. Por ser uma técnica repleta de etapas sua aplicação demanda uma série de ajustes finos até que as condições ótimas de cada etapa sejam definidas. Desta maneira, um dos objetivos deste trabalho foi a padronização da técnica de *Western blotting* para a imunodeteção da proteína CYP1A1 em diferentes tecidos de *Tursiops truncatus*, e em fígado de *Stenella frontalis* e *Sotalia guianensis*.

O primeiro experimento da presente pesquisa, o experimento “A”, possibilitou a identificação de reatividade cruzada entre o anticorpo policlonal anti-citocromo P4501A1 e a proteína CYP1A1 em diferentes tecidos de *T. truncatus*, mas detectadas com baixa intensidade. Dentre estas, apenas a amostra de pele#2 apresentou reação inespecífica com o anticorpo. Apesar de tênues, as bandas destas amostras apresentaram o mesmo peso molecular estimado, ligeiramente acima dos 52 kDa. Em outras pesquisas CYP1A1 em *T. truncatus* foi detectado com peso molecular estimado de 54 kDa (GARRICK et al., 2006), 57 kDa (FOSSI et al., 2008) e 59 kDa (BACHMAN et al., 2015), tais resultados são semelhantes ao encontrado na presente pesquisa. Adicionalmente, foi possível perceber que houve reconhecimento do anticorpo policlonal anti-citocromo P4501A1 (ab124295, ABCAM) com a proteína CYP1A1 em *T. truncatus*. Diferentes anticorpos primários foram aplicados em outros trabalhos, assim, por exemplo, o anticorpo primário policlonal de coelho anti-CYP1A1 (Millipore) foi utilizado por Bachman e colaboradores (2015) em tecidos de diferentes cetáceos dentre eles *T. truncatus* e *S. frontalis*; o anticorpo primário policlonal de coelho anti- CYP1A1 (Oxford Biochemical Research) foi aplicado por Fossi e colaboradores (2010, 2012, 2013, 2014) em amostras de cetáceos, dentre eles *T. truncatus*, e por Marsili e colaboradores (2014) em *Physeter macrocephalus*; e o anticorpo policlonal de rato anti-CYP1A1 (Gentest) foi aplicado por McKinney e colaboradores (2004) em *Delphinapterus leucas*.

As bandas dos controles positivos CP-1 ficaram ligeiramente abaixo das bandas teciduais de *T. truncatus*, porém continuaram com este padrão em todos os experimentos deste estudo. Tal diferença pode ser justamente devido ao fato de se tratar da mesma proteína,

contudo em espécies diferentes. Teramitsu e colaboradores (2000) verificaram que a identidade das sequências de aminoácidos de CYP1A entre peixes e mamíferos varia de 50% a 78,4%. Entretanto, a intensidade da banda dos dois controles positivos CP-1 não foi a mesma, que pode ter sido causada por erros experimentais e/ou devido à ausência de integridade da amostra, já que ela havia sido utilizada (congelada e descongelada) cinco vezes antes deste experimento.

No experimento “B” a banda imunorreativa da amostra do baço (com 60 µg de proteínas) de *T.truncatus* teve mais intensidade do que aquela do controle positivo CP-2. Proteínas desta amostra de baço também reagiram inespecificamente com o anticorpo primário. Nas demais amostras teciduais de *T.truncatus* não ocorreu a detecção de CYP1A1. Tendo em vista que o uso do anticorpo primário mais concentrado poderia aumentar a reatividade com outros tecidos de menor expressão de CYP1A1, no experimento seguinte, aqui denominado experimento “C”, o anticorpo foi utilizado duas vezes mais concentrado (passou de 1:1000 para 1:500). Com esta alteração, a proteína CYP1A1 de baço foi detectada utilizando-se a metade da concentração proteica, correspondente a 30 µg de proteínas. Adicionalmente, a intensidade do CP-2 aumentou, de 686 U.D.A para 9.509 U.D.A. e mais duas amostras apresentaram reatividade cruzada com o anticorpo, CP-1 e rim de *T. truncatus* (60 µg de proteínas). Reações inespecíficas foram notadas, mas fracamente.

Neste ponto, entretanto, as bandas ainda estavam muito fracas, principalmente aquelas dos controles positivos. Assim, ainda era necessário ajustar as condições de incubação das membranas com os anticorpos primário e secundário. Portanto, apesar da concentração do anticorpo primário permanecer a mesma, após o *stripping*, o tempo de incubação aumentou para 2 horas, e o anticorpo secundário foi utilizado duas vezes mais concentrado (passou de 1:100.000 para 1:50.000) e foi incubado durante 1 hora e 30 minutos. Nestas condições, os controles positivos foram detectados com alta intensidade.

Ao utilizar as condições de incubação dos anticorpos recém padronizadas num novo experimento, aqui chamado de experimento “E”, com a mesma concentração de proteínas para o controle positivo CP-2, de 30 µg, a intensidade aumentou de 103.900 para 139.873 U.D.A. Portanto, é possível que parte das amostras tenha sido removida da membrana juntamente com os anticorpos, durante o *stripping*, em função da alta temperatura (50°C), da agitação constante, que apesar de branda, pode ter dificultado a permanência das proteínas na membrana e do conjunto de condições fornecidas pela solução tampão.

A utilização das amostras com quantidades de proteínas que correspondiam à concentração máxima possível, tendo em vista a quantidade de proteínas totais por amostra e o

tamanho do poço para aplicação da amostra na eletroforese, juntamente com as condições de incubação dos anticorpos descobertas, permitiram realizar a última imunodeteção deste trabalho. No experimento “E”, portanto, foram detectadas intensas bandas imunoreativas com o anticorpo anti-citocromo P450 1A1 no controle positivo CP-2 e outras mais leves nas amostras de fígado e rim de *T. truncatus*, e em fígado de *Stenella frontalis*.

A partir dos resultados obtidos ao longo dos cinco experimentos de padronização de imunodeteção de CYP1A1 realizados com tecidos de cetáceos odontocetos, percebemos que há a possibilidade de alteração de algumas etapas da técnica para otimizar ainda mais a imunodeteção proteica. Dentre as sugestões, o tempo de incubação da membrana com o anticorpo primário pode ser alterado, deixando-a incubando *overnight*, por exemplo. Este procedimento já foi utilizado em outros estudos que utilizaram amostras de cetáceos e pode ser feito a temperatura ambiente (FOSSI et al., 2012, 2014; MARSILI et al., 2014), a 4°C (BACHMAN et al., 2014), ou ainda a 4°C com agitação branda (JIA et al., 2015). Outro procedimento simples e que pode auxiliar na melhora da detecção é a diminuição na quantidade de lavagens após as incubações com os anticorpos, no qual quatro lavagens parece ser o suficiente. Além disso, outras amostras de cetáceos devem ser aplicadas e testadas, afinal até chegar ao experimento “E” a maioria das amostras passaram por congelamentos e descongelamentos que podem ter afetado suas integridades. Adicionalmente a estas alterações nos procedimentos da técnica, seria positivo também coletar amostras de cetáceos odontocetos e transferi-las imediatamente em nitrogênio líquido para fazer além da detecção da proteína, por *Western blotting*, a análise da atividade EROD.

4.2 IMUNODETECÇÃO DE CYP1A1 NOS TECIDOS DE *TURSIOPS TRUNCATUS*

Os estudos citados nesta seção que utilizaram a técnica de *Western blotting* para imunodetectar CYP1A1 em amostras teciduais de cetáceos odontocetos podem ser vistos em detalhe no APÊNDICE A.

4.2.1 Imunodeteção de CYP1A1 no fígado

Tendo como base o experimento “E”, no qual as etapas da técnica de *Western blotting* foram otimizadas para a imunodeteção de CYP1A1 em odontocetos, é possível notar a detecção de CYP1A1 nas amostras de tecido hepático de *T. truncatus*. O fígado tem papel central no metabolismo de biotransformação de xenobióticos, no qual CYP1A1 tem relevante participação na fase I (NEBERT et al., 1991, 2004). Assim, sua detecção já era esperada. Outra característica singular deste órgão é que a expressão de CYP1A1, em mamíferos marinhos e

peixes, parece ocorrer principalmente nos hepatócitos e depois no endotélio, enquanto que nos tecidos extra-hepáticos, a expressão de CYP1A1 ocorre principalmente em células epiteliais e endoteliais (HYTYI et al., 2001; WILSON; MOORE; STEGEMAN, 2010; STEGEMAN; SMOLOWITZ; HAHN, 1991).

