

Atividade 7-etóxi-resorufina O-deetilase em ostras *Crassostrea* sp. e níveis de transcritos e atividades de enzimas de biotransformação em ostras *Crassostrea gigas* expostas a hidrocarbonetos policíclicos aromáticos.

Marília Nardelli Siebert

Marília Nardelli Siebert

**ATIVIDADE 7-ETÓXI-RESORUFINA O-DEETILASE EM OSTRAS
Crassostrea sp. E NÍVEIS DE TRANSCRITOS E ATIVIDADES DE ENZIMAS
DE BIOTRANSFORMAÇÃO EM OSTRAS *Crassostrea gigas* EXPOSTAS A
HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS.**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para obtenção do Grau de Doutor em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Afonso Celso Dias Bainy.

Florianópolis
2017

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

Nardelli Siebert, Marília

Atividade 7-etóxi-resorufina O-deetilase em ostras *Crassostrea* sp. e níveis de transcritos e atividades de enzimas de biotransformação em ostras *Crassostrea gigas* expostas a hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. / Marília Nardelli Siebert ; orientador, Afonso Celso Dias Bainy, 2017.
199 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

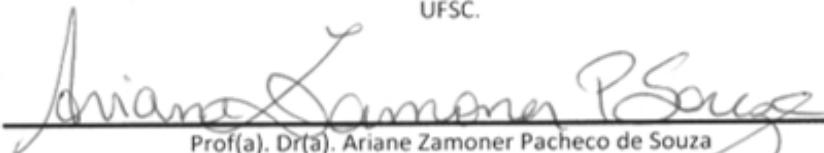
1. Bioquímica. 2. bivalves. 3. biotransformação. 4. citocromo P450. I. Celso Dias Bainy, Afonso. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. III. Título.

"Atividade 7-etóxi-resorufina O-deetilase em ostras *Crassostrea* sp. e níveis de transcritos e atividades de enzimas de biotransformação em ostras *Crassostrea gigas* expostas a hidrocarbonetos policíclicos aromáticos"

Por

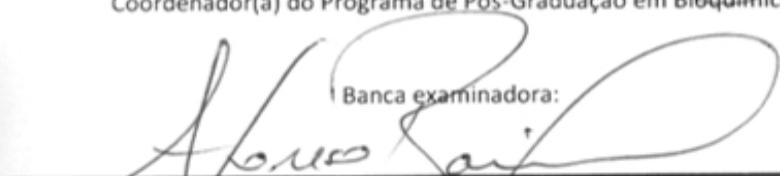
Marília Nardelli Siebert

Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (17/PPGBQA/2017) do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica - UFSC.



Prof(a). Dr(ã). Ariane Zamoner Pacheco de Souza
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

Banca examinadora:



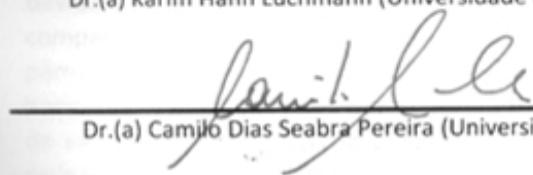
Dr.(a) Afonso Celso Dias Bairy (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientador(a)



Dr.(a) Alcir Luiz Dafre (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr.(a) Karim Hahn Lüchmann (Universidade do Estado de Santa Catarina)



Dr.(a) Camilo Dias Seabra Pereira (Universidade Federal de São Paulo)

Florianópolis, 30 de junho de 2017.

AGRADECIMENTOS

Ao longo do doutorado, tive a felicidade de contar com a ajuda de amigos e profissionais excelentes, sem os quais este trabalho não teria sido possível. Assim, expresso meus agradecimentos:

Ao Afonso Celso Dias Bainy, meu orientador desde a graduação até o doutorado e um dos coordenadores do Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica (LABCAI). O Afonso me ajudou a trilhar os primeiros passos da minha vida profissional, que inclui a minha primeira bolsa de iniciação científica e o meu primeiro emprego como bióloga, pela FEESC. Além disso, apoiou minha decisão de começar a dar aula no IFSC, que ocorreu logo no primeiro semestre de doutorado. Obrigada pela confiança, pela paciência e pelas oportunidades de crescimento profissional durante esses anos.

Gostaria de agradecer a cinco pessoas que além de contribuírem na execução deste trabalho, ajudaram a delinear-lo com seu *know-how*: Jacó Joaquim Mattos, Guilherme Toledo e Silva, Guilherme Razzera, Fabrício Flores Nunes e Flávia Lucena Zacchi.

Ao Jacó Joaquim Mattos, biólogo do Núcleo de Estudos de Patologias Aquícolas (NEPAQ) da UFSC e, para minha felicidade, meu marido. O Jacó abraçou o desafio deste doutorado tanto quanto eu, dividindo comigo todos os momentos importantes desta tese, desde o planejamento e execução técnica e científica a revisão de artigos e outros textos. A superação dos desafios (que não foram poucos) só foram possíveis devido ao planejamento, estudo, discussões, cálculos e conferências compartilhadas com o Jacó. Além disso, o seu preciosismo incansável permitiu a formulação de experimentos coesos para os artigos. Nunca poderei retribuir a altura o apoio que tu me deste. És um cientista fora de série e o ponto mais fora da curva que conheço. Obrigada pelo carinho, paciência e apoio!

Ao Guilherme Toledo e Silva, atualmente pós-doutorando pelo Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. O Gui me ajudou nas buscas no banco de dados de *Crassostrea gigas* nos capítulos III e IV. Apesar dele dizer que é fácil, eu não teria condições de fazer essas

buscas sozinhas. Além disso, ele corrigiu a tese nos momentos finais, dando excelentes contribuições. Achei ótimo podermos voltar a trabalhar juntos nesses dois anos! Obrigada pela ajuda e pelo incentivo!

Ao Guilherme Razzera, professor do Departamento de Bioquímica da UFSC e um dos coordenadores do LABCAI. O Razzera me ensinou e auxiliou na modelagem molecular e no *docking* realizados no capítulo III, o que deu uma nova cara a esse capítulo. Gostaria de ter explorado mais o mundo da modelagem, mas adorei o pouco que pude conhecer. Obrigada!

Ao Fabrício Flores Nunes (Fafá, para os íntimos), que realizou o pós-doutorado pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Aquicultura no período que realizei o doutorado. O Fabrício ajudou no delineamento e montagem das estruturas utilizadas nos experimentos de exposição do capítulo IV. Parece pouco? Ele projetou o tamanho dos aquários, as caixas de vedação, estimou material necessário e construiu todos esses itens que utilizamos nesse experimento (com ajuda do Jacó), que incluiu: a estrutura de armazenamento de água, o sistema de recirculação utilizado na aclimação dos animais, as unidades experimentais e o sistema de filtração de resíduos líquidos. O restante do Bioensaios, que já estava montado, também foi construído por ele. Obrigada, MacGyver!

À Flávia Lucena Zacchi, com quem pude compartilhar todos os experimentos do capítulo IV desta tese. Sua persistência, agilidade e visão científica a fizeram superar de longe a minha contribuição nesta etapa. Foram discussões (e mais discussões) técnicas e científicas, compras (e mais compras) de materiais, etiquetas (e mais etiquetas) para organizar nosso delineamento complexo, caronas (e mais caronas), compartilhamento de referências, pães quentinhos às 6 da manhã, entre tantas outras coisas que a Flá fez. Foram dias em que passamos mais de 16 horas no laboratório para organizar e executar todo o experimento, mas deu certo, né? Foi um privilégio poder compartilhar está última (e longa) etapa de experimentos contigo! Obrigada pela parceria e pela amizade!

Ao Clei E. Piazza e à Daína de Lima, ambos alunos do Programa de Pós-graduação em Bioquímica da UFSC, pelo auxílio na parte experimental que resultaram no capítulo II.

Ao Laboratório de Moluscos Marinhos da Universidade Federal de Santa Catarina (LMM-UFSC), em especial ao Cláudio M. R. de Melo e ao Carlos Henrique A. M. Gomes, pela manutenção, coleta e fornecimento das ostras utilizadas no capítulo II.

A Jacó J. Mattos, Fabrício F. Nunes, Guilherme T. Silva, Isis dos Reis, Clei Piazza, Bárbara Othero, Bárbara Righetti, Juliana Tisca, Tomas Pessati que auxiliaram a mim e a Flávia nas coletas dos experimentos do capítulo IV.

À Dra. Márcia C. Bicego, à Dra. Satie Taniguchi e ao Silvio T. Sasaki, do Laboratório de Química Orgânica Marinha do IO-USP, pelas análises de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos nos tecidos das ostras dos experimentos do capítulo IV.

À Rita de Cássia Rodrigues e ao Emilio K. Gottschalk, do Empório do Mar Sul, pelo fornecimento das ostras utilizadas no capítulo IV.

Ao Diego Nogueira, pelo empréstimo dos iniciadores do 28S.

Ao Sunshine de Ávila Simas, pela preciosa ajuda na finalização da montagem do Bioensaios, permitindo que os experimentos do capítulo IV ocorressem dentro do calendário previsto.

Ao Juliano Valério Luiz, pelo eficiente auxílio nas atividades do Bioensaios durante os experimentos, e à Anita Neli Schwertz, por auxiliar na organização dos laboratórios e do NEPAQ.

À Camilla Parenti, por contribuir na montagem do Bioensaios para os experimentos do capítulo IV.

Aos colegas que trabalharam no Laboratório de Contaminação Aquática e Imunoquímica durante esses últimos dois anos e que direta ou indiretamente colaboraram com este trabalho: Ana Paula Fraga, Bárbara

Othero, Bárbara Righetti, Camila Lisarb, Cecília Valente, Clei Piazza, Daína de Lima, Fabricio F. Nunes, Flávia Zacchi, Gabriel Mattos, Gabrielle Muller, Guilherme Toledo, Isis dos Reis, Juliana Tisca, Laura Freitas, Luiz Vilas Bôas, Nestor Wendt, Rômi Piazza e Tomás Pessatti. Além disso, gostaria de agradecer a todos aqueles que já trabalharam no LABCAI e que contribuíram para a minha formação.

À Maria Risoleta Freire Marques, professora do Departamento de Bioquímica da UFSC e uma das coordenadoras do LABCAI. Apesar de nunca ter sido minha orientadora oficial, a Riso me acompanha desde a graduação e me aconselhou sabiamente nos principais momentos de decisões da minha vida profissional. Obrigada!

Aos membros da banca de qualificação: Karim H. Luchmann, Carlos Peres e Marcelo Farina pelas contribuições ao documento apresentado na época.

Aos membros da banca examinadora da tese de doutorado: Camilo Seabra Pereira, Karim H. Luchmann e Alcir L. Dafre, pela disponibilidade em participar desta etapa da minha formação e pelo tempo dedicado na revisão e correção deste documento.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Bioquímica, em especial àqueles que me deram aula nesta última etapa do doutorado: Marcelo Farina, Hernan Terenzi, Carlos Peres e Nelson Gabilan.

Ao Instituto Federal de Santa Catarina, câmpus Florianópolis, por me conceder dois anos de afastamento da minha atividade docente para realizar o doutorado. Em especial aos professores da Assessoria de Química e Biologia do Departamento Acadêmico de Linguagem, Tecnologia, Educação e Ciência (DALTEC), por me incentivarem e me auxiliarem enquanto eu tentava equilibrar as atividades de docente com as de discente.

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia – Toxicologia Aquática (INCT/TA) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento do projeto (Processos 307467/2013-9 e 406104/2013-1).

Aos amigos da sala 93: Jacó, Clei, Daína Fabrício, Flávia e Isis, meus companheiros de jornada e fonte de risada de cada dia. Por dividirem comigo todos os momentos ao longo destes últimos dois anos de doutorado e tantos outros anteriores. Não há no mundo humor que oscila tão facilmente do ácido ao besta como o de vocês, já estou com saudades dos nossos cafés! Obrigada pela amizade!

Às amigas Bárbara, Camis, Daína, Flávia, Gabrielle, Isis, Rômi, Daiane, Karim, Camila, Cristina, Laura, Mariana e Mariane. Obrigada pela amizade e pelas conversas sérias, bestas e terapêuticas ao longo deste processo.

À minha família, por me incentivarem a seguir a carreira acadêmica, pelo carinho ao longo deste percurso e por compreenderem as particularidades desta escolha.

*“O único sentido íntimo das cousas
É elas não terem sentido íntimo nenhum”*

Fernando Pessoa

RESUMO

Contaminantes ambientais podem ser metabolizados por enzimas que compõem o sistema de biotransformação. Esse sistema é constituído de enzimas de fase I, como as enzimas da superfamília citocromo P450 (CYP), e de fase II, composta por enzimas de conjugação, como glutationas *S*-transferases (GSTs) e sulfotransferases (SULTs). Em vertebrados, CYPs da família 1 (CYP1) possuem como substratos os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs). Esses compostos podem induzir um aumento na atividade de CYP1 e a atividade dessas enzimas é usualmente quantificada através do ensaio de 7-etóxi-resorufina *O*-deetilase (EROD). Apesar da ausência da família gênica *CYP1* em animais protostômios, genes semelhantes à *CYP1* (*CYP1-like*) e a atividade EROD foram detectados nesses organismos. Nos bivalves *Crassostrea brasiliana* (= *Crassostrea gasar*) e *Crassostrea gigas*, há evidências da presença de genes *CYP1-like*, apesar da atividade EROD não ter sido detectada até o momento. No presente estudo, a atividade EROD em *C. brasiliana* e *C. gigas* foi investigada. Além disso, os níveis de transcritos de genes e atividades de enzimas de biotransformação em *C. gigas* expostas aos HPAs pireno e fluoreno foram estudados. Em *C. brasiliana*, a atividade EROD foi detectada na fração microsomal de brânquias e glândula digestiva. A temperatura e o pH do ensaio foram estabelecidos em 30 °C e 7,4, respectivamente. O K_m aparente (K_{mapp}) da enzima foi 4,32 μM para as brânquias e 5,56 μM para a glândula digestiva. A velocidade máxima (V_{max}) foi 337,3 $\text{fmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg de proteína}^{-1}$ nas brânquias e 297,7 $\text{fmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg de proteína}^{-1}$ na glândula digestiva. A atividade EROD foi inibida em ambos os tecidos pelo inibidor de CYP1 elipticina, sugerindo que uma enzima *CYP1-like* esteja catalisando a atividade EROD. Em *C. gigas*, a atividade EROD foi detectada apenas nas brânquias e a caracterização cinética demonstrou um K_{mapp} de 1,15 μM e V_{max} de 229,2 $\text{fmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}\cdot\text{proteína}^{-1}$. O inibidor clotrimazol e o surfactante Triton X-100 inibiram a atividade EROD em *C. gigas*. Os níveis de transcritos dos genes *CYP1-like 1* e *2*, analisados em conjunto, se correlacionaram positivamente com a atividade EROD das brânquias. Os modelos de homologia desses genes apresentaram o enovelamento característico de CYP e a ancoragem molecular demonstrou que essas estruturas possuem potencial para metabolizar o substrato 7-etóxi-resorufina. Os níveis de transcritos dos genes *CYP1-like*, *CYP2-like*,

CYP2AU2, *CYP356A1*, *CYP17 α -like*, *GST Ω -like*, *GSTmic-like* e *SULT-like* e as atividades de enzimas de biotransformação EROD, GST total e GST microssomal (GSTmic) foram analisados nas brânquias de *C. gigas* expostas a 50 e 100 $\mu\text{g/L}$ de pireno ou 100 e 200 $\mu\text{g/L}$ de fluoreno por 24 e 96 h. A atividade GSTmic foi maior nas brânquias de ostras expostas a 100 $\mu\text{g/L}$ de pireno em relação aos demais grupos de exposição ao pireno após 96 h. Os níveis de transcritos dos genes *CYP2AU2*, *GST Ω -like* e *SULT-like* foram maiores nos animais expostos a 200 $\mu\text{g/L}$ de fluoreno em relação aos demais grupos de exposição ao fluoreno após 24 h. Em conclusão, a atividade EROD é possivelmente catalisada por enzimas *CYP1-like* em ostras *C. brasiliana* e *C. gigas* e a exposição ao fluoreno alterou os níveis de transcritos de genes de biotransformação, entretanto, o mecanismo pelo qual o fluoreno alterou esses níveis permanece para ser elucidado.