Maior expressão de CYP1A1 no fígado, em relação a outros tecidos, foi verificada em estudos realizados com focas *Pusa hispida* e *Halichoerus grypus* (HYTYI et al., 2001), com belugas *Delphinapterus leucas* (WILSON et al., 2000, 2005) e com o peixe *Scophthalmus maximus* (REINECKE; SEGNER, 1998). Por outro lado, no estudo realizado por Wilson, Moore e Stegeman (2010) a maior quantidade de CYP1A1 foi detectada nos pulmões do golfinho-de-laterais-brancas (*Lagenorhynchus acutus*), enquanto que a atividade EROD, referente à atividade catalítica de CYP1A1, foi maior no fígado. Assim, ressaltou-se que apesar de ter maior eficiência enzimática, o fígado não necessariamente precisa ter mais proteínas. Cabe ressaltar que no presente estudo não foi possível realizar o ensaio EROD devido ao armazenamento das amostras em RNAlater.

Ainda são poucas as pesquisas que identificam a expressão de CYP1A1 no fígado e nos tecidos extra-hepáticos de cetáceos odontocetos, de modo a destacar a necessidade de mais estudos com esta temática neste grupo de animais.

4.2.2 Imunodeteção de CYP1A1 na pele

Alguns estudos demonstraram a existência da isoforma CYP1A1 na pele de espécies de cetáceos (ASSUNÇÃO et al., 2007; GODARD et al., 2004; HOOKER et al., 2008; WAUGH et al., 2011), incluindo *T. truncatus* (ANGELL et al., 2004; FOSSI et al., 2008; WILSON et al., 2007). No presente trabalho, CYP1A1 foi detectado na amostra de pele#2 no experimento “A”, cuja amostra continha 15 µg e 30 µg de proteínas e foi coletada de *T. truncatus* por meio de biópsias e armazenada em nitrogênio líquido. Adicionalmente, a outra amostra “pele” foi detectada com 10 µg de proteínas, apenas no experimento “A”, a coletada foi realizada em um *T. truncatus* morto e a amostra foi armazenada em RNAlater. Entretanto, como comentado na seção 4.1 novos experimentos com algumas alterações no protocolo poderão melhor elucidar a abundância de CYP1A1 nas amostras de pele.

Atualmente, há uma crescente preocupação com relação às ameaças antropogênicas enfrentadas pelas espécies de cetáceos. Essa é adicionada às preocupações éticas e logísticas da pesquisa com esses animais. Assim, destaca-se a importância e a necessidade de desenvolver, validar e aplicar estratégias de amostragem não letais, minimamente invasivas em animais de

vida-livre (ASSUNÇÃO et al., 2007; MILLER et al., 2005). Dentro deste contexto, as biópsias de pele, como a da pele#2 do presente trabalho, são consideradas materiais biológicos adequados para a aplicação em estudos ecotoxicológicos em cetáceos de vida-livre (FOSSI et al., 2010). Seu uso, em cetáceos, como um método válido e não-letal de diagnóstico ecotoxicológico tem sido defendido desde a década de 90 (FOSSI et al., 1992, 2010, 2012a, 2014; FOSSI; MARSILI, 1997). O uso de biópsias de pele também tem a vantagem de permitir a análise sequencial da mesma população ao longo de determinado período de tempo e avaliar comunidades em risco (ASSUNÇÃO et al., 2007).

Portanto, a padronização da técnica de *Western blotting* para amostras de pele de cetáceos vem a ser de grande utilidade.

4.2.3 Imunodeteção de CYP1A1 na gordura

Os mamíferos bioacumulam contaminantes principalmente em suas grandes reservas de gordura. Situações de fome, migração, lactação e adaptação à temperatura em águas mais quentes ou qualquer combinação destas, causam a mobilização dos lipídios e permitem a redistribuição dos contaminantes da gordura para o sistema circulatório. Esta redistribuição dos contaminantes facilita a indução de CYP1A1 via ativação do receptor hidrocarboneto aril (AHR) nos locais alvos, como hepatócitos e células endoteliais (ANGELL et al., 2004; MONTIE et al., 2008).

No experimento “E” foi possível visualizar uma marcação que parece ser apenas um artefato da técnica na linha da amostra de gordura, devido a sua forma e por apresentar um peso molecular aparente um pouco superior àquele encontrado para as amostras de rim. Para superar esta dúvida, no entanto, novos experimentos precisam ser realizados. Cabe pontuar que o tecido adiposo não tem como função a detoxificação ou o processamento de fármacos, hormônios, dentre outras substâncias, mas sim principalmente atuar como reserva de energia, reduzir a perda de calor pela pele, e, suportar e proteger os órgãos (TORTORA; NIELSEN, 2013). Desse modo, não é esperado encontrar grandes quantidades de CYP1A1 neste tecido.

A pesquisa desenvolvida por Montie e colaboradores (2008) utilizou imunohistoquímica em 74 biópsias de pele e gordura em *T. truncatus*, as quais foram

divididas nas seguintes camadas: epiderme e gordura superficial, média e profunda. E se verificou que a expressão mais forte e frequente ocorreu nas células endoteliais de arteríolas e capilares da camada profunda da gordura, não sendo detectado CYP1A1 nos adipócitos. Assim, apesar de ser pouco provável que CYP1A1 esteja presente nos adipócitos, CYP1A1 tem potencial de estar nas células endoteliais dos vasos sanguíneos que irrigam a gordura e, então, ser detectado por *Western blotting*.

Para estudos futuros com este tecido, seria positivo delimitar previamente a região onde a gordura será coletada e segmentá-la em camadas conforme a sua profundidade e relação com a epiderme superficial, assim como aumentar a quantidade de indivíduos amostrados e dividi-los considerando características como o sexo, período reprodutivo, idade e localização geográfica. Afinal a gordura pode ser mais ou menos metabolicamente ativa conforme a localização no corpo do cetáceo, e também conforme as características singulares do organismo, assim como da situação em que ele está vivendo (ANGELL et al., 2004).

4.2.4 Imunodeteção de CYP1A1 no pulmão

No decorrer da presente pesquisa, CYP1A1 foi imunodetectada na amostra de pulmão no primeiro experimento, com uma concentração proteica correspondente a 20 µg. Entretanto, nos demais experimentos, inclusive no último, CYP1A1 não foi mais detectado nesta amostra. Tendo em vista que foram realizados ciclos de congelamento e descongelamento, não se pode deixar de colocar como possibilidade o risco de degradação proteica da amostra.

É predominantemente por meio da dieta que os contaminantes indutores de CYP1A1 são inseridos nos organismos, porém também é possível captá-los durante a inalação (CASEY et al., 1999). Esta maneira de captação de contaminantes ambientais parece ser mais efetiva quando em regiões com altos níveis de PAH e/ou PCB. Na pesquisa desenvolvida por Wilson e colaboradores (2005), foi detectada uma forte expressão de CYP1A1 no pulmão de beluga (*Delphinapterus leucas*), porém o resultado na imuno-histoquímica demonstrou que a expressão de CYP1A1 não ocorreu nos pneumócitos de tipo I, o principal tipo celular do pulmão envolvido nas trocas gasosas, de modo a concluir que a indução de CYP1A1 resultou majoritariamente da dieta. Um estudo realizado por Raunio e colaboradores (apud HYYTI et al., 2001) apontou que dentre os tecidos extra-hepáticos de mamíferos, as proteínas que compõe CYP parecem ser encontradas principalmente em órgãos através dos quais os

contaminantes entram no corpo, como: pulmão, pele e intestino (RAUNIO et al., 1995 apud HYYTI et al., 2001).

Outras pesquisas também imunodetectaram CYP1A1 por *Western blotting* no pulmão de botos-da-tainha, *T. truncatus* (GARRICK et al., 2006), do golfinho-de-laterais-brancas, *Lagenorhynchus acutus* (WILSON; MOORE; STEGEMAN, 2010); por *Western blotting* e imuno-histoquímica em focas, *Pusa hispida* e *Halichoerus grypus* (HYYTI et al., 2001); e, por imuno-histoquímica na beluga, *Delphinapterus leucas* (WILSON et al., 2000). Inclusive neste último trabalho o endotélio do pulmão teve uma expressão bastante alta em comparação com outros órgãos extra-hepáticos, e os espécimes haviam sido expostos a altos níveis de PCB's.

4.2.5 Imunodeteção de CYP1A1 no músculo estriado esquelético

Ao longo da presente pesquisa não foi detectado CYP1A1 nas amostras de tecido muscular esquelético de *T. truncatus*. Tendo em vista que este tecido tem como principais funções a produção de movimentos do corpo, produção de calor, e manutenção da postura e posição do corpo (TORTORA; NIELSEN, 2013), não era esperado encontrar grandes quantidades de CYP1A1 neste tecido. Entretanto, estudos têm demonstrado que as células endoteliais que revestem os vasos sanguíneos são um local de comum indução de CYP1A1 em peixes e mamíferos (ANGELL et al., 2004; GARRICK et al., 2006; HYYTI et al., 2001; STEGEMAN; SMOLOWITZ; HAHN, 1991; WILSON et al., 2000), de modo que se supõe que a indução de CYP1A1 pode ocorrer ao menos nas células endoteliais de todos os órgãos (STEGEMAN; SMOLOWITZ; HAHN, 1991). Contudo ainda é necessário determinar o grau em que os tecidos extra-hepáticos que contêm CYP1A1 contribuem para todo o metabolismo de biotransformação de xenobióticos (WILSON; MOORE; STEGEMAN, 2010).

4.2.6 Imunodeteção de CYP1A1 no baço

No decorrer do presente trabalho, CYP1A1 foi detectado na amostra de baço no primeiro experimento, e a partir de sua detecção nos experimentos seguintes foi possível realizar os ajustes necessários na técnica de *Western blotting*. A ausência de sua detecção no último experimento pode ter ocorrido devido a degradação das proteínas na amostra, já que ocorreram vários ciclos de congelamento e descongelamento, especialmente com esta amostra.

O baço é um órgão linfático importante para a proliferação dos linfócitos e onde ocorrem respostas imunológicas. Linfócitos são células do sistema imunológico responsáveis pela especificidade, diversidade, memória e discriminação do próprio e do não próprio. Também tem como função a purificação do sangue, já que os seus macrófagos removem por meio da fagocitose plaquetas velhas e defeituosas, além de substâncias estranhas transportadas no sangue. Adicionalmente é um local de estoque de plaquetas e de alguns produtos da degradação dos eritrócitos, como o ferro, que depois é reutilizado para compor a hemoglobina, e libera produtos no sangue para o processamento pelo fígado (COICO; SUNSHINE, 2010) (MARIEB; HOEHN, 2009). Por fim, o baço é um órgão rico em sangue suprido pela grande artéria e pela veia esplênica, de modo que os contaminantes transportados na corrente sanguínea têm grande potencial de induzir a expressão de CYP1A1, ao menos em suas células endoteliais.

No estudo desenvolvido por Wilson, Moore e Stegeman (2010) com *Lagenorhynchus acutus* (golfinho-de-laterais-brancas) a quantidade de CYP1A1 detectada por *Western blotting* foi maior nos pulmões, em seguida no baço e depois no fígado. Stegeman, Smolowitz e Hahn (1991) detectaram por imuno-histoquímica CYP1A1 em baço do peixe *Stenotomus chrysops*, mais especificamente no endotélio de artérias e veias, enquanto que em outros tipos celulares do baço, a proteína não foi imunodetectada. O mesmo resultado se repetiu na pesquisa de Hyyti e colaboradores (2001) com as focas *Phoca hispida báltica* e *Halichoerus grypus*. Em todos estes estudos os espécimes são provenientes de locais contaminados, especificamente, por PCBs e DDT (HYTYI et al., 2001), por PAHs, PCBs e dibenzofuronos policlorados (PCDFs - STEGEMAN; SMOLOWITZ; HAHN, 1991), e, por PCBs (WILSON; MOORE; STEGEMAN, 2010).

4.2.7 Imunodeteção de CYP1A1 no cérebro

O cérebro, assim como os demais constituinte do encéfalo, atua na interpretação de informações internas e externas ao corpo e ordena respostas motoras e/ou secreções glandulares, tendo como base experiências passadas, reflexos e condições do momento. É um importante constituinte do sistema nervoso central. O tecido nervoso contém alta densidade celular, o que significa que as células estão agrupadas e fortemente entrelaçadas restando pouco espaço extracelular. As células que o constituem podem ser divididas em dois tipos principais: (1) neurônios, células nervosas excitáveis que transmitem sinais elétricos; e, (2) células de sustentação, pequenas células que envolvem os neurônios mais delicados (MARIEB; HOEHN, 2009).

No presente trabalho não foi detectado CYP1A1 na amostra de cérebro de *T. truncatus*. Tendo em vista as suas principais funções, não era esperado encontrar grandes quantidades de CYP1A1 neste tecido. Entretanto, algumas pesquisas já demonstraram a presença de CYP1A1 no cérebro de algumas espécies de peixes e mamíferos. Por meio de imunohistoquímica foi possível detectar alto conteúdo de CYP1A1 no cérebro do peixe *Stenotomus chrysops*, porém em pequenas porções de células, principalmente no endotélio vascular de todo o cérebro, enquanto nos neurônios não houve detecção de CYP1A1 (SMOLOWITZ; HAHN; STEGEMAN, 1991; STEGEMAN; SMOLOWITZ; HAHN, 1991). Contudo, Sarasquete e colaboradores (1999) detectaram por imuno-histoquímica CYP1A1 no epitélio e em neurônios próximos a região do bulbo olfatório no peixe *Sparus aurata*. A detecção de CYP1A1, principalmente na região do bulbo olfatório, também ocorreu com mais duas espécies de peixes, *Sparus aurata* (DELGADO et al., 2002) e *Oncorhynchus mykiss* (ANDERSSON; GOKSOYR, 1994). A pesquisa desenvolvida por Wilson, Moore e Stegeman (2010) detectou por *Western blotting* CYP1A1 no cérebro no golfinho-de-laterais-brancas (*Lagenorhynchus acutus*). E, por fim, Wilson e colaboradores (2000) também detectaram por imuno-histoquímica CYP1A1 nas células endoteliais do cérebro de beluga (*Delphinapterus leucas*).

4.2.8 Imunodeteção de CYP1A1 no rim

Os rins participam do sistema urinário e são importantes na remoção de resíduos do sangue. Participam no equilíbrio hidroeletrolítico do organismo, ou seja, da regulação da água e de íons, como sódio e potássio. E também atuam como uma estrutura endócrina, produzindo o hormônio eritropoietina que age como agente estimulador à produção de hemácias (GABRIELLE; VARGAS, 2010).

No presente estudo, CYP1A1 foi imunodetectado na amostra de rim durante os experimentos “A” e “E”. Apesar das bandas terem ficado fracas, elas obtiveram o mesmo peso molecular aparente, o qual também foi detectado para as outras amostras teciduais de *T. truncatus*. Além disso, o envolvimento do rim na remoção de resíduos do sangue, e o conseqüente grande suprimento sanguíneo que o caracteriza, permite que suas células epiteliais entrem facilmente em contato com os contaminantes, permitindo a indução de CYP1A1 na presença do receptor hidrocarboneto aril (AHR).

A expressão de CYP1A1 também foi detectada no rim (restritamente em suas células epiteliais e endoteliais) de alguns mamíferos marinhos como beluga, *Delphinapterus*

leucas, (WILSON et al., 2000, 2005), focas, *Phoca hispida báltica* e *Halichoerus grypus*, (HYTYI et al., 2000), e botos-da-tainha, *T. truncatus* (GARRICK et al., 2006). A pesquisa desenvolvida por Wilson; Moore e Stegeman (2010) detectou CYP1A1 no rim de *Lagenorhynchus acutus* (golfinho-de-laterais-brancas). E, por fim, CYP1A1 foi detectado nas células epiteliais dos túbulos renais dos seguintes peixes: *Stenotomus chrysops* (STEGEMAN; SMOLOWITZ, HAHN, 1991) e *Scophthalmus maximus* (REINECKE; SEGNER, 1998).