Palavras-chave: Biotransformação. Citocromo P450. CYP1. Fluoreno. Molusco. Pireno.

ABSTRACT

Environmental contaminants can be metabolized by biotransformation enzymes. This system consists of phase I enzymes, as cytochrome P450 (CYP) superfamily, and phase II conjugating enzymes, as glutathione S-transferases (GSTs) and sulfotransferases (SULTs). In vertebrates, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are substrates of cytochrome P450 family 1 (CYP1) and can induce CYP1 enzyme activity, which is usually quantified as 7-ethoxyresorufin O-deethylase activity (EROD). *CYP1* gene family is not present in protostomes organisms, although *CYP1-like* genes and EROD activity have been detected in these organisms. There are evidences of *CYP1-like* genes in the bivalves *Crassostrea brasiliiana* (= *Crassostrea gasar*) and *Crassostrea gigas*, but no EROD activity has been detected in these organisms. The aim of this study was to investigate the presence of EROD activity in the bivalve mollusks *C. brasiliiana* and *C. gigas*. In addition, transcript levels and activities of biotransformation enzymes were analyzed in oyster *C. gigas* exposed to the PAHs pyrene and fluorene. In *C. brasiliiana*, EROD activity was detected in gills and digestive gland microsomal fraction. Temperature and pH for EROD assay were established as 30 °C and 7.4, respectively. EROD apparent K_m (K_{mapp}) was 4.32 μM for gills and 5.56 μM for digestive gland. EROD V_{max} was 337.3 $\text{fmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}$ of protein⁻¹ in gills and 297.7 $\text{fmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}$ of protein⁻¹ in digestive gland. CYP1 inhibitor ellipticine (ELP) inhibited EROD in both tissues, suggesting that a CYP1-like enzyme is catalyzing EROD activity. In *C. gigas*, EROD activity was detected only in gills. EROD kinetic characterization demonstrated a K_{mapp} of 1.15 μM and V_{max} of 229.2 $\text{fmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}\cdot\text{protein}^{-1}$. Clotrimazole and the surfactant Triton X-100 inhibited EROD activity in *C. gigas*. Transcript levels of *CYP1-like 1* and *2*, analyzed together, positively correlated with EROD activity observed in gills. Homology models of these genes exhibited a typical CYP fold and molecular docking showed that these structures have potential to metabolize the substrate 7-ethoxyresorufin. *CYP1-like*, *CYP2-like*, *CYP2AU2*, *CYP356A1*, *CYP17 α -like*, *GST Ω -like*, *GSTmic-like* and *SULT-like* genes transcript levels and EROD, total GST and microsomal GST (GSTmic) biotransformation enzymes activity were analyzed in gills of *C. gigas* exposed to 50 and 100 $\mu\text{g/L}$ of pyrene and 100 and 200 $\mu\text{g/L}$ of fluorene for 24 and 96 h. GSTmic activity were higher in gills of oyster exposed to 100 $\mu\text{g/L}$ of pyrene compared

to the remaining experimental groups after 96 h of exposure. *CYP2AU2*, *GSTΩ-like* and *SULT-like* transcript levels were higher in oysters exposed to 200 µg/L of fluorene compared to others groups exposed to fluorene after 24 h. In conclusion, EROD activity is possibly catalyzed by CYP1-like enzymes in oyster *C. brasiliana* and *C. gigas* and fluorene exposure have an effect upon biotransformation genes transcript levels, although the mechanism which fluorene affect transcript levels in *C. gigas* remains to be elucidated.

Keywords: Biotransformation. Cytochrome P450. CYP1. Fluorene. Mollusk. Pyrene.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Sítio ativo de citocromo P450. **A.** Sítio ativo típico de CYP com cadeia de aminoácidos que delimita o sítio ativo (verde), anel protoporfirínico (cinza), átomo de ferro (marrom), oxigênio (vermelho) e enxofre (amarelo). **B.** Grupo prostético composto pelo anel de protoporfirina IX e Ferro III. Linha pontilhada representa a coordenação entre o enxofre do resíduo de cisteína (Cys) e o ferro. Considerando que o grupo heme está distribuído nos eixos x e y do espaço cartesiano, em azul são representadas estruturas que estão distribuídas no eixo z. 37
- Figura 2.** Principais reações catalisadas por CYPs..... 38
- Figura 3.** Mecanismo de transferência de elétrons que ocorre no complexo entre CYPs e enzimas redutases no retículo endoplasmático. **A.** CYP recebe equivalentes redutores de NADPH-citocromo P450 redutase (CPR). **B.** CYP recebe equivalentes redutores de NADH - Citocromo b5 redutase (CYtb5Red) via citocromo b5 (cytb5). 39
- Figura 4.** Ciclo catalítico de CYP para uma reação de C-hidroxilação. Uma explicação detalhada do ciclo está no texto. 40
- Figura 5.** Estrutura geral de CYP. **A.** Topologia de CYP102 demonstrando as estruturas secundárias e o arranjo dos elementos secundários. **B.** Estrutura terciária de P450cam (PDB: 5CP4) com destaque para elementos importantes. 42
- Figura 6.** Mecanismo de ação do AHR em uma célula eucariótica. O agonista se liga ao receptor AHR no citoplasma da célula e esse complexo é translocado ao núcleo, onde o AHR forma um dímero com o ARNT. Esse heterodímero reconhece elementos responsivos na região regulatório do gene *CYP1A1*, o que culmina com a indução da transcrição desse gene. O aumento do nível de transcritos de *CYP1A1* pode causar um aumento na expressão da proteína CYP1A1. 44
- Figura 7.** Substratos de resorufina. 46
- Figura 8.** Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos considerados prioritários pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA). 51

Figura 9. Sistema de biotransformação de xenobióticos. Após entrar na célula, o xenobiótico pode ser metabolizado por enzimas de fase I e II do sistema de biotransformação ou ser bombeado para fora da célula pelas proteínas de fase III. As enzimas de fase I se caracterizam por realizarem reações de oxidação, enquanto as enzimas de fase II realizam reações de conjugação do metabólito ou do xenobiótico nativo a substratos endógenos hidrofílicos. A medida que são metabolizadas pelas enzimas de biotransformação, a hidrossolubilidade dos compostos aumenta.....56

Figura 10. Ostras *C. brasiliana* e *C. gigas*. **A.** Aspecto de *C. brasiliana* após remoção de uma das valvas. **B.** Aspecto de *C. gigas* após remoção de uma das valvas. **C.** Classificação das ostras *C. brasiliana* e *C. gigas*.....61

Figura 11. Efeito da temperatura (**A**) e do pH (**B**) na atividade EROD de microsomas de brânquias e de glândula digestiva de *C. brasiliana*. Os ensaios foram realizados com 7-ER 10 μ M, NADPH 4 mM a pH 7,4 (A) e 7-ER 10 μ M, NADPH 4 mM e 30 °C (B). Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão (n = 3 réplicas técnicas, *pool* de seis animais).74

Figura 12. Atividade EROD em frações citosólicas (SN) e microsomais (MIC) de brânquias e glândula digestiva de *C. brasiliana* utilizando diferentes coenzimas (NADH e NADPH). As condições de ensaio foram: **1.** Fração citosólica, NADPH 4 mM; **2.** Fração microsomal, NADPH 4 mM; **3.** Fração microsomal desnaturada, NADPH 4 mM; **4.** Fração microsomal, NADH 4 mM; **5.** Fração microsomal, NADH e NADPH 4mM de cada. Todos os ensaios foram realizados com 10 μ M de 7-ER, pH 7,4 e 30°C. nd: não detectado. Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão (n = 3 réplicas técnicas, *pool* de oito animais).75

Figura 13. Taxa de formação de resorufina em diferentes concentrações de microsomas de brânquias e glândula digestiva (expressos em percentual da amostra não diluída) de *C. brasiliana*. Valor de r^2 considerando dados de 100%, 75%, 50%, 25% e 12,5%; valor de *p* expressa o ajuste dos dados (n = 3 réplicas técnicas, *pool* de oito animais).76

Figura 14. Atividade EROD em diferentes concentrações de 7-etóxi-resorufina (7-ER) na fração microsomal de brânquias (**A**) e glândula digestiva (**B**) de *C. brasiliana*. Os ensaios foram realizados com NADPH 4 mM, pH 7,4. Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão (n = 3 réplicas técnicas, *pool* de seis animais). K_{mapp} : K_m aparente. V_{max} : velocidade máxima.....77

Figura 15. Efeito dos inibidores elipticina (ELP), furafilina (FRF) e α -naftoflavona (ANF) na atividade EROD em microsomas de brânquias (A) e glândula digestiva (B) de *C. brasiliiana*. Os ensaios foram realizados com 10 μ M de 7-ER, NADPH 4 mM, pH 7,4 e 30 °C. Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão. A análise estatística realizada foi ANOVA de uma via, seguida do teste complementar de Dunnett. * Representa diferença significativa entre o grupo com inibidor comparado com o grupo controle, * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$ (n = 3 réplicas técnicas, pool de nove ostras). 78

Figura 16. Equações dos modelos cinéticos de Michaelis-Menten, isoenzimático, autoativação por substrato e inibição por substratos. 93

Figura 17. Tipos de orientações do ligante 7-ER em relação ao ferro do grupo heme. A seta indica o carbono localizado na posição de oxidação na molécula de 7-ER. 98

Figura 18. Atividade EROD em diferentes concentrações de 7-etóxi-resorufina (7-ER) na fração microsomal de brânquias de *C. gigas*. Os ensaios foram realizados com NADPH 4mM, pH 7,4, 30 °C. Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão (n=3 réplicas técnicas, pool de 11 animais). K_{mapp} : K_m aparente. V_{max} : Velocidade máxima. 100

Figura 19. Atividade EROD com diferentes coenzimas (A) e inibidores (B) na fração microsomal de brânquias de *C. gigas*. Os ensaios foram realizados com 10 μ M de 7-ER, pH 7,4, 30 °C. Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão (n=3 réplicas técnicas, pool de 11 animais). 101

Figura 20. Níveis de transcritos de *CYP1-like 1 + 2, 3 e 4* em brânquias, glândula digestiva e manto de *C. gigas*, normalizados pelo nível de transcritos de *28S*. Os níveis de transcritos foram analisados por qPCR e estão expressos relativos ao nível de transcritos das brânquias. Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão (n=11). A análise estatística realizada foi ANOVA de uma via, seguida do teste complementar de Tukey. Letras diferentes representam diferença significativa entre os tecidos, $p < 0,05$ 103

Figura 21. Correlação entre a atividade EROD e os níveis de transcritos de *CYP1-like 1* e *CYP1-like 2* em brânquias de *C. gigas* (n=11; $r^2 = -0,75$, $p = 0,0005$). Para auxiliar na visualização, uma linha de regressão linear (linha em negrito) e os intervalos de confiança de 95% (linhas pontilhadas) estão representadas. 105

Figura 22. Estrutura geral preditas de CYP1-like 1 e 2 de ostras *C. gigas* **A.** Estrutura predita de CYP1-like 1 (azul) alinhada por átomos de carbonos α à estrutura de CYP1A1 humana (4i8v - cinza). **B.** Estrutura predita de CYP1-like 2 (verde) alinhada por átomos de carbonos α à estrutura de CYP1A1 humana (4i8v - cinza). Estruturas secundárias destacadas no texto estão demonstradas em ambos os modelos. O grupo heme está representado como bastões em cinza claro, a esfera central amarela representa o átomo de ferro.106

Figura 23. Ancoragem molecular de 7-ER nas estruturas preditas de CYP1-like 1 e 2 de ostras *C. gigas* **A.** CYP1-like 1 (azul) alinhado ao CYP1A1 humano (4i8v - cinza) com a pose de menor energia da ancoragem molecular da 7-ER. **B.** CYP1-like 2 (verde) alinhado ao CYP1A1 humano (4i8v - cinza) com a pose de menor energia da ancoragem molecular da 7-ER. O grupo heme está representado como bastões em cinza claro, a esfera central amarela representa o átomo de ferro. Setas indicam a distância entre o carbono da 7-ER localizado na posição de oxidação e o ferro do grupo heme. Os números de resíduos representam a sequência polipeptídica deduzida da ostra.113

Figura 24. Níveis de transcritos de *28S*, *60S*, *ACT*, *ADP*, *EF*, *G3PDH*, *H2A* e *TUB* em brânquias, glândula digestiva e manto de *C. gigas*. Os níveis de transcritos foram analisados por qPCR e estão expressos relativos ao nível de transcritos das brânquias. Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão (n=11). A análise estatística realizada foi ANOVA de uma via, seguida do teste complementar de Tukey. Letras diferentes representam diferença significativa entre os tecidos, $p < 0,05$116

Figura 25. Alinhamento das sequências de aminoácidos de CYP1A1, CYP1A2 e CYP1B1 de *Homo sapiens* e CYP1-like 1, 2, 3 e 4 de *C. gigas*. O alinhamento foi realizando com o programa Muscle (EDGAR, 2002) e a edição das cores com o programa Jalview 2.9.0b2 (WATERHOUSE et al., 2009). Cinza: resíduos de aminoácidos do sítio ativo de CYP1 humano e sítio ativo predito de CYP1-like de ostras. Preto: motivos conservados EXXR e FXXGXRXCXG de CYP. Caixas vermelhas: resíduos que interagem com a 7-ER no sítio ativo de CYP1-like 1 e CYP1-like 2 de *C. gigas*.118

Figura 26. Linha do tempo do período de aclimação (laranja) e de exposição (azul) ao pireno ou fluoreno. Os animais foram alimentados a cada 36 h (verde). Os números em caixas laranja indicam dias. Os números em caixas azuis indicam os períodos de exposição (T0) e dissecação dos animais (24 e 96 h).125

Figura 27. Esquema de exposição de *C. gigas* ao pireno (A) e ao fluoreno (B). As ostras foram expostas durante 24 e 96 h às concentrações de 50 e 100 µg/L de pireno e de 100 e 200 µg/L de fluoreno (n=6 animais por aquário; desses animais, quatro por aquário destinados às análises de atividade enzimática e níveis de transcritos e dois para as análises químicas). 127

Figura 28. Experimento de exposição de ostras *C. gigas* ao pireno e fluoreno. A. Aclimação de ostras *C. gigas* em sistema de recirculação de água. B. Aspecto geral do Laboratório de Bioensaios durante os experimentos com aquários em caixas fechadas. C. Triplicata de aquários com ostras expostas a 100 µg/L de fluoreno por 96 h. D. Caixas de madeira com filtros para vapores orgânicos. 128

Figura 29. Monitoramento fluorimétrico de HPAs em aquários com 50 µg/L (P50) ou 100 µg/L (P100) de pireno (A) e em aquários com 100 µg/L (F100) ou 200 µg/L (F200) de fluoreno (B) por 24 h, e respectivos grupos controle. Os aquários com ostras continham seis ostras da espécie *C. gigas*, 18L/aquário, paralelamente, foram monitorados aquários sem ostras nas mesmas concentrações dos HPAs. Os valores dos aquários com ostras representam média±desvio padrão de três aquários. 137

Figura 30. Quantificação de pireno e fluoreno nos tecidos das ostras *C. gigas* expostas por 24 e 96h a 50 µg/L (P50) ou 100 µg/L (P100) de pireno (A) e a 100 µg/L (F100) ou 200 µg/L (F200) de fluoreno (B) e respectivo grupo controle (CT). T0 representa ostras coletadas no início dos experimentos. A análise foi realizada em um *pool* de seis ostras para cada grupo. 138