4.3 COMPARAÇÕES DA IMUNODETECÇÃO DE CYP1A1 ENTRE AS ESPÉCIES DE CETÁCEOS ODONTOCETOS: *TURSIOPS TRUNCATUS*, *STENELLA FRONTALIS* E *SOTALIA GUIANENSIS*

Ao conhecimento da autora apenas uma pesquisa (BACHMAN et al., 2015) detectou CYP1A1 em fígado de *S. frontalis* anteriormente à imunodeteção aqui apresentada, e até o momento, nenhuma imunodeteção de CYP1A1 foi feita em fígado de *S. guianensis*. Já a imunodeteção de CYP1A1 por *Western blotting* em *T. truncatus* ocorreu em algumas pesquisas (BACHMAN et al., 2015; FOSSI et al., 2006, 2008, 2014; GARRICK et al., 2006). O maior número de pesquisas com *T. truncatus* se relaciona com sua larga distribuição, abundância e seu estado de conservação não preocupante, características que facilitam a sua observação e estudo. Ao passo que *S. frontalis* se caracteriza por ser endêmica do oceano Atlântico e *S. guianensis* parece se limitar à parte da costa leste da América Latina, e ambas não têm seu estado de conservação definido devido a ausência de algumas informações relevantes sobre as mesmas.

Na pesquisa de Bachman e colaboradores (2015), a banda imunorreativa da amostra de fígado de *S. frontalis* apresentou um peso molecular estimado ligeiramente acima dos 59 kDa, similar ao que foi verificado na presente pesquisa, cujo peso molecular aparente se localiza inferiormente aos 76 kDa, ou em outras palavras, um pouco acima das amostras de fígado de *T. truncatus* que se apresentam ligeiramente acima dos 52kDa.

A imunodeteção de CYP1A1 em fígado de *S. frontalis* aqui apresentada indica, primeiramente, que as condições da técnica de *Western blotting* ajustadas para a detecção de CYP1A1 nesta espécie utilizando o anticorpo policlonal anti-citocromo P4501A1 (ab124295, ABCAM) e o kit ECL Select (Amersham Pharmacia) funcionaram. Em seguida, que a concentração mínima de proteína necessária possivelmente é de 30 µg. Além disso, ao indicar

que houve indução da expressão de CYP1A1 no fígado também informa que possivelmente o espécime foi exposto a contaminantes químicos, tais como hidrocarbonetos aromáticos planares (como certos bifenilos policlorados - PCBs), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs) e dioxinas. Entretanto, para afirmar seriam necessárias correlações com dados químicos, biológicos e bioquímicos adicionais.

Com relação à falta de imunodeteção de CYP1A1 nas amostras de fígado de *S. guianensis*, pode-se considerar que as condições experimentais ainda não estão ótimas para esta espécie ou que os indivíduos, cujas amostras de fígado foram coletadas, não foram expostos a químicos indutores de CYP1A1, ou ainda, que a sequência do epítipo do antígeno não seja reconhecida pelo anticorpo. Entretanto, para que se possam fazer afirmações é necessário correlacionar este resultado, ao menos, com dados químicos. Adicionalmente seria positivo adicionar amostras de outros espécimes, possivelmente um que tenha sido exposto previamente aos químicos indutores de CYP1A1.

Dentro deste contexto, destaca-se a importância do presente trabalho como um dos pioneiros envolvendo espécies endêmicas da região do Oceano Atlântico. Tendo em vista que se tratam de espécies costeiras, suas aplicações em estudos ecotoxicológicos parecem viáveis e possibilitam fornecer informações sobre o metabolismo e biologia das espécies. Cabe destacar que para conservar é preciso antes de tudo conhecer.

5. CONCLUSÃO

As etapas de padronização da técnica de *Western blotting*, descritas ao longo dos experimentos A B, C e D, permitiram concluir, primeiramente, que houve reconhecimento do anticorpo policlonal anti-citocromo P4501A1 (ab124295, ABCAM) com a proteína CYP1A1 em *T. truncatus*. As condições ótimas de incubação do anticorpo policlonal anti-citocromo P4501A1 (ab124295, ABCAM), caracterizaram-se pela duração de 2 horas, a temperatura ambiente, sob agitação branda e constante, na diluição de 1:500 de solução de bloqueio. Enquanto que as condições ótimas de incubação do anticorpo secundário anti-coelho (Amersham Pharmacia), caracterizaram-se pela duração de 1 hora e 30 minutos, a temperatura ambiente, sob agitação branda e constante, na diluição de 1:50.000 de solução de bloqueio. Adicionalmente, as etapas iniciais indicaram que para a imunodeteção de CYP1A1 nos tecidos de *T. truncatus* seria necessária a aplicação das amostras com a concentração máxima de proteínas possível para cada tecido, conforme a quantidade de proteínas totais e o tamanho do poço do gel de poliacrilamida.

A expressão de CYP1A1 no fígado, pele, pulmão, baço e rim de *T. truncatus*, assim como no fígado de *S. frontalis* informa que possivelmente estes espécimes foram expostos a contaminantes químicos, tais como hidrocarbonetos aromáticos planares (como certos bifenilos policlorados - PCBs), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs) e dioxinas. A imunodeteção de CYP1A1 na pele ocorreu, tanto no espécime em que foi realizada a biópsia, cuja amostra recebeu o nome de pele#2, quanto no espécime de *T. truncatus* em que foi realizada a coleta dos oito diferentes tecidos aqui estudados. Por outro lado, a indução da expressão de CYP1A1 não foi verificada no cérebro, gordura e músculo estriado esquelético em *T. truncatus* e no fígado de *S. guianensis*.

Ainda há a possibilidade de alterar algumas etapas da técnica e otimizar ainda mais a imunodeteção proteica por *Western blotting* em amostras teciduais de cetáceos odontocetos. Entretanto, os avanços metodológicos apresentados neste trabalho podem servir como base para o desenvolvimento de estudos sobre os mecanismos e efeitos tóxicos de químicos xenobióticos neste importante táxon, envolvendo o biomarcador CYP1A1. O presente estudo também se destaca como um dos pioneiros em aplicar espécies endêmicas da região do Oceano Atlântico em estudos com biomarcadores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUILAR, A.; BORRELL, A. Abnormally high polychlorinated biphenyl levels in striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) affected by the 1990-1992 Mediterranean epizootic. **Science of the Total Environment**, v. 154, n. 2–3, p. 237–247, 1994.
- ALMAZROO, O. A.; MIAH, M. K.; VENKATARAMANAN, R. Drug Metabolism in the Liver. **Clinics in Liver Disease**, v. 21, n. 1, p. 1–20, 2017.
- ANDERSSON, T.; GOKSØYR, A. Distribution and induction of cytochrome P450 1A1 in the rainbow trout brain. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 13, n. 4, p. 335–342, 1994.
- ANGELL, C. M. et al. Cytochrome P450 1A1 expression in cetacean integument: Implications for detecting contaminant exposure and effects. **Marine Mammal Science**, v. 20, n. 3, p. 554–566, 2004.
- ASSUNÇÃO, M. G. L. et al. Cytochrome P450 1A expression and organochlorine contaminants in harbour seals (*Phoca vitulina*): Evaluating a biopsy approach. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 145, n. 2, p. 256–264, 2007.
- AZEVEDO, A. F. et al. Habitat use by marine tucuxis (*Sotalia guianensis*) (Cetacea: Delphinidae) in Guanabara Bay, south-eastern Brazil. **Journal of the Marine Biological Association of the UK**, v. 87, n. 1, p. 201, 2007.
- BACHMAN, M. J. et al. Persistent organic pollutant concentrations in blubber of 16 species of cetaceans stranded in the Pacific Islands from 1997 through 2011. **Science of the Total Environment**, v. 488–489, n. 1, p. 115–123, 2014.
- BASTOS, N. F. P.; MASSON, G. (Ed.). ELETROFORESE, ZIMOGRÁFIA & WESTERN BLOTTING. In: MORAES, Caroline da Silva et al (Ed.). **SÉRIE EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR: MÉTODOS EXPERIMENTAIS NO ESTUDO DE PROTEÍNAS**. Rio de Janeiro: IOC - Instituto Oswaldo Cruz, 2013. Cap. 4. p. 60-71. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/ioc/media/apostila_volume_1.pdf>. Acesso em: 13 set. 2017.
- BENEDETTI, M. S. et al. Drug metabolism and pharmacokinetics. **Drug Metabolism Reviews**, v. 41, n. 3, p. 344–390, 2009.
- BEYER, J. et al. Environmental risk assessment of combined effects in aquatic ecotoxicology: A discussion paper. **Marine Environmental Research**, v. 96, p. 81–91, 2014.
- BIRKUN, A. et al. Epizootic of morbilliviral disease in common dolphins (*Deiphinus deiphis ponticus*) from the Black Sea. **Veterinary Record**, v. 144, p. 85–92, 1999.
- BOON, J. P.; LEWIS, W. E.; GOKSOYR, A. Immunochemical and catalytic characterization of hepatic microsomal cytochrome P450 in the sperm whale (*Physeter macrocephalus*). **Aquatic Toxicology**, v. 52, n. 3–4, p. 297–309, 2001.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.