Figura 31. Níveis de transcritos de genes de fase I do sistema de biotransformação em brânquias de ostras *C. gigas* expostas a 50 µg/L (P50) ou 100 µg/L (P100) de pireno por 24 h e 96 h e o grupo controle (CT) respectivo. Os níveis de transcritos dos genes *CYP1-like*, *CYP2-like*, *CYP2A2*, *CYP356A1* e *CYP17α-like* estão normalizados pela média geométrica dos níveis de transcritos de *EF* e *G3PDH* e relativos ao grupo controle. Os dados estão expressos como média ± erro padrão (n=10). Letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos, $p < 0,05$ 140

Figura 32. Níveis de transcritos de genes de fase II do sistema de biotransformação em brânquias de ostras *C. gigas* expostas a 50 µg/L (P50) ou 100 µg/L (P100) de pireno por 24 h e 96 h e o grupo controle (CT) respectivo. Os níveis de transcritos dos genes *GSTΩ-like*, *GSTmic-like* e *SULT-like* estão

normalizados pela média geométrica dos níveis de transcritos de *EF* e *G3PDH* e relativos ao grupo controle. Os dados estão expressos como média \pm erro padrão (n=10). Letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos, $p < 0,05$141

Figura 33. Níveis de transcritos de genes de fase I do sistema de biotransformação em brânquias de ostras *C. gigas* expostas a 100 $\mu\text{g/L}$ (F100) ou 200 $\mu\text{g/L}$ (F200) de fluoreno por 24 h e 96 h e o grupo controle (CT) respectivo. Os níveis de transcritos dos genes *CYP1-like*, *CYP2-like*, *CYP2A2*, *CYP356A1* e *CYP17 α -like* estão normalizados pela média geométrica dos níveis de transcritos de *EF* e *G3PDH* e relativos ao grupo controle. Os dados estão expressos como média \pm erro padrão (n=10). Letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos, $p < 0,05$142

Figura 34. Níveis de transcritos de genes de fase II do sistema de biotransformação em brânquias de ostras *C. gigas* expostas a 100 $\mu\text{g/L}$ (F100) ou 200 $\mu\text{g/L}$ (F200) de fluoreno por 24 h e 96 h e o grupo controle (CT) respectivo. Os níveis de transcritos dos genes *GST Ω -like*, *GSTmic-like* e *SULT-like* estão normalizados pela média geométrica dos níveis de transcritos de *EF* e *G3PDH* e relativos ao grupo controle. Os dados estão expressos como média \pm erro padrão (n=10). Letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos, $p < 0,05$143

Figura 35. Atividades das enzimas GST total e GSTmic em brânquias de ostras *C. gigas* expostas a 50 $\mu\text{g/L}$ (P50) ou 100 $\mu\text{g/L}$ (P100) de pireno por 24 h e 96 h e o grupo controle (CT) respectivo. Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão (n=9). Letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos, $p < 0,05$144

Figura 36. Atividades das enzimas EROD, GST total e GSTmic em brânquias de ostras *C. gigas* expostas a 100 $\mu\text{g/L}$ (F100) ou 200 $\mu\text{g/L}$ (F200) de fluoreno por 24 h e 96 h e o grupo controle (CT) respectivo. Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão (n=9). Letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos, $p < 0,05$145

Figura 37. Níveis de transcritos de *28S*, *G3PDH*, *EF* e *EF+G3PDH* em brânquias de ostras *C. gigas* expostas a 50 $\mu\text{g/L}$ (P50) ou 100 $\mu\text{g/L}$ (P100) de pireno por 24 h e 96 h e o grupo controle (CT) respectivo. Os níveis de transcritos dos genes ($2^{-\text{Cq}}$) estão relativos ao grupo controle. Os dados estão expressos como média \pm

desvio padrão (n=10). Letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos, $p < 0,05$ 158

Figura 38. Níveis de transcritos de *28S*, *G3PDH*, *EF* e *EF+G3PDH* em brânquias de ostras *C. gigas* expostas a 100 µg/L (F100) ou 200 µg/L (F200) de fluoreno por 24 h e 96 h e o grupo controle (CT) respectivo. Os níveis de transcritos dos genes (2^{-Cq}) estão relativos ao grupo controle. Os dados estão expressos como média ± desvio padrão (n=10). 159

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Gene (nome hipotético), número de acesso do GenBank para sequência de DNA codificante (CDS), número de acesso do GenBank para a sequência de proteína e sequência dos iniciadores utilizados para análise dos níveis de transcritos. F, iniciador *forward* e R, iniciador *reverse* 95

Tabela 2. Resíduos que compõem a cavidade do sítio ativo na estrutura de CYP1A1 de *Homo sapiens* (WALSH et al. 2013) e nas estruturas preditas de CYP1-like 1 e CYP1-like 2 de *C. gigas*. Cinza indica resíduos de mesma posição nas estruturas e com cadeia lateral com as mesmas características químicas em CYP1A1 e CYP1-like 1 ou CYP1-like 2. 108

Tabela 3. Código, nome do gene, número de acesso do GenBank e as sequências dos iniciadores utilizados para análise dos níveis de transcritos dos genes candidatos a gene referência. F, iniciador *forward* e R, iniciador *reverse*. 115

Tabela 4. Espécie de vertebrado, isoforma de CYP1 e código de acesso do GenBank das sequências de aminoácidos usadas no alinhamento da modelagem por homologia de CYP1-like de ostras *C. gigas*. 117

Tabela 5. Código e nome do gene, número de acesso do GenBank para sequência de DNA codificante (CDS) e sequência dos iniciadores. F, iniciador *forward* e R, iniciador *reverse*. 132

Tabela 6. Tempo de meia-vida médio de pireno e fluoreno nos aquários com ostras *C. gigas* e ajuste dos dados (r^2). Os aquários continham seis ostras da espécie *C. gigas*, 18L/aquário. 138

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

28S	rRNA 28S
60S	Proteína ribossomal 60S
7-ER	7-Etóxi-resorufina
ABC	<i>ATP-binding Cassete</i>
ACT	Actina
ADP	Fator de ADP-Ribosilação
AHR	Receptor de Hidrocarboneto Aromático
AM_f	Reação com amostra - leitura final
AM_i	Reação com amostra - leitura inicial
ANF	α -naftoflavona
ARNT	Translocador nuclear do receptor AHR
AROD	Alcóxi-resorufina <i>O</i> -deetilase
ATP	Trifosfato de adenosina
BaP	Benzo[a]pireno
BNF	β -naftoflavona
BPH	Benzo[a]pireno hidroxilase
BR_f	Reação sem amostra - leitura final
BR_i	Reação sem amostra - leitura inicial
CC	Coefficiente de calibração
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CDNB	1-Cloro-2,4-dinitrobenzeno
CDS	Sequência de DNA codificante
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais da UFSC
CPR	NADPH -citocromo P450 redutase
Cq	Ciclo da reação que atinge a fluorescência limiar
CT	Grupo controle
CTZ	Clotrimazol
CYP	Citocromo P450
CYP17α-like	Semelhante à 17 α - hidroxilase/ 17,20 liase
CYP1-like	Semelhante ao citocromo P450 família 1

CYP2A2	Citocromo P450 2A2
CYP2-like	Semelhante ao citocromo P450 família 2
CYP356A1	Citocromo P450 356A1
Cytb5	Citocromo b5
Cytb5Red	NADH- citocromo b5 redutase
DMSO	Dimetilsulfóxido
DRE	Elemento responsivo à dioxina
DTT	DL-Ditiotreitol
ECOD	etóxi-cumarina <i>O</i> -deetilase
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EF	Fator de alongação
ELP	Elipticina
EPA	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos
EROD	7-etóxi-resorufina <i>O</i> -deetilase
F	<i>Forward</i>
F100	Fluoreno 100 µg/L
F200	Fluoreno 200 µg/L
FLU	Fluoreno
FMO	Flavina monooxigenase
FRF	Furafilina
FAA	Fração acomodada em água
G3PDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
GSH	Glutathiona reduzida
GST	Glutathiona S-transferase
GSTmic	Glutathiona S-transferase microsomal
GSTΩ	Glutathiona S-transferase ômega
H2A	Histona H2A
HAH	Hidrocarboneto aromático halogenado
HPA	Hidrocarboneto policíclico aromático
HSP90	Proteína de choque térmico 90

IARC	Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer
IDT	Integrated DNA Technologies
K_m	Constante de Michaelis
K_{mapp}	K _m aparente
LABCAI	Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica
LMM	Laboratório de Moluscos Marinhos
MDR	Resistência à multidrogas
mRNA	RNA mensageiro
MXR	Resistência a multi-xenobióticos
NADH	β-nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH	β-nicotinamida adenina dinucleotídeo 2' fosfato
nd	Não detectado - abaixo do limite de detecção
NEPAQ	Núcleo de Estudos de Patologias Aquícolas
p	Probabilidade de significância
P50	Pireno 50 µg/L
P100	Pireno 100 µg/L
P450	Citocromo P450 (em bancos de estruturas de proteínas)
PAPS	3'-fosfoadenosina-5'fosfosulfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDB	Banco de Dados de Proteínas
P-gp	Glicoproteínas P
PHE	Fenantreno
PIR	Pireno
PMSF	Fluoreto de fenilmetasulfonil
PMT	Tubos fotomultiplicadores
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
R	<i>Reverse</i>
R²	Linearidade
RE	Retículo endoplasmático
RFU	Unidade de fluorescência relativa
RMN	Ressonância magnética nuclear

RMSD	Desvio médio das raízes quadradas
RNA	Ácido ribonucleico
S	Substrato
S	<i>Slope</i> - coeficiente angular da curva
SO	Produto monooxigenado por enzimas CYP
SULT	Sulfotransferase
T0	Tempo zero
TBE	Tampão de TRIS, Ácido Bórico e EDTA
TCDD	2,3,7,8- tetraclorodibenzo- <i>p</i> -dioxina
TRIS	2-Amino-2-hidroxi metil-propano-1,3diol
TUB	Tubulina
UDPGT	UDP-gluconosiltransferase
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
v	Volume
V	Velocidade da Reação
V₀	Velocidade inicial da reação
V_{max}	Velocidade máxima da reação
XAP2	Proteína 2 co-chaperona associada a proteína co-chaperona X
XRE	Elemento responsivo a xenobiótico
ΔG	Variação de energia livre em kcal/mol

PADRÕES UTILIZADOS:

Aminoácidos e Nucleotídeos: União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) para abreviaturas e siglas

Símbolos métricos: Sistema Internacional de Unidades

SUMÁRIO

1	CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO GERAL -----	33
1.1	A SUPERFAMÍLIA CITOCROMO P450 E A COMPLEXIDADE DOS SERES VIVOS	33
1.2	ASPECTOS GERAIS DA SUPERFAMÍLIA CYP	35
	<i>1.2.1 Histórico e nomenclatura</i>	<i>35</i>
	<i>1.2.2 Função e processo catalítico</i>	<i>36</i>
	<i>1.2.3 Estrutura</i>	<i>41</i>
1.3	A FAMÍLIA CITOCROMO P450 1	42
1.4	A ATIVIDADE ENZIMÁTICA 7-ETÓXI-RESORUFINA O-DEETILASE	46
1.5	GENES CYP1-LIKE E ATIVIDADES ENZIMÁTICAS REFERENTES A CYP1 EM PROTOSTÔMIOS	47
1.6	HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS	49
	<i>1.6.1 Pireno</i>	<i>52</i>
	<i>1.6.2 Fluoreno</i>	<i>53</i>
1.7	SISTEMA DE BIOTRANSFORMAÇÃO	54
1.8	BIOMARCADORES DA CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL	58
1.9	MOLUSCOS COMO ORGANISMOS SENTINELAS DE CONTAMINAÇÃO	60
1.10	OBJETIVOS E CONSIDERAÇÕES SOBRE A ESTRUTURA DO TEXTO	62
	<i>1.10.1 Objetivo geral</i>	<i>63</i>
	<i>1.10.2 Objetivos específicos</i>	<i>63</i>
	<i>1.10.3 Considerações sobre a estrutura do texto</i>	<i>64</i>
2	CAPÍTULO II: ATIVIDADE ETÓXI-RESORUFINA O-DEETILASE EM OSTRA <i>Crassostrea brasiliana</i> -----	65

2.1	INTRODUÇÃO	67
2.2	MATERIAIS E MÉTODOS	69
2.2.1	<i>Químicos</i>	69
2.2.2	<i>Preparo das frações citosólicas e microssomais</i>	69
2.2.3	<i>Atividade 7-etóxi-resorufina O-deetilase (EROD)</i>	70
2.2.4	<i>Padronização das condições para a atividade EROD e parâmetros cinéticos</i>	71
2.2.5	<i>Ensaio com inibidores de CYP1</i>	73
2.3	RESULTADOS	73
2.4	DISCUSSÃO	78
2.5	CONCLUSÕES	84
3	CAPÍTULO III: GENES CITOCROMO P450 CANDIDATOS PARA A ATIVIDADE ETÓXI-RESORUFINA O-DEETILASE NA OSTRAS <i>Crassostrea gigas</i>	85
3.1	INTRODUÇÃO	88
3.2	MATERIAIS E MÉTODOS	91
3.2.1	<i>Químicos</i>	91
3.2.2	<i>Preparo das frações citosólicas e microssomais</i>	91
3.2.3	<i>Atividade 7-etóxi-resorufina O-deetilase (EROD)</i>	92
3.2.4	<i>Análise dos níveis de transcritos de CYP1-like</i>	94
3.2.5	<i>Modelagem de CYP1-like por homologia e ancoragem molecular de 7-ER</i>	96
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	99
3.4	CONCLUSÕES	112
3.5	INFORMAÇÕES SUPLEMENTARES	114
4	CAPÍTULO IV: NÍVEIS DE TRANSCRITOS E ATIVIDADES DE ENZIMAS DE BIOTRANSFORMAÇÃO EM OSTRAS <i>Crassostrea gigas</i> EXPOSTAS AO PIRENO E FLUORENO	119

4.1	INTRODUÇÃO	122
4.2	MÉTODOS	125
4.2.1	<i>Delineamento experimental.....</i>	125
4.2.2	<i>Análises químicas.....</i>	129
4.2.3	<i>Análise dos níveis de transcritos</i>	131
4.2.4	<i>Análises enzimáticas</i>	133
4.2.5	<i>Análises estatísticas</i>	135
4.3	RESULTADOS	135
4.4	DISCUSSÃO.....	146
4.5	CONCLUSÕES.....	155
4.6	INFORMAÇÕES SUPLEMENTARES	157
5	CAPÍTULO V: COMENTÁRIOS E CONCLUSÕES FINAIS	161
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	165

1 CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO GERAL

1.1 A SUPERFAMÍLIA CITOCROMO P450 E A COMPLEXIDADE DOS SERES VIVOS

O surgimento da diversidade e complexidade biológica envolve a evolução de maquinarias bioquímicas essenciais para a manutenção da homeostase celular e do organismo, como as do metabolismo energético e as do processamento da informação genética. Essas maquinarias se mantiveram relativamente conservadas ao longo da evolução. Paralelamente, surgiram sistemas enzimáticos diversificados com a capacidade de metabolizar moléculas e estruturas complexas. Esses sistemas viabilizaram o surgimento de funções complexas nos seres vivos, como comunicação entre as células, defesa celular, estruturação de membranas e metabolismo de compostos tóxicos (NELSON, 2011; 2013).

Dentre esses sistemas enzimáticos, encontra-se uma das maiores famílias gênicas dos seres vivos, a superfamília de citocromo P450 (CYP) (NELSON, 2011). Enzimas CYPs participam da síntese de esteroides, eicosanoides, sais biliares, colesterol e biotransformação de drogas em animais, além da síntese de compostos secundários em plantas e fungos (CAPDEVILA; HARRIS; FALCK, 2002; GUENGERICH, 2008; HAMBERGER; BAK, 2013; LORBEEK; LEWINSKA; ROZMAN, 2012; SYED; MASHELE, 2014). Os processos desempenhados por essa superfamília permitiram a adaptação e sobrevivência dos organismos nos mais diversos ambientes, conferindo a essa superfamília um papel fundamental na diversidade e adaptação biológica (FEYEREISEN, 2011; NELSON, 2011; 2013; SYED; MASHELE, 2014).

A própria célula eucariótica teve sua história evolutiva marcada por um representante dessa superfamília: o citocromo P450 51 ou CYP51. Essa família de enzimas é responsável pela produção de um esteroide essencial para a composição da membrana eucariótica, o colesterol (LORBEEK; LEWINSKA; ROZMAN, 2012). Além de modular a

fluidez e permeabilidade da membrana celular, o colesterol está associado à formação de *lipid-raft*, que auxilia na organização das proteínas de membrana (LINGWOOD; SIMONS, 2010). A evolução da via de produção de esteróis foi tão impactante para a célula eucariótica que é considerada um processo chave da evolução dos eucariotos (DESMOND; GRIBALDO, 2009).

Há cerca de 450 milhões de anos, as plantas fizeram a transição do ambiente aquático para o ambiente terrestre, após a superação de um obstáculo: a desidratação (WATERS, 2003). Uma das mais importantes alterações que possibilitou o domínio do ambiente terrestre foi a impermeabilização de folhas e outras estruturas vegetais por uma camada de cutícula, uma camada hidrofóbica formada por ceras e cutina. A cutina é formada por ácidos graxos interesterificados, glicerol, fenilpropanoídeos e ácidos dicarboxílicos. Sua síntese é catalisada, em parte, por enzimas das famílias CYP77 e CYP86 (YEATS; ROSE, 2013). Além disso, as plantas traqueófitas podem crescer em altura e transportar água devido à presença de lignina. A lignina é formada por precursores derivados de fenilpropanoídeo que são sintetizados por três CYPs: CYP73, CYP84 e CYP98 (HAMBERGER; BAK, 2013).

Os animais também possuem inúmeros exemplos de adaptação relacionados à função dessa superfamília de enzimas. Os insetos, por exemplo, apresentam uma estratégia de resistência a inseticidas que envolve o aumento da expressão de enzimas CYPs específicas. A ação dessas enzimas permite a transformação dos inseticidas em moléculas mais hidrossolúveis que, em geral, tornam-se menos tóxicas para esses organismos (DAVID et al., 2013).

A ubiquidade e versatilidade dessas enzimas as tornam alvos de interesse em diversas áreas de estudo como Genética, Química, Evolução e Desenvolvimento de Fármacos. Nos tópicos a seguir, serão abordadas as principais características da superfamília CYP, com ênfase às características bioquímicas e aos integrantes da família citocromo P450 1 (CYP1).

1.2 ASPECTOS GERAIS DA SUPERFAMÍLIA CYP

1.2.1 Histórico e nomenclatura

Em 1958, observou-se que a fração microsossomal hepática de ratos possuía um máximo de absorção a 450 nm quando previamente tratadas com ditionito e em condição saturante de monóxido de carbono (KLINGENBERG, 1958). Posteriormente, esse fenômeno foi atribuído a heme proteínas, identificadas e nomeadas como citocromo P450 (OMURA; SATO, 1962; 1964).

Quase 60 anos depois da identificação inicial de citocromos P450, a presença de CYPs foi detectada em todos os domínios e reinos de seres vivos. Existem descritos mais de 12.000 representantes dessa superfamília (NELSON, 2011), sendo que dois deles são encontrados no genoma do mimivírus *Acanthamoeba polyphaga* (LAMB et al., 2009). Nos animais, existem mais de 4.000 membros da superfamília CYP, dos quais 1.461 são encontrados em vertebrados, 490 em invertebrados (excluindo-se os insetos) e mais de 2.000 representantes em insetos (NELSON, 2011).

Devido ao elevado número de genes CYPs encontrados nos genomas dos organismos, o grupo de genes dessa superfamília adquiriu seu próprio sufixo *oma*, os CYPomas, atribuição geralmente dada para meta-dados biológicos de larga escala (DEJONG; WILSON, 2014; FEYEREISEN, 2011).

Com o intuito de classificar o elevado número de representantes dessa superfamília, os CYPs são organizados em clãs, famílias e subfamílias. Os clãs incluem famílias que compartilham um único ancestral (NELSON, 1998), enquanto que as classificações de famílias e subfamílias são feitas primariamente com base na identidade das sequências de aminoácidos. Sequências da mesma família e subfamília compartilham no mínimo 40% e 55% de identidade, respectivamente. Os padrões evolutivos também são considerados, desse modo, famílias e subfamílias compartilham o mesmo ancestral comum. A curadoria das

sequências é feita pelo Dr. David Nelson e apresentadas na *Cytochrome P450 Homepage* (drnelson.uthsc.edu/CytochromeP450.html) (NELSON, 2006; 2009).

Cada sequência é nomeada como CYP (ou *CYP*, em itálico, no caso de um gene), a família é nomeada com um número arábico e a subfamília com uma letra. Sequências de uma mesma família são numeradas consecutivamente, na ordem que são oficialmente classificadas (DANIELSON, 2002). Portanto, pode-se afirmar que CYP1A1, CYP1A2 e CYP1B1 pertencem à mesma família e que CYP1A1 e CYP1A2 pertencem à mesma subfamília.

1.2.2 Função e processo catalítico

CYPs são enzimas heme-tioladas, que possuem em seu sítio ativo um grupo prostético heme constituído de um anel de protoporfirina IX com um átomo de Ferro (III). O ferro do grupo heme é coordenado por um átomo de enxofre de um resíduo de cisteína da apoenzima (**Figura 1A e B**) (MEUNIER; DE VISSER; SHAIK, 2004).

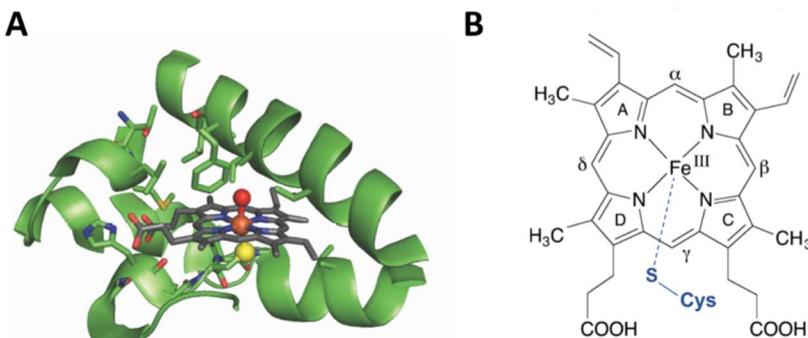
De acordo com a classificação internacional de enzimas, CYPs pertencem à classe de oxidoreduases e atuam como oxigenases do tipo monooxigenases (HANNEMANN et al., 2007). A reação básica catalisada pelo sistema CYP é a C-hidroxilação. Outras reações incluem oxigenação de heteroátomo, liberação de heteroátomo e formação de epóxido (**Figura 2**) (GUENGERICH; MACDONALD, 1984; ISIN; GUENGERICH, 2007).

Os CYPs localizam-se principalmente no retículo endoplasmático e mitocôndrias, sendo também encontrados em menor quantidade no citoplasma (DANIELSON, 2002).

Os integrantes da superfamília CYP possuem duas funções principais nos organismos: o metabolismo de xenobióticos, que é a denominação dos compostos exógenos ao organismo, e a produção de moléculas endógenas com funções variadas, como hormônios esteroides e sais biliares (DENISOV et al., 2005). Em humanos, foram identificados 57 membros da superfamília no genoma e entre os

substratos metabolizados por essas enzimas estão: os esteróis (substratos de 14 membros), os xenobióticos (de 16), as vitaminas (de sete) e os eicosanóides (de cinco), há ainda oito CYPs com função desconhecida (GUENGERICH; WATERMAN; EGLI, 2016).

Figura 1. Sítio ativo de citocromo P450. **A.** Sítio ativo típico de CYP com cadeia de aminoácidos que delimita o sítio ativo (verde), anel protoporfirínico (cinza), átomo de ferro (marrom), oxigênio (vermelho) e enxofre (amarelo). **B.** Grupo prostético composto pelo anel de protoporfirina IX e Ferro III. Linha pontilhada representa a coordenação entre o enxofre do resíduo de cisteína (Cys) e o ferro. Considerando que o grupo heme está distribuído nos eixos x e y do espaço cartesiano, em azul são representadas estruturas que estão distribuídas no eixo z.



Fonte: **A.** GROVES, 2015; **B.** SIEBERT, M.N., 2017, adaptado de MEUNIER; DE VISSER; SHAIK, 2004.

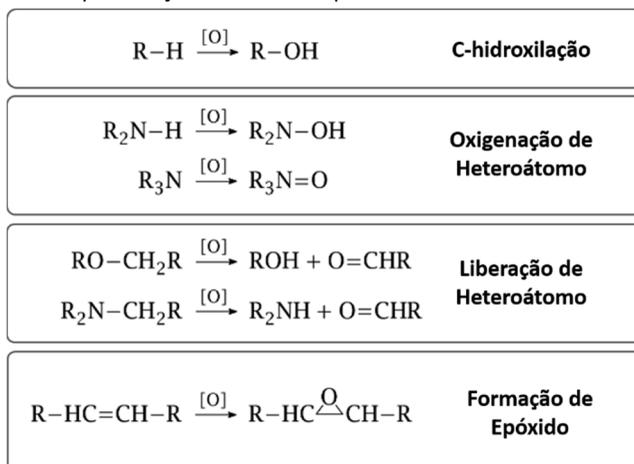
No metabolismo de xenobióticos, os CYPs catalisam a biotransformação de compostos apolares em compostos mais hidrofílicos e facilmente excretáveis pelo organismo. Esses metabólitos de xenobióticos podem ser diretamente excretados ou serem substratos de outras enzimas de biotransformação, que irão transformá-los em conjugados ainda mais hidrossolúveis para excreção (*Vide seção 1.7 para mais informações*) (OMIECINSKI et al., 2011).

Outra função é a biossíntese de moléculas sinais que controlam o desenvolvimento e a homeostase dos organismos, como os hormônios esteróides e vitaminas lipossolúveis (DENISOV et al., 2005). Vários CYPs atuam em tecidos e órgãos específicos na síntese de hormônios

esteroides por meio da catálise de reações que convertem o colesterol nos diferentes hormônios esteroides como testosterona, progesterona, aldosterona e cortisol (LUU-THE, 2013).

Em plantas, essas duas funções principais também são observadas, pois uma parte dessa superfamília está envolvida na degradação de herbicidas e a outra na biossíntese de hormônios e compostos secundários (HAMBERGER; BAK, 2013).

Figura 2. Principais reações catalisadas por CYPs.



Fonte: SIEBERT, M.N., 2017, adaptado de GUENGERICH; MACDONALD, 1984.

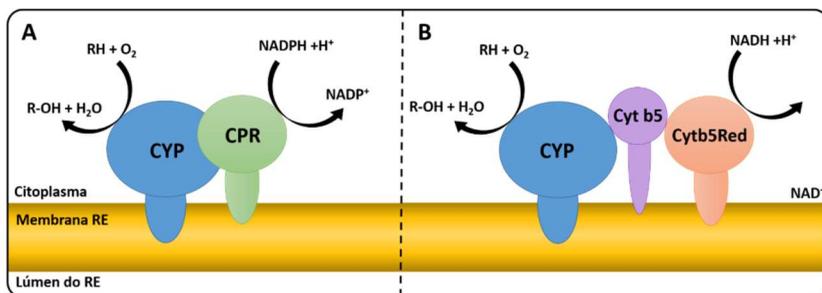
Nas reações catalisadas por essas enzimas, o oxigênio molecular é ativado no centro de ferro do heme. Durante o ciclo catalítico, CYP recebe dois prótons e dois elétrons e utiliza como substrato o oxigênio molecular e uma molécula lipofílica (S). No processo, o oxigênio molecular é dividido e um átomo de oxigênio é reduzido a água enquanto o segundo átomo é transferido ao substrato lipofílico, formando o produto (SO) (**Equação 1**) (MEUNIER; DE VISSER; SHAIK, 2004).

Equação 1:



Nos microsomas (vesículas formadas a partir da membrana do retículo endoplasmático após rompimento celular *in vitro*), os CYPs recebem os elétrons de enzimas redutases. Esses CYPs formam complexos com as enzimas NADPH-citocromo P450 redutase (CPR) e/ou NADH-citocromo b5 redutase (Cytb5Red) das quais recebem equivalentes redutores do β -nicotinamida adenina dinucleotídeo 2'fostato reduzido (NADPH) ou do β -nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido (NADH) por meio de um sistema de transporte de elétrons (KANDEL; LAMPE, 2014). A transferência de elétrons de NADH ou NADPH pelas redutases é realizada em duas etapas. Nesse processo, a enzima NADPH-citocromo P450 redutase pode transferir ambos elétrons de NADPH para CYP (**Figura 3A**) ou a enzima NADH-citocromo b5 redutase pode transferir ambos elétrons de NADH para CYP via citocromo b5 (Cytb5) (**Figura 3B**). Há ainda uma terceira possibilidade na transferência de elétrons, em que o citocromo b5 transfere o primeiro elétron de NADH- citocromo b5 redutase e o segundo de NADPH-Citocromo P450 redutase (HANNEMANN et al., 2007).

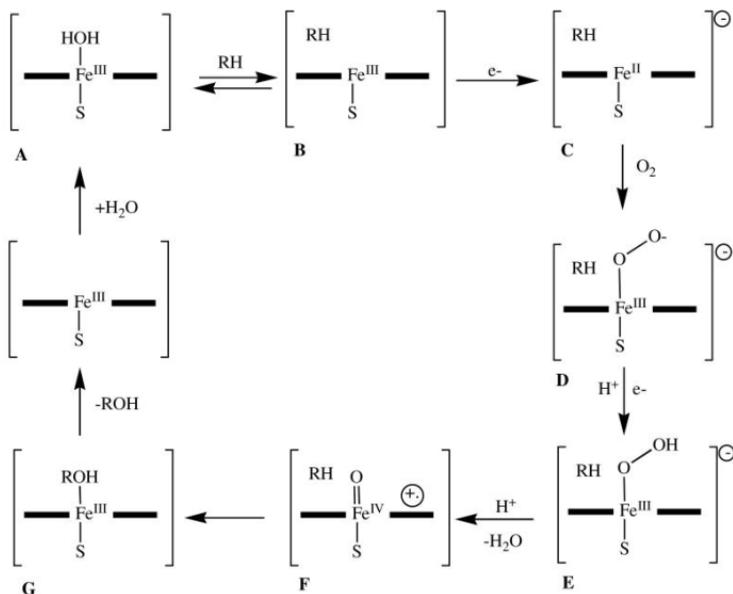
Figura 3. Mecanismo de transferência de elétrons que ocorre no complexo entre CYPs e enzimas redutases no retículo endoplasmático. **A.** CYP recebe equivalentes redutores de NADPH-citocromo P450 redutase (CPR). **B.** CYP recebe equivalentes redutores de NADH - Citocromo b5 redutase (CYtb5Red) via citocromo b5 (cytb5).



Fonte: SIEBERT, M.N., 2017, adaptado de HANNEMANN et al., 2007.