BROUWER, A. et al. Interactions of Persistent Environmental Organohalogenes With the Thyroid Hormone System: Mechanisms and Possible Consequences for Animal and Human Health. **Toxicology and Industrial Health**, v. 14, n. 1–2, p. 59–84, 1998.

BUCHELI, T. D.; FENT, K. Induction of Cytochrome P450 as a Biomarker for Environmental Contamination in Aquatic Ecosystems. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 25, n. 3, p. 201–268, 1995.

CARUSO, M.S.F; ALABURDA, J. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos - benzo(a)pireno: uma revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 67, n. 1, p.1-27, 2008.

CHAPMAN, P. M. Determining when contamination is pollution - Weight of evidence determinations for sediments and effluents. **Environment International**, v. 33, n. 4, p. 492–501, 2007.

COICO, R.; SUNSHINE, G. **Imunologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan Ltda., 2010. 380 p.

CUNHA, H. A. et al. Riverine and marine ecotypes of *Sotalia* dolphins are different species. **Marine Biology**, v. 148, n. 2, p. 449–457, 2005.

DAURA-JORGE, F. G. et al. Seasonal and daily patterns of group size, cohesion and activity of the estuarine dolphin, *Sotalia guianensis* (P.J. van Bénédén) (Cetacea, Delphinidae), in southern Brazil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 22, n. 4, p. 1014–1021, 2005.

DE GUISE, S. et al. Possible mechanisms of action of environmental contaminants on St. Lawrence beluga whales (*Delphinapterus leucas*). **Environmental health perspectives**, v. 103, n. 11, p. 73–77, 1995.

DEPLEDGE, M. H.; FOSSI, M. C. The role of biomarkers in environmental assessment (2). Invertebrates. **Ecotoxicology (London, England)**, v. 3, n. 3, p. 161–172, 1994.

FAROMBI, E. O.; ADELOWO, O. A.; AJIMOKO, Y. R. Biomarkers of oxidative stress and heavy metal levels as indicators of environmental pollution in African cat fish (*Clarias gariepinus*) from Nigeria Ogun River. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 4, n. 2, p. 158–165, 2007.

FELIX, F. F.; NAVICKIENE, S.; DÓREA, H. S. Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs) como Indicadores da Qualidade dos Solos. **Revista da Fapese**, v. 3, n. 2, p. 39–62, 2007.

FLORES, P. A. C.; BAZZALO, M. Home ranges and movement patterns of the marine tucuxi dolphin, *Sotalia fluviatilis*, in Baía Norte, southern Brazil. **Latin American Journal of Aquatic Mammals**, v. 3, n. 1, p. 37–52, 2004.

FOSSI, M. C. et al. The use of non-destructive biomarker in Mediterranean cetaceans: preliminary data on MFO activity in skin biopsies. **Marine Pollution Bulletin**, v. 24, n. 9, p. 459–461, 1992.

FOSSI, M. C. et al. Development of new-tools to investigate toxicological hazard due to endocrine disruptor organochlorines and emerging contaminants in Mediterranean cetaceans. **Marine Environmental Research**, v. 62, n. 1, p. 200–204, 2006.

FOSSI, M. C. et al. First detection of CYP1A1 and CYP2B induction in Mediterranean cetacean skin biopsies and cultured fibroblasts by Western blot analysis. **Marine Environmental Research**, v. 66, n. 1, p. 3–6, 2008.

FOSSI, M. C. et al. A multi-trial diagnostic tool in fin whale (*Balaenoptera physalus*) skin biopsies of the Pelagos Sanctuary (Mediterranean Sea) and the Gulf of California (Mexico). **Marine Environmental Research**, v. 69, n. SUPPL. 1, p. 2008–2011, 2010.

FOSSI, M. C. et al. An “ex vivo” model to evaluate toxicological responses to mixtures of contaminants in cetaceans: Integumentum Biopsy Slices. **Environmental toxicology**. 2012 a.

FOSSI, M. C. et al. The role of large marine vertebrates in the assessment of the quality of pelagic marine ecosystems. **Marine Environmental Research**, v. 77, p. 156–158, 2012 b.

FOSSI, M. C. et al. The Pelagos Sanctuary for Mediterranean marine mammals: Marine Protected Area (MPA) or marine polluted area? The case study of the striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*). **Marine Pollution Bulletin**, v. 70, n. 1–2, p. 64–72, 2013.

FOSSI, M. C. et al. Could feeding habit and migratory behaviour be the causes of different toxicological hazard to cetaceans of Gulf of California (Mexico)? **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, n. 23, p. 13353–13366, 2014.

FOSSI, M. C.; MARSILI, L. The use of non-destructive biomarkers in the study of marine mammals. **Biomarkers**, v. 2, n. 4, p. 205–216, 1997.

FOSSI, M. C.; MARSILI, L. Effects of endocrine disruptors in aquatic mammals. **Pure and Applied Chemistry**, v. 75, n. 11–12, p. 2235–2247, 2003.

GABRIELLI, C.; VARGAS, J. C. **Anatomia sistêmica**: Uma abordagem direta para o estudante. 2. ed. Florianópolis: UFSC, 2010. 184 p.

GARRICK, R. A. et al. Cytochrome P4501A is induced in endothelial cell lines from the kidney and lung of the bottlenose dolphin, *Tursiops truncatus*. **Aquatic Toxicology**, v. 76, n. 3–4, p. 295–305, 2006.

GODARD, C. A. J. et al. Induction of cetacean cytochrome P4501A1 by β -naphthoflavone exposure of skin biopsy slices. **Toxicological Sciences**, v. 80, n. 2, p. 268–275, 2004.

GOKSØYR, A. Cytochrome P450 in marine mammals: Isozyme forms, catalytic functions, and physiological regulations. **Developments in Marine Biology**, v. 4, n. C, p. 629–639, 1995.

GUITART, R. et al. Organochlorine residues in tissues of striped dolphins affected by the 1990 Mediterranean epizootic: Relationships with the fatty acid composition. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 30, n. 1, p. 79–83, 1996.

HALL, A. J. et al. Individual-based model framework to assess population consequences of polychlorinated biphenyl exposure in bottlenose dolphins. **Environmental Health Perspectives**, v. 114, n. SUPPL.1, p. 60–64, 2006.

HAMMOND, P. P. *Stenella frontalis*. 2012. The IUCN Red List of Threatened Species. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2012.RLTS.T20732A17832795.en>>. Acesso em: 31 out. 2017.

HAMMOND, J. A.; HALL, A. J.; DYRYNDA, E. A. Comparison of polychlorinated biphenyl (PCB) induced effects on innate immune functions in harbour and grey seals. **Aquatic Toxicology**, v. 74, n. 2, p. 126–138, 2005.

HOOK, S. E.; GALLAGHER, E. P.; BATLEY, G. E. The role of biomarkers in the assessment of aquatic ecosystem health. **Integrated Environmental Assessment and Management**, v. 10, n. 3, p. 327–341, 2014.