Em resumo, o ciclo catalítico dessas enzimas envolve várias etapas (**Figura 4**). Em repouso, a enzima se encontra no estado férrico (Fe^{+3}). Nesse estágio, há um ligante tiolado na região proximal do grupo heme e uma molécula de água na região distal (**A**). A ligação com o substrato (RH) desloca a água que estava no sítio ativo (**B**). A saída da molécula de água aumenta o potencial redox do ferro do grupo heme, o que permite a transferência de um elétron do NADPH ou NADH por uma redutase (CPR ou Cytb5Red). A enzima passa a ficar no estado ferroso (Fe^{+2}) e ligada ao substrato (**C**). Em seguida, a enzima se liga a uma molécula de oxigênio (O_2) e um complexo dioxoferroso é formado, que pode ser representado como um complexo superóxido férrico (**D**). Um segundo elétron é transferido, juntamente com um próton, gerando um ânion de peróxido férrico (**E**) (DENISOV et al., 2005; GUENGERICH; MACDONALD, 1984; ORTIZ DE MONTELLANO, 2010).

Figura 4. Ciclo catalítico de CYP para uma reação de C-hidroxilação. Uma explicação detalhada do ciclo está no texto.



Fonte: SIEBERT, M.N., 2017, adaptado ORTIZ DE MONTELLANO, 2010.

Esse intermediário é instável e se fragmenta após outra protonação, o que forma um intermediário ferril e água (**F**). O ferril, também conhecido como Composto I, reage com o substrato, oxidando o carbono alvo, para produzir metabólitos hidroxilados (**G**). Esses metabólitos são liberados do sítio ativo, que volta a ser ocupado por uma molécula de água e o ferro volta ao estado de oxidação férrico (DENISOV et al., 2005; GUENGERICH; MACDONALD, 1984; ORTIZ DE MONTELLANO, 2010).

1.2.3 Estrutura

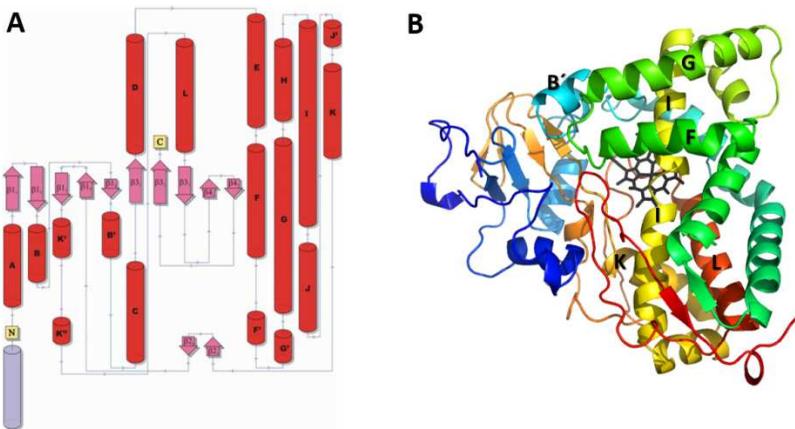
As proteínas CYPs possuem cerca de 500 resíduos de aminoácidos arranjados em 12 hélices α (nomeadas de A a L) e 4 folhas β (numeradas de 1 a 4) (**Figura 5A**) (OTYEPKA et al., 2007). O Banco de Dados de Proteínas (*Protein Data Bank* - PDB) (BERMAN et al., 2000) dispõe de 812 entradas de estruturas com o nome P450, sendo 10 estruturas de enzimas redutases (GUENGERICH; WATERMAN; EGLI, 2016), resolvidas principalmente por Cristalografia de Raio X e Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Apesar da identidade de sequência entre CYPs de diferentes famílias ser baixa em alguns casos, podendo ser inferior a 20%, essa variabilidade não impede a conservação da topografia e do enovelamento geral dessas enzimas (GRAHAM; PETERSON, 1999; HASEMANN et al., 1995; WERCK-REICHHART; FEYEREISEN, 2000).

Próximo ao grupo heme se encontra a região com a mais alta conservação estrutural, especialmente as hélices I e L. Por outro lado, as regiões envolvidas na especificidade do substrato são as que mais diferem, especialmente a hélice B' (**Figura 5B**) (POULOS; JOHNSON, 2015).

A conservação dessa região próxima ao grupo heme reflete seu envolvimento em um sistema comum de transferência de elétrons e prótons e a ativação do oxigênio. A região consenso mais característica é Phe-X-X-Gly-X-Arg-X-Cys-X-Gly, localizada na região proximal do grupo

heme, antes da hélice L. Essa região possui o resíduo de cisteína que atua como quinto ligante na coordenação do ferro do grupo heme, esse resíduo é extremamente conservado em CYPs. Além desse motivo conservado, na hélice K há o motivo Glu-X-X-Arg, também no lado proximal do grupo heme, possivelmente necessário para estabilizar a parte central da estrutura. Na parte central da hélice I, há outra região consenso, Ala/Gly-Gly-X-Asp/Glu-Thr-Thr/Ser, que corresponde ao sulco de transferência de prótons na região distal do grupo heme (WERCK-REICHHART; FEYEREISEN, 2000).

Figura 5. Estrutura geral de CYP. **A.** Topologia de CYP102 demonstrando as estruturas secundárias e o arranjo dos elementos secundários. **B.** Estrutura terciária de P450cam (PDB: 5CP4) com destaque para elementos importantes.



Fonte: A. OTYEPKA et al., 2007; B. SIEBERT, M.N., 2017, baseado em POULOS; JOHNSON, 2015, imagem gerada com o programa PyMOL 1.8.2.3.

1.3 A FAMÍLIA CITOCROMO P450 1

No final da década de 1960, foi demonstrado que intermediários reativos de benzo[a]pireno (BaP), um hidrocarboneto policíclico aromático (HPA), gerados por incubação de BaP e microsossomas, ligavam-se covalentemente ao DNA e proteínas (GROVER; SIMS, 1968). Esse experimento revelou que, durante a biotransformação de HPAs, pode

ocorrer a produção de metabólitos oxigenados reativos, capazes de ligarem-se covalentemente ao DNA e proteínas. Além disso, essa pesquisa auxiliou no estabelecimento da relação causal entre a exposição aos HPAs e a origem de alguns cânceres. Anos mais tarde, demonstrou-se que a biotransformação ou a ativação de HPAs era realizada por enzimas integrantes da família citocromo P450 1 (CYP1) (GUENGERICH; SHIMADA, 1991; SHIMADA et al., 1996).

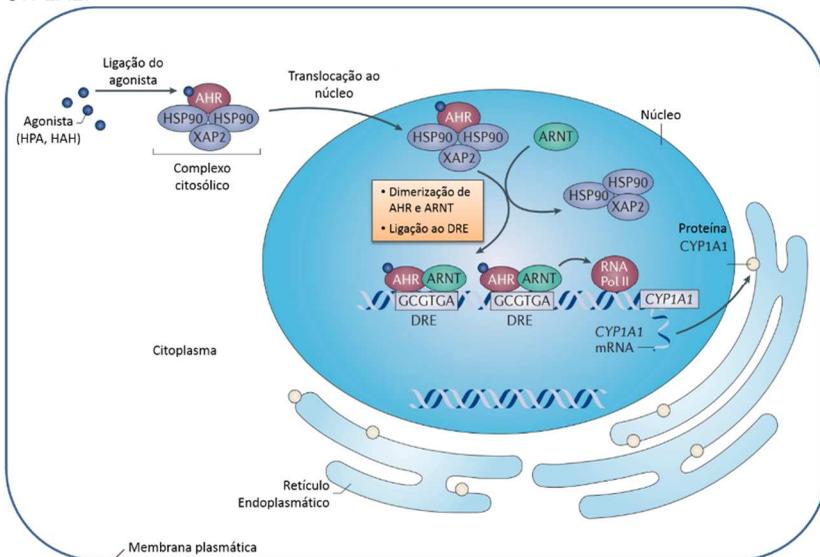
Enzimas da família CYP1 metabolizam tanto compostos endógenos como exógenos. Entre os substratos metabolizados por essas enzimas estão o estradiol (LEE et al., 2003), eicosanoides (CAPDEVILA; HARRIS; FALCK, 2002), HPAs, arilaminas, aminas heterocíclicas (MCMANUS et al., 1990) e hidrocarbonetos aromáticos halogenados (HAHs) (HU; BUNCE, 1999; INUI et al., 2014).

Muitos dos ligantes de CYP1, como HPAs e HAHs, também induzem a expressão de genes *CYP1* por meio da ligação e ativação do receptor de hidrocarboneto aromático (*Aryl-hydrocarbon Receptor* - AHR) (HAHN, 2002; MURRAY; PATTERSON; PERDEW, 2014).

Esse processo de regulação da transcrição gênica por ligantes de CYP1 inicia quando agonistas do AHR difundem pela membrana plasmática e encontram, no citoplasma da célula, o AHR em sua forma inativa, em complexo com outras proteínas como a proteína de choque térmico 90 (HSP90) e a proteína 2 associada a proteína co-chaperona X (*co-chaperone protein X-associated protein 2* - XAP2) (**Figura 6**). A interação entre ligante e AHR induz uma mudança conformacional nesse receptor, que é translocado para o núcleo, onde o complexo do AHR com as proteínas citoplasmáticas é desfeito e o receptor se associa com o translocador nuclear de AHR (*Aryl-hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator* – ARNT). O complexo ligante:AHR:ARNT interage com elementos responsivos no DNA. Os principais elementos responsivos de ligação ao AHR são o elemento responsivo à dioxina (*dioxin-responsive element* - DRE) e o elemento responsivo a xenobiótico (*xenobiotic-responsive element*- XRE), que consistem em sequências de nucleotídeos específicas, localizadas nas regiões regulatórias de genes alvos, como

CYP1. Após a interação desse complexo proteico com a região regulatória dos genes alvo, ocorre o recrutamento de co-ativadores e fatores de transcrição, culminando com o aumento na taxa de transcrição gênica (DENISON et al., 2011; OKEY, 2007).

Figura 6. Mecanismo de ação do AHR em uma célula eucariótica. O agonista se liga ao receptor AHR no citoplasma da célula e esse complexo é translocado ao núcleo, onde o AHR forma um dímero com o ARNT. Esse heterodímero reconhece elementos responsivos na região regulatório do gene *CYP1A1*, o que culmina com a indução da transcrição desse gene. O aumento do nível de transcritos de *CYP1A1* pode causar um aumento na expressão da proteína *CYP1A1*.



Fonte: SIEBERT, M.N., 2017, adaptado de MURRAY; PATTERSON; PERDEW, 2014.

O aumento da transcrição gênica, desencadeada pela ativação do AHR, pode causar um aumento da síntese de enzimas *CYP1* e um aumento na taxa de biotransformação ou bioativação de compostos por essas enzimas (DENISON et al., 2002; HAHN, 2002).

Em vertebrados, essa família gênica possui quatro subfamílias: *CYP1A*, *CYP1B*, *CYP1C* e *CYP1D* (GOLDSTONE et al., 2009), que

possivelmente se originaram de um único ancestral comum (GOLDSTONE et al., 2007).

Devido aos eventos de duplicação gênica e perda de genes, cada *taxa* de vertebrados possui composições diferentes de genes dessa família. As subfamílias *CYP1A* e *1B* são encontradas em todos os grupos de vertebrados, enquanto que genes *CYP1C* são ausentes em mamíferos e *CYP1D* são ausentes em aves (GOLDSTONE et al., 2007; 2009; JÖNSSON et al., 2011a; 2011b; UNO et al., 2011).

O número de genes de cada subfamília presente em cada classe de vertebrado também é variável, por exemplo, dois *CYP1C* são encontrados em peixes, enquanto apenas um *CYP1C* está presente em aves e anfíbios (GOLDSTONE et al., 2007). Além disso, quantidades diferentes de genes de cada subfamília podem ser encontradas inclusive entre espécies de um mesmo gênero, como o *CYP1A*, que é representado por dois genes no anfíbio tetraploide *Xenopus laevis* e apenas um gene no diploide *Xenopus tropicalis* (IWAMOTO et al., 2012; JÖNSSON et al., 2011a).

Esta variedade de representação de genes da família *CYP1* em vertebrados reflete a complexidade evolutiva característica da superfamília CYP. A diversidade gênica possui reflexo no perfil catalítico apresentado por essa família e embora exista sobreposição de substratos, as enzimas possuem especificidades catalíticas distintas (SHIMADA et al., 1997; STEGEMAN et al., 2015).

É possível que a família *CYP1* tenha uma origem recente nos animais, surgindo, provavelmente, em organismos deuterostômios basais (GOLDSTONE et al., 2007). Essa origem recente é evidenciada pela ausência de genes dessa família em espécies de protostômios. Entretanto, vários estudos demonstram a presença de genes semelhantes a *CYP1* (*CYP1-like*) em espécies de protostômios (DEJONG; WILSON, 2014; JENNY et al., 2016; ZANETTE et al., 2010) baseados na similaridade com os genes de vertebrados. Até o momento, nenhuma relação evolutiva foi estabelecida entre estes genes de protostômios e àqueles de deuterostômios.

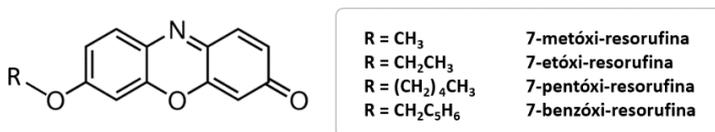
1.4 A ATIVIDADE ENZIMÁTICA 7-ETÓXI-RESORUFINA *O*-DEETILASE

Existem vários métodos de quantificação *in vitro* da atividade enzimática de CYP1. A diferença primária entre esses métodos é o substrato utilizado, que é metabolizado em velocidades variadas pelas diferentes enzimas que compõem a família CYP1. Esses métodos de quantificação de atividade enzimática podem ser utilizados como ferramentas experimentais na elucidação de diversas questões dessa família como: caracterização da isoforma de CYP que catalisa a ativação ou biotransformação de um composto específico, na análise da cinética enzimática de uma reação catalisada por CYP ou no auxílio da descoberta do mecanismo de interação entre xenobióticos e enzimas CYP (CHANG; WAXMAN, 2006).

Devido, principalmente, às diferenças estruturais, sobretudo àquelas localizadas nos sítios ativos, cada enzima da família CYP1 possui afinidade e velocidade de catálise diferentes para cada substrato (LEWIS; MACKENZIE; MINERS, 2007; LIU et al., 2004). Por exemplo, em humanos, as atividades fenacetina *O*-deetilase e cafeína *N*3-demetilase são utilizadas, preferencialmente, para quantificação de enzimas CYP1A1 e CYP1A2; a atividade 17-β estradiol 4-hidroxilase é utilizada para CYP1B1 e a atividade 7-etóxi-resorufina *O*-deetilase (EROD) é utilizada, predominantemente, para quantificação das enzimas CYP1A1 e CYP1B1 (CHANG; WAXMAN, 2006; SHIMADA et al., 1997).

As atividades alcóxi-resorufinas *O*-deetilases (AROD) são comumente utilizadas na caracterização enzimática de CYP1 e incluem substratos de alquil ou benzil éteres de resorufina (**Figura 7**).

Figura 7. Substratos de resorufina.



Fonte: SIEBERT, M.N., 2017, adaptado de STEGEMAN et al., 2015.

Quando o grupo alquil é um etil, o substrato é a 7-etóxi-resorufina (7-ER) e a atividade catalítica é nomeada 7-etóxi-resorufina *O*-deetilase (EROD) (SHIMADA et al., 1997; STEGEMAN et al., 2015). Em humanos, todas as enzimas CYP1 possuem atividade EROD, entretanto, a eficiência catalítica de CYP1A1 é maior, seguida de CYP1B1 e CYP1A2, respectivamente (SHIMADA et al., 1997). Os métodos de quantificação de atividades AROD possuem o mesmo princípio: as enzimas CYP1 catalisam a dealquilação do substrato, formando como produtos um aldeído e resorufina. O aparecimento da resorufina como produto fluorescente (Ex 560/Em 586) é monitorado durante o ensaio (BURKE; MAYER, 1974).

1.5 GENES *CYP1-LIKE* E ATIVIDADES ENZIMÁTICAS REFERENTES A *CYP1* EM PROTOSTÔMIOS

A presença de genes *CYP1-like* foi observada em espécies pertencentes a diversos filos de animais não deuterostômios. A anêmona do mar *Nematostella vectensis* (Filo Cnidaria) possui 48% de seus genes *CYPs* pertencentes ao Clã 2, do qual faz parte a família *CYP1* (GOLDSTONE et al., 2006). Na análise do CYPoma de *Capitella teleta* (Filo Annelida) foram encontrados cinco genes *CYP1-like* (DEJONG; WILSON, 2014).

Em moluscos, a presença de genes *CYP1-like* foi observada em algumas espécies: dois genes *CYP1-like* nos mexilhões *Mytilus edulis* e um gene em *Mytilus californianus* foram reportados (ZANETTE et al., 2013), o transcriptoma de brânquias e glândula digestiva de *Crassostrea brasiliiana* anotou duas sequências *CYP1-like* (LÜCHMANN et al., 2015), o transcriptoma de brânquias e glândula digestiva de *Crassostrea virginica* anotou 3 sequências *CYP1-like* (JENNY et al., 2016) e o genoma de *Crassostrea gigas* apresentou 12 sequências anotadas como *CYP1-like* (ZHANG et al., 2012).

O genoma do ouriço-do-mar *Strongylocentrotus purpuratus* (Filo Echinodermata), um animal deuterostômio, possui 11 genes *CYP1-like*.

Entretanto, a relação filogenética desses genes com os *CYP1* dos cordados não foi estabelecida (GOLDSTONE et al., 2007).

Apesar da presença de genes *CYP1-like* em protostômios, não é possível assumir que esses genes sejam *CYP1* basais, pois a presença de *CYP1* além dos deuterostômios não é comprovada (GOLDSTONE et al., 2007). Além disso, assumir esses genes como pertencentes à *CYP1* seria errôneo de acordo com nomenclatura sugerida para CYPs (NELSON, 2006), que apesar de assumir relações evolutivas em sua classificação, considera o mínimo de 40% de identidade entre duas sequências como prioritário para considerá-las pertencentes à mesma família.

Além da presença de *CYP1-like*, diversos grupos de invertebrados possuem atividade EROD como Cnidaria, Annelida, Mollusca e Arthropoda (CHEAH et al., 1995; HARITOS; FRENCH; AHOKAS, 1994; HEFFERNAN; WINSTON, 1998; REWITZ et al., 2006). Além da EROD, outras atividades enzimáticas relacionadas à família CYP1 de vertebrados foram observadas em invertebrados, como: benzo[a]pireno hidroxilase (BPH) em Cnidaria, Annelida, Mollusca, Arthropoda (SCHLENK; BUHLER, 1989; SOLÉ; LIVINGSTONE, 2005) e etóxi-cumarina O-deetilase (ECOD) em Arthropoda e Mollusca (REWITZ et al., 2006). Em ostras *C. gigas*, apesar da atividade BPH ter sido identificada, não foi observada atividade EROD (SCHLENK; BUHLER, 1989).

Embora existam vários genes *CYP1-like* no genoma e transcriptoma de ostras do gênero *Crassostrea* (JENNY et al., 2016; LÜCHMANN et al., 2015; ZHANG et al., 2012) e atividade EROD em várias espécies de moluscos, a atividade EROD não foi detectada em ostras desse gênero (SCHLENK; BUHLER, 1989).

A presença de genes *CYP1-like* e atividade EROD em protostômios pode representar uma convergência evolutiva ou pode existir uma relação filogenética entre esses genes encontrados em protostômios e a família CYP1 de deuterostômios.

1.6 HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS

Os HPAs compõem um grupo de moléculas formado apenas por átomos de carbono e hidrogênio. São constituídos por dois ou mais anéis aromáticos fusionados de maneira linear, agrupados ou em arranjos angulares (**Figura 8**) (DOUBEN, 2003). Os HPAs abrangem moléculas que estão em estado semi-volátil a temperatura ambiente até moléculas com elevados pontos de ebulição (DYBING et al., 2010). Esses compostos apresentam baixa solubilidade em água, sendo que essa solubilidade diminui com o aumento do número de anéis aromáticos (SKUPIŃSKA; MISIEWICZ; KASPRZYCKA-GUTTMAN, 2004).

Os HPAs são uma das classes de moléculas constituintes do petróleo. São utilizados em combustíveis, asfalto, esmaltes, tintas, plásticos e participam em diversos processos industriais como na produção de pesticidas, pigmentos e fármacos (ABDEL-SHAFY; MANSOUR, 2015).

O petróleo e seus derivados possuem inúmeras fontes no ambiente aquático, sendo as principais delas: 1. Afloramentos de reservas naturais; 2. Extração de petróleo e atividades relacionadas; 3. Transporte de petróleo e 4. Consumo de petróleo, que inclui as fontes urbanas (NRC, 2003).

Acidentes envolvendo derramamento de petróleo, como o que ocorreu em 2010 pela *Deepwater Horizon* no Golfo do México, com o vazamento de mais de 780 mil m³ de petróleo, representam uma grande entrada desses contaminantes no ambiente em um curto intervalo de tempo (MCNUTT et al., 2012). Entretanto, em escala global, acidentes que abrangem desde a extração ao consumo de petróleo representam menos de 9% da contaminação aquática por HPAs (NRC, 2003).

A urbanização e a dinâmica das águas dos ambientes costeiros podem influenciar muito na concentração de HPAs nessas regiões. Os HPAs são mais concentrados em ambientes estuarinos e costeiros próximos a grandes centros urbanos, devido às águas provenientes das bacias hidrográficas e a precipitação de partículas com concentração

mais alta de HPAs. Nesses ambientes, as principais fontes de HPAs derivam da lixiviação urbana, efluentes urbanos, emissões industriais e deposição atmosférica. Além disso, dependendo da região, vazamentos durante o transporte e a produção de combustíveis fósseis também contribuem como fonte de entrada de HPAs (LATIMER; ZHENG, 2003).

Uma vez no ambiente aquático, os HPAs tendem a adsorver rapidamente a materiais em suspensão e sedimento, tornando-se biodisponíveis para peixes e outros organismos aquáticos (BAUMARD et al., 1998; BROMAN et al., 1990).

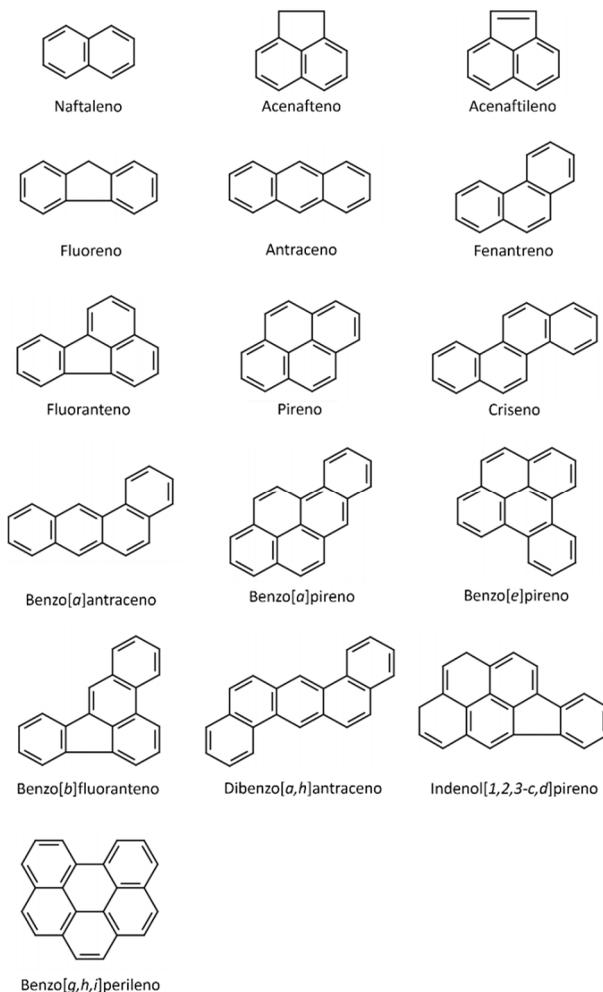
Alguns HPAs possuem efeito genotóxico, carcinogênico, teratogênico, imunotóxico e de desregulação endócrina em mamíferos (BURCHIEL; LUSTER, 2001; DYBING et al., 2010; JARVIS et al., 2013; LUPO et al., 2012; ZHANG et al., 2016b) e em organismos aquáticos (MITCHELMORE; CHIPMAN, 1998; PÉREZ-CADAHÍA et al., 2004; REYNAUD; DESCHAUX, 2006; WESSEL et al., 2007). Estudos epidemiológicos com populações humanas mostram o risco de câncer devido à exposição ambiental e ocupacional aos HPAs (BOFFETTA; JOURENKOVA; GUSTAVSSON, 1997; NIEHOFF et al., 2017; ZHANG et al., 2016a) e o estabelecimento da relação da exposição aos HPAs com várias formas de câncer, como câncer de pele, pulmão e bexiga (BOFFETTA; JOURENKOVA; GUSTAVSSON, 1997).

Devido à sua abundância e ao seu potencial tóxico, essa classe de contaminantes é considerada de alta prioridade na regulação de contaminação ambiental e na análise de risco ecológico (EPA, 2008). Dentre todos os HPAs, a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (*Environmental Protection Agency* - EPA) selecionou 16 como poluentes prioritários (**Figura 8**), devido à sua abundância e por serem suspeitos de serem mais tóxicos (KEITH, 2014; RAVINDRA; SOKHI; VAN GRIEKEN, 2008).

Dentre os 16 HPAs considerados prioritários pela EPA estão o pireno e o fluoreno. Esses compostos estão entre os HPAs mais abundantes encontrados no petróleo (KERR et al., 1999) e em locais contaminados (VALAVANIDIS et al., 2008; XU et al., 2007). De acordo

com a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (*International Agency for Research on Cancer - IARC*), ambos não são classificados quanto as suas propriedades carcinogênicas (JRC- EC, 2011).

Figura 8. Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos considerados prioritários pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA).



Fonte: SIEBERT, M.N., 2017, adaptado de LIMA; FARRINGTON; REDDY, 2005.

1.6.1 Pireno

O pireno é um HPA constituído de quatro anéis aromáticos. A concentração de pireno varia muito entre os petróleos de diferentes origens, sendo ausente em alguns (KERR et al., 1999) ou até o quinto mais abundante entre os 16 HPAs prioritários (AAS et al., 2000). Além de ser utilizado em misturas com outros HPAs, como na gasolina, o pireno é utilizado na indústria principalmente na manufatura de pigmentos (ABDEL-SHAFY; MANSOUR, 2015).

A concentração de pireno em águas próximas a regiões de derramamentos de petróleo, afloramentos naturais de petróleo ou de intensa atividade industrial varia de 0,03 a 2 µg/L (DOONG; LIN, 2004; GONZÁLEZ et al., 2006; GUO et al., 2007; REQUEJO; BOEHM, 1985; VALAVANIDIS et al., 2008). Entretanto, concentrações ambientais de até 670 µg/L foram relatadas em ambiente marinho (ANYAKORA et al., 2005). De acordo com as recomendações da EPA, os valores de referência para a concentração de pireno em caso de contaminação aguda na coluna d'água é de 21 µg/L (EPA, 2015) e em caso de contaminação crônica de 10,1 µg/L (EPA, 2010).

Em peixes, os efeitos atribuídos à exposição ao pireno em concentrações que variam de 10 a 200 µg/L são estresse oxidativo hepático (SUN et al., 2008), anemia, defeitos vasculares periféricos, morte neuronal durante o desenvolvimento embrionário (INCARDONA; COLLIER; SCHOLZ, 2004), redução de parâmetros fisiológicos, como glicose sanguínea e hormônios da tireoide (SHIRDEL et al., 2016), redução da performance natatória (OLIVEIRA; GRAVATO; GUILHERMINO, 2012) e mortalidade (OLIVEIRA et al., 2013). Em invertebrados, a exposição ao pireno foi associada com redução da produção e eclosão de ovos em copépodos *Calanus finmarchicus* (JENSEN; NIELSEN; DAHLLÖF, 2008), redução da prole no oligoqueta *Limnodrilus hoffmeisteri* (LOTUFO; FLEEGER, 1996), redução da atividade alimentar e da estabilidade lisossomal em mexilhões *Mytillus* sp. (OKAY

et al., 2006) e diminuição da resposta imune e estresse oxidativo em ostras *Pinctada martensii* (XIE et al., 2017).

1.6.2 Fluoreno

Dentre os HPAs prioritários, o fluoreno é o terceiro mais abundante na maioria dos petróleos, sendo apenas encontrado em menor concentração que o naftaleno e o fenantreno (KERR et al., 1999). Entretanto, em alguns petróleos o fluoreno é o segundo HPA mais abundante (AAS et al., 2000; BADO-NILLES et al., 2008). Além de ser utilizado em misturas com outros HPAs, esse composto é utilizado na produção de fármacos, pigmentos, corantes, pesticidas e plásticos (ABDEL-SHAFFY; MANSOUR, 2015).

A concentração de fluoreno em regiões de derramamento de petróleo, afloramentos naturais de petróleo ou de intensa atividade industrial e densidade urbana geralmente varia entre 0,05 a 0,604 µg/L (DOONG; LIN, 2004; GONZÁLEZ et al., 2006; GUO et al., 2007; REQUEJO; BOEHM, 1985; VALAVANIDIS et al., 2008). Entretanto, pode chegar a mais de 300 µg/L em alguns ambientes marinhos (ANYAKORA et al., 2005).

De acordo com as recomendações da EPA, as concentrações de fluoreno na água em caso de contaminação aguda devem ser de até 81,8 µg/L (EPA, 2015), e em caso de contaminação crônica de 39,3 µg/L (EPA, 2010).

A exposição ao fluoreno causa efeitos na reprodução de *Daphnia magna* (FINGER et al., 1985). Em peixes, desencadeia um aumento na hemólise de eritrócitos em concentrações crônicas (SINAEI, 2013), aumento do cortisol plasmático (THOMAS; WOFFORD; NEFF, 1981), letargia, redução da atividade de nado (GONÇALVES et al., 2008), redução da sobrevivência, problemas na atividade alimentar e vulnerabilidade à predação (FINGER et al., 1985). Além disso, a exposição ao fluoreno apresenta efeitos em nível populacional e de comunidade em organismos aquáticos (BOYLE et al., 1985).

Há um interesse crescente na compreensão dos efeitos dos HPAs nos ecossistemas aquáticos e diversos trabalhos mostram efeitos dos HPAs em organismos nesses ecossistemas (MITCHELMORE; CHIPMAN, 1998; PÉREZ-CADAHÍA et al., 2004; REYNAUD; DESCHAUX, 2006; WESSEL et al., 2007). Entretanto, estudos abordando especificamente o efeito de cada HPA são escassos e, em geral, se referem aos efeitos do BaP (GERGER; WEBER, 2015; WILLS et al., 2010). Os efeitos da exposição ao pireno e fluoreno isoladamente são pouco caracterizados em moluscos (BADO-NILLES et al., 2008; GAGNAIRE et al., 2006). Apesar da contaminação do ambiente aquático por HPAs ocorrer por misturas desses compostos, o estudo de cada um desses contaminantes separadamente nos permite elucidar mecanismos de ação dessas moléculas e prever efeitos em nível de organismo ou até populacional.

1.7 SISTEMA DE BIOTRANSFORMAÇÃO

Alguns organismos conseguem sobreviver em locais contaminados por HPAs e outros xenobióticos no ambiente aquático, por apresentarem habilidade de metabolizar e eliminar esses compostos. Essa habilidade é conferida, em parte, por uma série de enzimas do sistema de biotransformação ou enzimas do metabolismo de drogas (BRODIE; GILLETTE; LA DU, 1958; IYANAGI, 2007; MEYER, 1996; REYNAUD; RAVETON; RAVANEL, 2008).