HOOKER, S. K. et al. Changes in persistent contaminant concentration and CYP1A1 protein expression in biopsy samples from northern bottlenose whales, *Hyperoodon ampullatus*, following the onset of nearby oil and gas development. **Environmental Pollution**, v. 152, n. 1, p. 205–216, 2008.

HOUDE, M. et al. Organohalogen contaminants in delphinoid cetaceans. **Reviews of environmental contamination and toxicology**, v. 184, p. 1–57, 2005.

HYTYI, O. M. et al. Distribution of cytochrome P4501A (CYP1A) in the tissues of Baltic ringed and grey seals. **Marine Environmental Research**, v. 51, n. 5, p. 465–485, 2001.

INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE (ICMBio). **Sumário Executivo do Plano de Ação Nacional para a Conservação dos Pequenos Cetáceos**. s.d. Disponível em: <<http://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/docs-plano-de-acao/pequenoscetaceos.pdf>>. Acesso em: 15 out. 2017.

INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY (IPCS). **Environmental health criteria 202: Selected Non-Heterocyclic Policyclic Aromatic Hydrocarbons**. 1998. World Health Organization Geneva, 1998. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc202.htm#PartNumber:1>>. Acesso em: 27 set. 2017.

JEPSON, P. D. et al. Investigating potential associations between chronic exposure to polychlorinated biphenyls and infectious disease mortality in harbour porpoises from England and Wales. **Science of the Total Environment**, v. 243–244, p. 339–348, 1999.

JIA, K. et al. In vitro assessment of environmental stress of persistent organic pollutants on the

Indo-Pacific humpback dolphin. **Toxicology in Vitro**, v. 30, n. 1, p. 529–535, 2015.

KELLY, K. A. et al. Oxidative stress in toxicology: Established mammalian and emerging piscine model systems. **Environmental Health Perspectives**, v.106, n. 7, p.375–384, 1998.

KLOEPPER-SAMS, P. J. et al. Specificity and cross-reactivity of monoclonal and polyclonal antibodies against cytochrome P-450E of the marine fish scup. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 253, n. 1, p. 268–278, 1987.

KURIEN, B.; SCOFIELD, R. Western Blotting. **Methods**, v. 38, n. 4, p. 283-293, 2006.

LAHVIS, G. P. et al. Decreased lymphocyte responses in free-ranging bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) are associated with increased concentrations of PCBs and DDT in peripheral blood. **Environmental Health Perspectives**, v. 103, n. SUPPL. 4, p. 67–72, 1995.

MARIEB, E. N.; HOEHN, K. **Anatomia e fisiologia**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed Editora S.a., 2009. p.1007.

MARSILI, L. et al. Ecotoxicological status of seven sperm whales (*Physeter macrocephalus*) stranded along the Adriatic coast of Southern Italy. **Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems**, v. 24, n. SUPPL.1, p. 103–118, 2014.

MARTINEAU, D. et al. Pathology and toxicology of beluga whales from the St. Lawrence Estuary, Quebec, Canada. **The Science of the Total Environment**. v. 154, n. 94, 1994.

MARTINEAU, D. et al. Cancer in wildlife, a case study: Beluga from the St. Lawrence estuary, Quebec, Canada. **Environmental Health Perspectives**, v. 110, n. 3, p. 285–292, 2002.

MCCARTHY, J. F.; SHUGART, L. R. Biological markers of environmental contamination. **Biomarkers of environmental contamination**, v. 12, n. 3, p. 3–14, 1990.

MCKINNEY, M. A. et al. Characterization and profiling of hepatic cytochromes P450 and phase II xenobiotic-metabolizing enzymes in beluga whales (*Delphinapterus leucas*) from the St. Lawrence River Estuary and the Canadian Arctic. **Aquatic Toxicology**, v. 69, n. 1, p. 35–49, 2004.

MCKINNEY, M. A. et al. Biotransformation of polybrominated diphenyl ethers and polychlorinated biphenyls in beluga whale (*Delphinapterus leucas*) and rat mammalian model using an in vitro hepatic microsomal assay. **Aquatic Toxicology**, v. 77, n. 1, p. 87–97, 2006.

MIGUEL, M. P.; MENEZES, L. B. DE; ARAÚJO, E. G. DE. Western Blotting: a Técnica e Aplicações na Pesquisa e Rotina Diagnóstica em Medicina Veterinária. **Enciclopédia Biosfera**, v. 8, n. 15, p. 1704–1719, 2012.

MILLER, K. A. et al. Assessment of cytochrome P450 1A in harbour seals (*Phoca vitulina*) using a minimally-invasive biopsy approach. **Marine Environmental Research**, v. 60, n. 2, p. 153–169, 2005.

MONTONE, Rosalinda Carmela. **Poluentes Orgânicos Persistentes**. s.d. Instituto Oceanográfico. Universidade São Paulo. Disponível em: <<http://www.io.usp.br/index.php/oceanos/textos/antartida/31-portugues/publicacoes/series-divulgacao/poluicao/812-poluentes-organicos-persistentes>>. Acesso em: 27 set. 2017.

MONTIE, E. W. et al. Cytochrome P4501A1 expression, polychlorinated biphenyls and hydroxylated metabolites, and adipocyte size of bottlenose dolphins from the Southeast United States. **Aquatic Toxicology**, v. 86, n. 3, p. 397–412, 2008.

MORENO, I. B. et al. Distribution and habitat characteristics of dolphins of the genus *Stenella* (Cetacea: Delphinidae) in the southwest Atlantic Ocean. **Marine Ecology Progress Series**, v. 300, p. 229–240, 2005.

MORI, C. et al. Effects of organochlorines, individually and in mixtures, on B-cell proliferation in marine mammals and mice. **Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues**, v. 71, n. 4, p. 266–275, 2008.

MOS, L. et al. Chemical and biological pollution contribute to the immunological profiles of free-ranging harbor seals. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 25, n. 12, p. 3110–3117, 2006.

MOURA, J. F. de. “**O boto-cinza (*Sotalia guianensis*) como sentinela da saúde dos ambientes costeiros: estudo das concentrações de mercúrio no estuário Amazônico e costa norte do Rio de Janeiro**”. 2009. 141 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Saúde Pública e Meio Ambiente, Gestão de Problemas Ambientais e Promoção de Saúde, Fundação Oswaldo Cruz (Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca), Rio de Janeiro, 2009. Disponível em: <<https://bvssp.icict.fiocruz.br/pdf/Mourajfm.pdf>>. Acesso em: 30 out. 2017.

MUIR, D. et al. Spatial and temporal trends and effects of contaminants in the Canadian Arctic marine ecosystem: a review. **Science of the Total Environment**, The, v. 230, n. 1–3, p. 83–144, 1999.

NEBERT, D. W. et al. The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, and recommended nomenclature. **DNA and Cell Biology**, v. 10, n. 1, p. 1–14, 1991.

NEBERT, D. W. et al. Role of aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of the CYP1 enzymes in environmental toxicity and cancer. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 23, p. 23847–23850, 2004.

NELSON, D. R. et al. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. **Pharmacogenetics**, p. 1–42, 1996.

NOAA - NATIONAL OCEANIC AND ATMOSPHERIC ADMINISTRATION (Estados Unidos da América). **Atlantic Spotted Dolphin (*Stenella frontalis*)**. 2015. Fisheries. Disponível em: <<http://www.nmfs.noaa.gov/pr/species/mammals/dolphins/atlantic-spotted-dolphin.html>>. Acesso em: 30 out. 2017.

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

ORTIZ-DELGADO, J. . et al. Expression, cellular distribution and induction of cytochrome (CYP1A) in gilthead seabream, *Sparus aurata*, brain. **Aquatic Toxicology**, v. 60, n. 3–4, p. 269–283, 2002.

PANDEY, S. et al. Biomarkers of oxidative stress: A comparative study of river Yamuna fish Wallago attu (Bl. & Schn.). **Science of the Total Environment**, v. 309, n. 1–3, p. 105–115, 2003.

PEAKALL, D. W. Biomarkers: the way forward in environmental assessment. **Toxicology and Ecotoxicology News**, v. 1, p. 55-60. 1994.

REINECKE, M.; SEGNER, H. Immunohistochemical localization of cytochrome P4501A in developing turbot, *Scophthalmus maximus*. **Marine Environmental Research**, v. 46, n. 1–5, p. 487–491, 1998.