Por serem geralmente lipofílicos, os xenobióticos são difíceis de serem excretados pelos organismos, assim, as enzimas do sistema de biotransformação atuam transformando esses compostos em moléculas mais hidrofílicas e, portanto, mais facilmente excretáveis (**Figura 9**) (IYANAGI, 2007). As enzimas desse sistema são separadas em fase I e II, de acordo com as principais alterações químicas geradas pelas enzimas nos compostos; ainda, há a fase III, que inclui proteínas transportadoras (OMIECINSKI et al., 2011).

As enzimas de fase I compreendem, principalmente, as enzimas microsossomais da superfamília CYP, cuja função e processo catalítico

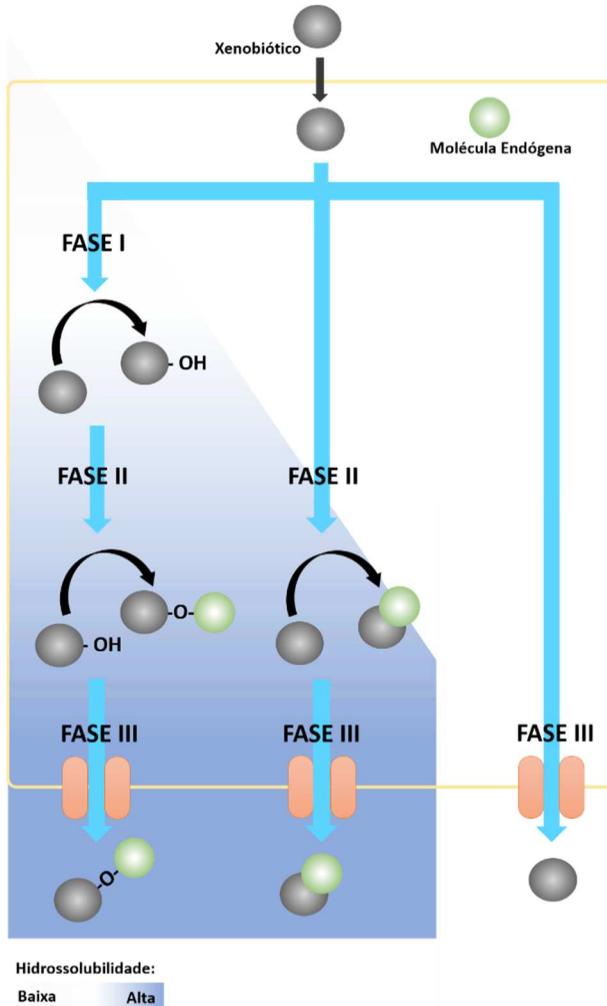
estão explicados no tópico 1.2.2 deste documento. Além de CYPs, outras enzimas como flavinas monooxigenases (FMO), hidroxilases e amina oxidases também catalisam reações de oxidação de certos grupos funcionais (STROLIN BENEDETTI, 2011). As enzimas de fase I catalisam reações de oxidação, redução e hidrólise. Assim, um grupo polar, como OH, geralmente é introduzido no substrato apolar (IYANAGI, 2007).

A superfamília CYP é responsável pelo metabolismo de cerca de 75% dos xenobióticos em mamíferos (GUENGERICH; WATERMAN; EGLI, 2016). Nesse grupo de animais, as famílias CYP1, CYP2 e CYP3 são as principais responsáveis pelo metabolismo desses compostos (NEBERT; RUSSELL, 2002). A família CYP1 metaboliza HPAs e HAHs (INUI et al., 2014; MCMANUS et al., 1990) (*Vide tópico 1.3*). Entretanto, cerca de 90% dos xenobióticos são metabolizados por membros das famílias CYP2 e CYP3, o que abrange substratos quimicamente e estruturalmente diversos, como vários fármacos e drogas (WILLIAMS et al., 2004).

Apesar da ação dessas enzimas não gerarem alterações significativas na massa molecular e hidrossolubilidade dos xenobióticos metabolizados, a ação das enzimas de fase I geram ou expõem regiões intramoleculares nesses compostos, que permitem a ação das enzimas de fase II (ZAMEK-GLISZCZYNSKI et al., 2006).

As enzimas de fase II são, geralmente, transferases que catalisam reações de conjugação. Nessas reações, um substrato endógeno com grupos funcionais polares é introduzido diretamente ao xenobiótico nativo ou no metabólito gerado pela atuação das enzimas de fase I (IYANAGI, 2007; OMIECINSKI et al., 2011). A ação das enzimas de fase II gera produtos com massa molecular e hidrossolubilidade consideravelmente maiores do que os metabólitos de fase I (ZAMEK-GLISZCZYNSKI et al., 2006).

Figura 9. Sistema de biotransformação de xenobióticos. Após entrar na célula, o xenobiótico pode ser metabolizado por enzimas de fase I e II do sistema de biotransformação ou ser bombeado para fora da célula pelas proteínas de fase III. As enzimas de fase I se caracterizam por realizarem reações de oxidação, enquanto as enzimas de fase II realizam reações de conjugação do metabólito ou do xenobiótico nativo a substratos endógenos hidrofílicos. A medida que são metabolizadas pelas enzimas de biotransformação, a hidrossolubilidade dos compostos aumenta.



Fonte: SIEBERT, M. N. 2017.

Entre as enzimas de fase II estão as sulfotransferases (SULTs) e glutationa S-transferases (GSTs) (OMIECINSKI et al., 2011). As enzimas da família SULT conjugam o substrato sulfonato (SO_3^-) a partir do 3'-fosfoadenosina-5'-fosfosulfato (PAPS). Há duas classes de SULT, uma associada à membrana do complexo de Golgi e responsável pela sulfatação de biomoléculas, como proteínas e glicosaminoglicanas. A outra classe de SULT é citosólica e responsável pelo metabolismo de xenobióticos e pequenas moléculas endógenas como esteroides, neurotransmissores e ácidos biliares (GAMAGE et al., 2006).

As enzimas GSTs conjugam o tripeptídeo endógeno glutationa reduzida (GSH) a substratos eletrofilicos, como os produtos das enzimas de fase I. As GST podem ser citosólicas ou associadas a membranas. As GSTs citosólicas são distribuídas em sete classes: alfa, pi, mu, teta, ômega, zeta e sigma (BOARD; MENON, 2013), enquanto que as associadas a membranas são microssomais (GSTmic) ou mitocondriais (HIGGINS; HAYES, 2011). Além dessas duas famílias de enzimas de fase II, a família UDP-gluconosiltransferase (UDPGT) é também considerada uma das mais importantes famílias dessa fase (ROWLAND; MINERS; MACKENZIE, 2013).

A terceira fase do sistema de biotransformação compreende proteínas que realizam o processo de resistência a multi-xenobióticos (MXR) em organismos aquáticos (BRANKO, 1995). Entre as proteínas envolvidas nesse mecanismo, estão as glicoproteínas P (P-gp) que pertencem à superfamília de proteínas transportadoras de membrana *ATP-binding Cassete* (ABC) e transportam para fora das células os xenobióticos em sua forma parental ou seus respectivos produtos (BARD, 2000). Esse transporte é realizado contra o gradiente de concentração desses compostos, associado à hidrólise de ATP (AL-SHAWI; SENIOR, 1993; JIN et al., 2012). Dessa forma, evita-se o acúmulo do xenobiótico e/ou seus metabólitos no interior das células. O mecanismo MXR é análogo ao mecanismo de resistência a multidrogas (MDR), identificado principalmente em algumas linhagens de células

tumorais que apresentam resistência a quimioterápicos em mamíferos (KRISHNA; MAYER, 2000).

A capacidade do sistema de biotransformação de xenobióticos em moluscos bivalves foi considerada pequena ou inexistente durante anos, em parte, devido à dificuldade em detectar a atividade de enzimas de biotransformação e ao fato desses organismos bioacumularem altas quantidades desses compostos (BAUSSANT et al., 2001; SCHLENK; BUHLER, 1989; SORIANO et al., 2006). Entretanto, vários estudos têm demonstrado o potencial de biotransformação nesses organismos (RUST et al., 2004), por exemplo, a detecção das atividades das enzimas de superfamília CYP e flavina-monooxigenases (REWITZ et al., 2006; SCHLENK; BUHLER, 1989; SIEBERT et al., 2017a; SOLÉ; LIVINGSTONE, 2005) e a atividade UDPGT e GST (LIVINGSTONE, 1998).

Somado a evidências bioquímicas, estudos de genoma e transcriptoma mostram a presença de diversos genes do sistema de biotransformação nesses organismos. Por exemplo, o genoma da ostra *C. gigas* possui 43 genes *CYP* (ZHANG et al., 2012), enquanto que o transcriptoma de *C. brasiliana* apresenta 10 genes *GST* (LÜCHMANN et al., 2015). Assim, as evidências bioquímicas e moleculares sugerem a existência de um sistema de biotransformação ativo em moluscos.

1.8 BIOMARCADORES DA CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL

Devido à constante entrada de HPAs no ambiente aquático, de origem natural ou antropogênica, somado aos efeitos deletérios causados por esses compostos nos organismos, existe uma preocupação de monitorar a presença desses contaminantes nos ecossistemas aquáticos. Esse monitoramento é realizado, em geral, por meio de programas de biomonitoramento que detectam a presença de contaminantes na água e bioacumulados nos tecidos de organismos aquáticos (THEBAULT; BAENA, 2007; SCHÖNE; KRAUSE, 2016).

Outra abordagem utilizada pelos programas de biomonitoramento é a análise de biomarcadores, que permite uma

detecção precoce da exposição e dos efeitos dos contaminantes nos ecossistemas aquáticos (MARTÍNEZ-GOMÉZ et al., 2015; VIARENGO et al., 2007). Essa análise é baseada no fato de que contaminantes ambientais, quando em contato com os organismos, podem causar alterações em diversos níveis de organização biológica desses seres (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003) e essas alterações podem ser monitoradas e correlacionadas com a presença de determinados contaminantes no ambiente (EDGE et al., 2014; ZHOU et al., 2008).

Biomarcadores são definidos como alterações biológicas que ocorrem em um indivíduo quando exposto a contaminantes químicos, sendo que essas alterações podem ser em diferentes níveis (moleculares, bioquímicos e/ou fisiológicas) (WALKER et al., 2012).

Em razão dos CYP1 apresentarem a atividade induzida por seus substratos (via AHR), essas enzimas são biomarcadores clássicos de exposição à agonistas de AHR, como os HPAs (CHAHIN et al., 2013; NOGUEIRA et al., 2011; SCHLEZINGER; STEGEMAN, 2001). Nesse contexto, a atividade EROD tem sido utilizada como biomarcador da contaminação ambiental por HPAs e outros contaminantes em diversos organismos, como peixes e moluscos (BINELLI et al., 2006; GAGNON; RAWSON, 2017; SEABRA-PEREIRA et al., 2011).

Atividades de outras enzimas de biotransformação são estudadas como biomarcadores bioquímicos da exposição aos HPAs em organismos aquáticos, como a atividade da enzima GST (LU; WANG; ZHU, 2008; LUCHMANN et al., 2011; NAHRGANG et al., 2010).

Além de biomarcadores bioquímicos, variações em níveis de transcritos de genes de biotransformação são estudadas como biomarcadores moleculares da contaminação de HPAs em peixes (MATTOS et al., 2010; NANHGANG et al 2010) e em bivalves (BOUTET; TANGUY; MORAGA, 2004a; 2004b; GUO et al., 2017; JENNY et al., 2016; WAN et al., 2009;). Em bivalves, a técnica de PCR quantitativo (qPCR) é bastante utilizada na determinação dos níveis de transcritos dos genes alvos (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008). Alterações nos níveis de transcritos de genes de biotransformação de fase I (e.g. *CYP356* e *CYP2*) e fase II

(e.g. *GST α* e *SULT*) sugerem o uso dos níveis de transcritos desses genes como biomarcadores moleculares de exposição aos HPAs e outros xenobióticos (FLORES-NUNES et al., 2015; LUCHMANN et al., 2014; PIAZZA et al., 2016).

1.9 MOLUSCOS COMO ORGANISMOS SENTINELAS DE CONTAMINAÇÃO

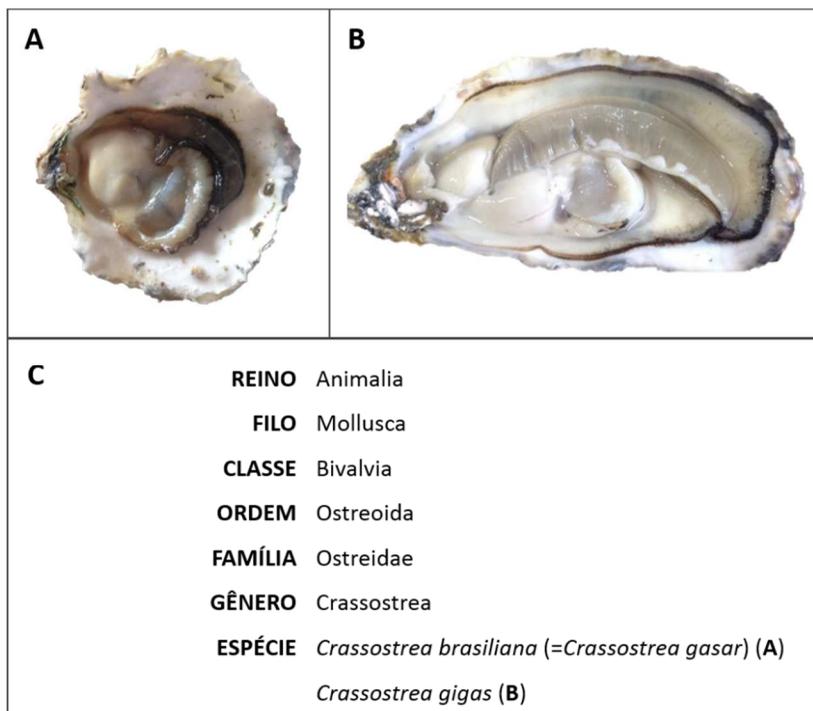
Os moluscos são utilizados mundialmente em programas de biomonitoramento ambiental, como no Programa de Monitoramento de Moluscos (*Mussel Watch Program*) nos Estados Unidos (SCHÖNE; KRAUSE, 2016); o Monitoramento de Moluscos do Mediterrâneo (*Mediterranean Mussel Watch*) (THEBAULT; BAENA, 2007) e o Programa de Monitoramento de Moluscos da África do Sul (SPARKS; ODENDAAL; SNYMAN, 2014). Esses organismos possuem diversas características que os tornam adequados para esses tipos de programas como: 1) a capacidade de bioacumulação em seus tecidos de uma ampla variedade de contaminantes em quantidades superiores aos encontrados no ambiente, 2) o sedentarismo e 3) a ampla distribuição biogeográfica (SCHÖNE; KRAUSE, 2016).

No Brasil, as ostras do gênero *Crassostrea* têm sido empregadas com sucesso como organismos sentinelas em estudos de biomonitoramento, como as espécies *Crassostrea brasiliana* e *Crassostrea gigas* (**Figura 10**) (FLORES-NUNES et al., 2015; PESSATI et al., 2016; ZANETTE et al., 2008).

A espécie de ostra nativa *C. brasiliana* (Lamarck, 1819) = *Crassostrea gasar* (Adanson, 1757), é cultivada com êxito na costa brasileira, com boa taxa de sobrevivência (LOPES, 2008) e ampla distribuição geográfica, sendo encontrada desde o sul do Brasil até o Pará (LAZOSKI, 2004). Além disso, recentemente *C. brasiliana* e *C. gasar* foram consideradas sinônimas (DE MELO et al., 2010; SALVI; MACALI; MARIOTTINI, 2014), o que amplia a distribuição dessa espécie para a costa oeste do continente africano (GOSLING, 2003). Esses organismos

são encontrados em ambientes com salinidade de 0 a 40, sendo a salinidade ótima de 8 a 34 e temperaturas ótimas entre 20 a 32 °C (NASCIMENTO, 1991).