RIGHETTI, B. P. H. **Respostas bioquímicas e moleculares e sua relação com contaminantes orgânicos em botos- da- tainha (*Tursiops Truncatus*) residentes no sul do Brasil**. 128f. Tese (Mestrado) - Curso de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.

ROSS, P. S. et al. Contaminant-related suppression of delayed-type hypersensitivity and antibody responses in harbor seals fed herring from the Baltic Sea. **Environmental Health Perspectives**, v. 103, n. 2, p. 162–167, 1995.

ROSS, P. et al. Contaminant-induced immunotoxicity in harbour seals wildlife at risk?: **Toxicology**, v. 112, n. 2, p. 157–169, 1996.

ROSS, P. S. Marine Mammals as Sentinels in Ecological Risk Assessment. **Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal**, v. 6, n. 1, p. 29–46, 2000.

SARASQUETE, C. et al. Immunocytochemical distribution of cytochrome P4501A (CYP1A) in developing gilthead seabream, *Sparus aurata*. **Histology and Histopathology**, v.14, p. 407–415, 1999.

SCHWACKE, L. H. et al. Probabilistic risk assessment of reproductive effects of polychlorinated biphenyls on bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) from the Southeast United States Coast. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 21, n. 12, p. 2752–2764, 2002.

SECCHI, E. **Guiana dolphin**. 2012. The IUCN Red List of Threatened Species. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2012.RLTS.T181359A17583662.en>>. Acesso em: 31 out. 2017.

SIMÕES-LOPES, P. C.; FABIÁN, M. E.; MENEGHETI, J. O. Dolphin interactions with the mullet artisanal fishing on Southern Brazil: a qualitative and quantitative approach. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 15, n. 3, p. 709–726, 1998.

SMOLOWITZ R.M.; HAHN, M.E; STEGEMAN, J.J. Immunohistochemical localization of cytochrome P-450IA1 induced by 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl and by 2,3,7,8-

tetrachlorodibenzoafuran in liver and extrahepatic tissues of the teleost *Stenotomus chrysops* (scup). **Drug Metabolism and Disposition**, v.19, n.1,p.113-123, 1991.

STEGEMAN, J. J.; LECH, J. J. Cytochrome P-450 monooxygenase systems in aquatic species: Carcinogen metabolism and biomarkers for carcinogen and pollutant exposure. **Environmental Health Perspectives**, v. 90, p. 101–109, 1991.

STEGEMAN, J.J; SMOLOWITZ, R.M. ; HAHN, M.E. Immunohistochemical localization of environmentally induced cytochrome P450IA1 in multiple organs of the marine teleost *Stenotomus chrysops* (Scup). **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.110, n.3, p.486-504, 1991.

TANABE, S. et al. Capacity and Mode of PCB Metabolism in Small Cetaceans. **Marine Mammal Science**, v. 4, n. 2, p. 103–124, 1988.

TARPLEY, R. J. et al. Male pseudohermaphroditism in the bowhead whale, *Balaena mysticetus*. **Journal of Mammalogy**, v. 76, n. 4, p. 1267–1275, 1995.

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

THE SOCIETY FOR MARINE MAMMALOGY. *Stenella frontalis* (Atlantic spotted dolphin). (s.d.). Disponível em: <https://www.marinemammalscience.org/facts/stenella-frontalis/#cite_note-herzing-3>. Acesso em: 30 out. 2017.

THERMO FISHER SCIENTIFIC. **RNAlater Solutions for RNA Stabilization and Storage**. s.d. Disponível em: <<https://www.thermofisher.com/br/en/home/brands/product-brand/rnalater.html>>. Acesso em: 20 out. 2017.

TORTORA, G.J.; NIELSEN, M.T. **Princípios de Anatomia Humana**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan Ltda., 2013. 1069 p. Tradução de: Alexandre Werneck e Cláudia Lúcia Caetano de Araújo.

UNIÃO INTERNACIONAL PARA CONSERVAÇÃO DA NATUREZA (IUCN). 2017a. *Tursiops truncatus*. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org/details/22563/0>>. Acesso em: 04 set.2017.

UNIÃO INTERNACIONAL PARA CONSERVAÇÃO DA NATUREZA (IUCN). 2017b. *Stenella frontalis*. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org/details/20732/0>>. Acesso em: 04 set.2017.

UNIÃO INTERNACIONAL PARA CONSERVAÇÃO DA NATUREZA (IUCN). 2017c. *Sotalia guianensis*. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org/details/181359/0>>. Acesso em: 04 set.2017.

UNO, S. et al. Oral benzo[a]pyrene in Cyp1 knockout mouse lines: CYP1A1 important in detoxication, CYP1B1 metabolism required for immune damage independent of total-body burden and clearance rate. **Molecular pharmacology**, v. 69, n. 4, p. 1103–14, 2006.

UNO, T.; ISHIZUKA, M.; ITAKURA, T. Cytochrome P450 (CYP) in fish. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 34, n. 1, p. 1–13, 2012.

VASCONCELOS, Y. Anticorpos de valor. **Pesquisa FAPESP**, n. 170, p. 68–73, 2010.

VELDHOEN, N.; IKONOMOU, M. G.; HELBING, C. C. Molecular profiling of marine fauna: Integration of omics with environmental assessment of the world's oceans. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 76, n. 1, p. 23–38, 2012.

YORDY, J. E. et al. Life history as a source of variation for persistent organic pollutant (POP) patterns in a community of common bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) resident to Sarasota Bay, FL. **Science of the Total Environment**, v. 408, n. 9, p. 2163–2172, 2010.

WAUGH, C. A. et al. Cytochrome P450 isozyme protein verified in the skin of southern hemisphere humpback whales (*Megaptera novaeangliae*): Implications for biochemical biomarker assessment. **Marine Pollution Bulletin**, v. 62, n. 4, p. 758–761, 2011.

WEDEKIN, L. L. et al. Seasonal variations in spatial usage by the estuarine dolphin, *Sotalia guianensis* (van Bénédén, 1864) (Cetacea; Delphinidae) at its southern limit of distribution. **Brazilian journal of biology/ Revista brasleira de biologia**, v. 67, n. 1, p. 1–8, 2007.

WEDEKIN, L. L.; DAURA-JORGE, F. G.; SIMÕES-LOPES, P. C. Habitat preferences of Guiana dolphins, *Sotalia guianensis* (Cetacea: Delphinidae), in Norte Bay, southern Brazil. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 90, n. 8, p. 1561–1570, 2010.

WHITE, R. D. et al. In vitro metabolism of polychlorinated biphenyl congeners by beluga whale (*Delphinapterus leucas*) and pilot whale (*Globicephala melas*) and relationship to cytochrome P450 expression. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology**, v. 126, n. 3, p. 267–284, 2000.

WHITE, R. D. et al. Catalytic and Immunochemical Characterization of Hepatic Microsomal Cytochromes P450 in Beluga Whale (*Delphinapterus leucas*). **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.126, p. 45-57, 1994.

WILSON, J. Y. et al. CYP1A localization in Beluga whales (*Delphinapterus leucas*) from the St. Lawrence Estuary and the Arctic. **Marine Environmental Research**, v.50, p. 61-81, 2000.

WILSON, J. Y. et al. Systemic effects of arctic pollutants in beluga whales indicated by CYP1A1 expression. **Environmental Health Perspectives**, v. 113, n. 11, p. 1594–1599, 2005.

WILSON, J. Y. et al. Correlates of cytochrome P450 1A1 expression in bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) integument biopsies. **Toxicological Sciences**, v. 97, n. 1, p. 111–119, 2007.

WILSON, J. Y.; MOORE, M. J.; STEGEMAN, J. J. Catalytic and immunochemical detection of hepatic and extrahepatic microsomal cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) in white-sided dolphin (*Lagenorhynchus acutus*). **Aquatic Toxicology**, v. 96, n. 3, p. 216–224, 2010.

WINSTON, G. W. Oxidants and antioxidants in aquatic animals. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 100, n. 1–2, p. 173–176, 1991.

WOLKERS, J. et al. Phase I and phase II enzyme activities in Ringed seals (*Phoca hispida*): characterization of hepatic cytochrome P450 by activity patterns, inhibition studies , mRNA analyses , and western blotting. v. 44, n. 166, p. 103–115, 1998.

YORDY, J. E. et al. Life history as a source of variation for persistent organic pollutant (POP) patterns in a community of common bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) resident to Sarasota Bay, FL. **Science of the Total Environment**, v. 408, n. 9, p. 2163–2172, 2010.

ZACHARIAS, M. A; ROFF, J. C. Use of focal species in marine conservation and management: a review and critique. *Aquatic conservation: marine and freshwater ecosystems*, v.76, p. 56-76, 2001.

ZHOU, Q. et al. Biomonitoring: An appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. **Analytica Chimica Acta**, v. 606, n. 2, p. 135–150, 2008.

APÊNDICE A – Informações de pesquisas que utilizaram a imunodeteção de CYP1A1 por *Western blotting* em cetáceos.

| Título | Autor (es), ano | Espécie(s) | Número amostral | Tecido(s) |
|--|----------------------------|-----------------------------------|------------------------|------------------|
| <i>Catalytic and Immunochemical Characterization of Hepatic Microsomal Cytochromes P450 in Beluga Whale (Delphinapterus leucas)</i> | WHITE et al., 1994 | <i>Delphinapterus leucas</i> | 13 | Fígado |
| <i>Cytochrome P450 in marine mammals: Isozyme forms, catalytic functions, and physiological regulations</i> | GOKSOYR, 1995 | <i>Balaenoptera acutorostrata</i> | 1 | Fígado |
| | | <i>Cystophora cristata</i> | 1 | |
| | | <i>Phoca groenlandica</i> | 1 | |
| | | <i>Phocoena phocoena</i> | 1 | |
| | | <i>Phoca vitulina</i> | 1 | |
| <i>In vitro metabolism of polychlorinated biphenyl congeners by beluga whale (Delphinapterus leucas) and pilot whale (Globicephala melas) and relationship to cytochrome P450 expression</i> | WHITE et al., 2000 | <i>Delphinapterus leucas</i> | 6 | Fígado |
| | | <i>Globicephala melas</i> | 18 | |
| <i>Immunochemical and catalytic characterization of hepatic microsomal cytochrome P450 in the sperm whale (Physeter macrocephalus).</i> | BOON; LEWIS; GOKSOYR, 2001 | <i>Physeter macrocephalus</i> | 3 | Fígado |
| | | <i>Lagenorhynchus albirostris</i> | 1 | |
| | | <i>Phocoena phocoena</i> | 1 | |
| | | <i>Phoca vitulina</i> | 3 | |

| | | | | |
|---|-----------------------|------------------------------|----|---|
| <i>Characterization and profiling of hepatic cytochromes P450 and phase II xenobiotic-metabolizing enzymes in beluga whales (Delphinapterus leucas) from the St. Lawrence River Estuary and the Canadian Arctic</i> | MCKINNEY et al., 2004 | <i>Delphinapterus leucas</i> | 16 | Fígado |
| <i>Development of new-tools to investigate toxicological hazard due to endocrine disruptor organochlorines and emerging contaminants in Mediterranean cetaceans</i> | FOSSI et al., 2006 | <i>Stenella coeruleoalba</i> | 15 | Cultura celular de fibroblastos |
| | | <i>Tursiops truncatus</i> | 2 | |
| | | <i>Balaenoptera physalus</i> | 3 | |
| <i>Cytochrome P4501A is induced in endothelial cell lines from the kidney and lung of the bottlenose dolphin, Tursiops truncatus</i> | GARRICK et al., 2006 | <i>Tursiops truncatus</i> | 1 | Células endoteliais induzidas provenientes do rim e do pulmão |
| <i>First detection of CYP1A1 and CYP2B induction in Mediterranean cetacean skin biopsies and cultured fibroblasts by Western blot analysis</i> | FOSSI et al., 2008 | <i>Stenella coeruleoalba</i> | 60 | Pele |
| | | <i>Tursiops truncatus</i> | 2 | Fígado e pele |
| <i>A multi-trial diagnostic tool in fin whale (Balaenoptera physalus) skin biopsies of the Pelagos Sanctuary (Mediterranean Sea) and the Gulf of California (Mexico).</i> | FOSSI et al., 2010 | <i>Balaenoptera physalus</i> | 17 | Pele |

| | | | | |
|--|--|--------------------------------------|-----------|--|
| <p><i>Catalytic and immunochemical detection of hepatic and extrahepatic microsomal cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) in white-sided dolphin (Lagenorhynchus acutus)</i></p> | <p>WILSON; MOORE; STEGEMAN, 2010</p> | <p><i>Lagenorhynchus acutus</i></p> | <p>12</p> | <p>Baço, cérebro, coração, estômago, fígado, glândula adrenal, glândulas mamárias, intestino, linfonodo, músculo, ovário, pâncreas, pulmão, rim testículo, timo e útero.</p> |
| <p><i>Cytochrome P450 isozyme protein verified in the skin of southern hemisphere humpback whales (Megaptera novaeangliae): Implications for biochemical biomarker assessment</i></p> | <p>WAUGH et al., 2011</p> | <p><i>Megaptera novaeangliae</i></p> | <p>5</p> | <p>Pele</p> |
| <p><i>An “ex vivo” model to evaluate toxicological responses to mixtures of contaminants in cetaceans</i></p> | <p>FOSSI et al., 2012a</p> | <p><i>Stenella coeruleoalba</i></p> | <p>1</p> | <p>Pele e fígado</p> |
| <p><i>The Pelagos Sanctuary for Mediterranean marine mammals: Marine Protected Area (MPA) or marine polluted area? The case study of the striped dolphin (Stenella coeruleoalba)</i></p> | <p>FOSSI et al., 2013</p> | <p><i>Stenella coeruleoalba</i></p> | <p>47</p> | <p>Pele</p> |
| <p><i>Could feeding habit and migratory behaviour be the causes of different toxicological hazard to cetaceans of Gulf of California (Mexico)?</i></p> | <p>FOSSI et al., 2014</p> | <p><i>Balaenoptera physalus</i></p> | <p>8</p> | <p>Pele</p> |
| | | <p><i>Balaenoptera edeni</i></p> | <p>6</p> | |
| | | <p><i>Tursiops truncatus</i></p> | <p>13</p> | |

| | | | | |
|---|----------------------|--------------------------------|----|---------------|
| | | <i>Delphinus capensis</i> | 12 | |
| | | <i>Physeter macrocephalus</i> | 14 | |
| | | <i>Ornicus orca</i> | 5 | |
| | | <i>Balaenoptera musculus</i> | 6 | |
| <i>Ecotoxicological status of seven sperm whales (Physeter macrocephalus) stranded along the Adriatic coast of Southern Italy</i> | MARSILI et al., 2014 | <i>Physeter macrocephalus</i> | 3 | Fígado e pele |
| <i>Persistent organic pollutant concentrations in blubber of 16 species of cetaceans stranded in the Pacific Islands from 1997 through 2011</i> | BACHMAN et al., 2015 | <i>Stenella longirostris</i> | 10 | Fígado |
| | | <i>Stenella coeruleoalba</i> | 6 | |
| | | <i>Stenella frontalis</i> | 3 | |
| | | <i>Feresa attenuata</i> | 2 | |
| | | <i>Pseudorca crassidens</i> | 1 | |
| | | <i>Ziphius cavirostris</i> | 2 | |
| | | <i>Tursiops truncatus</i> | 2 | |
| | | <i>Mesoplodon densirostris</i> | 1 | |
| | | <i>Peponocephala electra</i> | 3 | |
| | | <i>Orcinus orca</i> | 1 | |
| | | <i>Physeter macrocephalus</i> | 1 | |
| | | <i>Megaptera novaeangliae</i> | 3 | |
| | | <i>Steno bredanensis</i> | 1 | |
| | | <i>Indopacetus pacificus</i> | 1 | |
| <i>Kogia breviceps</i> | 1 | | | |
| <i>Kogia sima</i> | 1 | | | |
| <i>In vitro assessment of environmental stress of persistent organic pollutants on the Indo-Pacific humpback dolphin</i> | JIA et al., 2015 | <i>Sousa chinensis</i> | 1 | Pele |