Figura 10. Ostras *C. brasiliiana* e *C. gigas*. **A.** Aspecto de *C. brasiliiana* após remoção de uma das valvas. **B.** Aspecto de *C. gigas* após remoção de uma das valvas. **C.** Classificação das ostras *C. brasiliiana* e *C. gigas*.



Fonte: A. ZACCHI, F. L. , 2017, Arquivo pessoal, B. SIEBERT, M.N., 2017, Arquivo pessoal. C. Baseado em BRUSCA; BRUSCA, 2007; SALVI; MACALI; MARIOTTINI, 2014.

A ostra *C. gigas* (Thunberg, 1793), conhecida como ostra do pacífico, é originária do pacífico indo-oeste, mas devido à sua introdução bem-sucedida na costa pacífica da América do Norte, no oeste da Europa, na América do Sul e na Austrália, atualmente apresenta uma distribuição global (CASTAÑOS; PASCUAL; CAMACHO, 2009; GOSLING,

2003). Essa espécie foi introduzida no Brasil na década de 70 e é a principal ostra cultivada em Santa Catarina (ACEB, 2014). Esse organismo cresce em temperaturas ótimas de 11 a 34 °C e salinidade de 20 a 35 (FAO, 2005).

Ambas *C. brasiliiana* e *C. gigas* são sésseis, filtradores, apresentam ampla tolerância para salinidade e temperatura e caracterizam-se por habitar regiões estuarinas e de manguezais (FAO, 2005; GOSLING, 2003; LOPES, 2008). Esses animais desempenham um papel importante na dinâmica dos sedimentos, nutrientes e algas nos estuários e regiões entre-marés (SALVI; MACALI; MARIOTTINI, 2014). Além disso, essas regiões recebem um grande aporte de contaminantes antropogênicos, o que aumenta o contato desses animais com contaminantes.

Apesar das semelhanças morfológicas entre as ostras *C. brasiliiana* e *C. gigas*, foi proposta a separação dessas duas espécies em gêneros distintos em razão da distância filogenética entre as espécies do gênero *Crassostrea* pertencentes a dois clados divergentes: um que abrange as espécies indo-pacíficas, como *C. gigas*, e outro as espécies do Atlântico, que inclui a espécie *C. brasiliiana* (SALVI; MACALI; MARIOTTINI, 2014).

1.10 OBJETIVOS E CONSIDERAÇÕES SOBRE A ESTRUTURA DO TEXTO

Tendo em vista o potencial da atividade EROD como biomarcador da contaminação ambiental por HPAs, a ausência de detecção de atividade EROD em ostras (SCHLENK; BUHLER, 1989) e as evidências da presença de genes *CYP1-like* no transcriptoma de brânquias e glândula digestiva de *C. brasiliiana* e no genoma de *C. gigas* (LÜCHMANN et al., 2015; ZHANG et al., 2012), no presente estudo buscou-se detectar a atividade da enzima EROD em *C. brasiliiana* e *C. gigas*. Essa é uma etapa importante para o estabelecimento dessa enzima como um biomarcador da contaminação ambiental por HPAs e outros contaminantes em moluscos bivalves.

Além disso, ressalta-se a importância de se estudar o sistema de biotransformação de ostras expostas aos HPAs, não apenas do ponto de

vista bioquímico, como também como base para estudos comparativos sobre a evolução desse sistema em diferentes grupos filogenéticos. Dessa forma, no presente estudo buscou-se analisar os níveis de transcritos e atividades de enzimas do sistema de biotransformação em ostras da espécie *C. gigas* expostas aos HPAs pireno e fluoreno, tendo em vista que esses estudos representam uma oportunidade para a descoberta de novos biomarcadores bioquímicos de exposição aos HPAs nesses organismos.

1.10.1 Objetivo geral

Investigar a atividade EROD nas espécies de ostra *C. brasiliana* e *C. gigas* e analisar níveis de transcritos e atividades de enzimas de biotransformação em ostras *C. gigas* expostas aos HPAs pireno e fluoreno.

1.10.2 Objetivos específicos

- Definir condições de pH e temperatura para a atividade EROD na fração microsossomal de tecidos de *C. brasiliana* e demonstrar que essa atividade está acima do limite de quantificação do método;
- Determinar os parâmetros cinéticos de K_m aparente (K_{mapp}) e velocidade máxima (V_{max}) de EROD na fração microsossomal de diferentes tecidos em *C. brasiliana* e *C. gigas*;
- Determinar o efeito de coenzimas e inibidores clássicos de CYP1 na atividade EROD de ostras *C. brasiliana* e *C. gigas*;
- Identificar genes *CYP1* candidatos para atividade EROD em *C. gigas* por meio da análise de níveis de transcritos, construção de modelo por homologia e ancoragem molecular de 7-ER;
- Analisar os níveis de transcritos dos genes: *CYP1-like*, *CYP2-like*, *CYP2AU2*, *CYP356A1*, *CYP17 α -like*, *GST Ω -like*, *GSTmic-like* e *SULT-like* em ostras da espécie *C. gigas* expostas aos HPAs pireno e fluoreno por 24 e 96 h.

- Analisar a atividade das enzimas do sistema de biotransformação: GST total, GST microsossomal e atividade EROD em ostras da espécie *C. gigas* expostas aos HPAs pireno e fluoreno por 24 e 96 h.

1.10.3 Considerações sobre a estrutura do texto

O presente documento está organizado em cinco capítulos. O primeiro capítulo (I), que finaliza nesta seção, contém uma breve revisão de temas abordados nesta tese de doutorado. O capítulo II apresenta os resultados da investigação da atividade EROD em brânquias e glândula digestiva de *C. brasiliiana*, publicado na revista *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry and Molecular Biology* (SIEBERT et al., 2017a).

O terceiro capítulo (III) apresenta os resultados da investigação da atividade EROD em ostras da espécie *C. gigas*, juntamente com os resultados da busca por genes responsáveis por essa atividade enzimática, análises *in silico* de modelagem por homologia e ancoragem molecular. A partir dos dados deste capítulo foi gerado um artigo publicado na revista *Aquatic Toxicology* (SIEBERT et al., 2017b). No capítulo IV estão apresentados os resultados das análises dos níveis de transcritos e da atividade de enzimas do sistema de biotransformação em ostras *C. gigas* expostas aos HPAs pireno e fluoreno

Por fim, o capítulo V apresenta comentários e conclusões finais do trabalho desenvolvido. As referências de todos os capítulos estão organizadas em ordem alfabética no final do documento.

2 CAPÍTULO II: ATIVIDADE ETÓXI-RESORUFINA O-DEETILASE EM OSTRA *Crassostrea brasiliana**

Marília N. Siebert^a, Jacó J. Mattos^b, Clei E. Piazza^a, Daína de Lima^a, Carlos Henrique A.M. Gomes^c; Cláudio M.R. de Melo^c, Afonso C.D. Bainy^a.

^a Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica (LABCAI), Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

^b Núcleo de Estudos de Patologias Aquícolas (NEPAQ), Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

^c Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM), Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

*Os dados deste capítulo estão no artigo de Siebert et al. (2017a), publicado na revista *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry and Molecular Biology*

RESUMO

Enzimas da família citocromo P450 1 (CYP1) realizam a biotransformação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs). Os HPAs podem induzir a expressão de proteínas e a atividade enzimática de membros dessa família de enzimas, sendo essa atividade usualmente quantificada pelo ensaio da 7-etóxi-resorufina *O*-deetilase (EROD). O objetivo deste estudo foi demonstrar a atividade EROD em moluscos bivalves *Crassostrea brasiliana*. A atividade EROD foi analisada nas frações citosólicas e microsossomais de brânquias, glândula digestiva e manto. A atividade EROD não foi observada em manto, mas foi quantificada nas frações microsossomais de brânquias e glândula digestiva utilizando NADPH como coenzima da reação enzimática. A temperatura e pH estabelecidos para o ensaio foram 30 °C e 7,4, respectivamente. O K_m aparente (K_{mapp}) da EROD foi 4,32 μM nas brânquias e 5,56 μM na glândula digestiva. A velocidade máxima da reação (V_{max}) foi 337,3 $\text{fmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg de proteína}^{-1}$ nas brânquias e 297,7 $\text{fmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg de proteína}^{-1}$ na glândula digestiva. As ostras *C. brasiliana* apresentaram um K_{mapp} maior e uma V_{max} menor que outros bivalves, o que sugere que as enzimas CYP1-like de ostras possuem uma afinidade menor ao substrato 7-etóxi-resorufina (7-ER) do que as outras espécies e/ou menor expressão das enzimas responsáveis por essa atividade. O inibidor de CYP1 elipticina (ELP) inibiu a atividade EROD em ambos tecidos estudados. Na concentração mais alta de ELP (100 μM), a atividade EROD foi inibida 78% nas brânquias e 47% na glândula digestiva. Os inibidores de CYP1 α -naftoflavona e furafilina não inibiram a atividade EROD nos microsossomas de ambos os tecidos. Em conclusão, a atividade EROD pode ser utilizada para determinar uma atividade CYP1-like em ostras *C. brasiliana*, sendo que possivelmente uma enzima CYP1A-like é responsável por essa catálise.

Palavras-chave: biotransformação. citocromo P450. EROD, fase I, moluscos.

2.1 INTRODUÇÃO

A superfamília de enzimas CYP compreende um grupo funcionalmente diverso de hemoproteínas localizadas principalmente no retículo endoplasmático liso. Essas enzimas atuam especialmente na biotransformação de fase I durante o metabolismo de drogas e na síntese de esteróides (DANIELSON, 2002). Para a realização da catálise enzimática, os CYPs microsossomais atuam em complexo com as enzimas NADPH citocromo P450 redutase ou NADH-citocromo b5 redutase, das quais recebem equivalentes redutores do NAPDH ou NADH por meio de um sistema de transporte de elétrons (HANNEMANN et al., 2007).

Em vertebrados, a família CYP1 inclui quatro subfamílias gênicas: *CYP1A*, *CYP1B*, *CYP1C* e *CYP1D* (GOLDSTONE et al., 2009). Nesses organismos, os integrantes da família CYP1 desempenham um importante papel na detoxificação e bioativação de HPAs (SHIMADA et al., 1996; UNO et al., 2004). Além disso, muitos substratos de CYP1, como os HAHs e os próprios HPAs, podem induzir um aumento na transcrição de genes *CYP1* por meio da ativação do AHR. O AHR é um fator de transcrição ativado por ligante que interage com elementos de resposta específicos do DNA, localizados na região regulatória de genes *CYP1* (DENISON et al., 2002; HAHN, 2002). O aumento da expressão de genes *CYP1* pode levar a um aumento nos níveis de enzimas CYP1. Em contrapartida, outras substâncias como a elipticina, furafilina e a α -naftoflavona podem agir em nível enzimático, inibindo a atividade de enzimas CYP1. Esses inibidores são estruturalmente diversos e possuem diferentes mecanismos de ação, o que representa uma importante ferramenta para estudos *in vitro* de caracterização dessas enzimas (HALPERT et al., 1994; KOLEY et al., 1997).

Como a atividade enzimática de CYP1 pode ser induzida, essa atividade é considerada um biomarcador clássico da exposição aos HPAs e outros agonistas do receptor AHR em diversas espécies de vertebrados (CHAHIN et al., 2013; NOGUEIRA et al., 2011; SCHLEZINGER; STEGEMAN, 2001). A atividade CYP1 é usualmente quantificada pelo método EROD.

Nesse ensaio, o produto fluorescente resorufina é formado após a deetilação do substrato 7-ER, processo catalisado por enzimas CYP1 (BURKE; MAYER, 1974; STEGEMAN et al., 2015).

Em humanos, todas as enzimas da família CYP1 demonstram atividade EROD, entretanto, a eficiência catalítica de CYP1A1 para atividade dessa enzima é maior do que CY1B1 e CY1A2, respectivamente (SHIMADA et al., 1997).

Apesar de não possuírem genes da família *CYP1* identificados, espécies de invertebrados também demonstram atividade EROD, incluindo membros dos filos Cnidaria, Mollusca e Arthropoda (CHEAH et al., 1995; HARITOS et al., 1994; HEFFERNAN; WINSTON, 1998; REWITZ et al., 2006).

Vários estudos tentaram demonstrar atividade relacionada às enzimas CYP1, expressão de proteínas ou detecção de transcritos *CYP1-like* em moluscos bivalves, com o objetivo principal do uso desses parâmetros como biomarcadores, uma vez que esses animais são considerados excelentes sentinelas da poluição ambiental (LÜCHMANN et al., 2015; SOLÉ; LIVINGSTONE, 2005; ZANETTE et al., 2013). Apesar desses organismos apresentarem níveis de CYP totais e atividade CYP1, detectada pelos ensaios de BPH e EROD (SCHLENK; BUHLER, 1989; SOLÉ; LIVINGSTONE, 2005; ZHANG et al., 2010), anticorpos anti-CYP1 de vertebrados reagem com proteínas não-CYP nesses organismos (GRØSVIK et al., 2006) e a função de *CYP1-like* em moluscos ainda não é bem compreendida.

Ostras da espécie *C. gigas* apresentam atividade BPH, entretanto, a atividade EROD não foi demonstrada nesses organismos (SCHLENK; BUHLER, 1989). Interessantemente, o genoma de *C. gigas* apresenta 12 genes *CYP1-like* (ZHANG et al., 2012) e o transcriptoma de brânquias e glândula digestiva de *C. brasiliiana* apresenta dois genes *CYP1-like* (LÜCHMANN et al., 2015). Além disso, *C. brasiliiana* expostas ao fenantreno (PHE) e à fração acomodada em água (FAA) do óleo diesel demonstram um aumento no nível de transcritos de *CYP1-like* (LÜCHMANN et al., 2015).

Considerando as evidências genômicas e transcriptômicas recentes da presença de genes *CYP1-like* em espécies do gênero *Crassostrea* e a ausência de evidência da atividade EROD em *C. brasiliana*, o objetivo deste estudo foi investigar a atividade EROD nessa espécie.

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1 Químicos

Os reagentes 7-ER, resorufina, NADH, NADPH, metanol, dimetil sulfóxido (DMSO), fluoreto de fenilmetanosulfonil (PMSF), DL-ditiotreitól (DTT) e α -naftoflavona (ANF) foram adquiridos de Sigma-Aldrich (St Louis, EUA). Elipticina (ELP) e furafilina (FRF) foram adquiridos de Santa Cruz Biotechnology (Dallas, EUA). Todo os reagentes utilizados foram de qualidade analítica.

2.2.2 Preparo das frações citosólicas e microssomais

Ostras adultas da espécie *C. brasiliana* foram obtidas durante a primavera e verão, no cultivo de ostras do Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM), da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. Tecidos recém-coletados de seis a nove ostras foram homogeneizados para cada ensaio. Brânquias, glândula digestiva e manto foram homogeneizados na proporção de 1 unidade de massa de tecido (g) para 5 unidades de volume de tampão (mL) (Tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,4, com sacarose 0,5 M, KCl 0,15M, DTT 1mM e PMSF 1mM) a 4 °C, utilizando um homogeneizador de tecidos. Os homogenatos foram centrifugados a 9.000 g por 30 min a 4 °C e o sobrenadante resultante dessa centrifugação foi submetido à ultracentrifugação a 100.000 g por 70 min a 4 °C para a obtenção das frações citosólicas e microssomais (HODSON et al., 1991). Após a ultracentrifugação, as frações sobrenadantes (citosólicas) foram

mantidas no gelo enquanto que as frações microssomais foram gentilmente lavadas com 500 μ L de tampão de homogeneização, sem DTT e PMSF, e submetidas a uma segunda ultracentrifugação a 100.000 g por 20 min a 4 °C. Em seguida, as frações microssomais foram diluídas em tampão de microssoma (Fosfato de Potássio 0,1 M, pH 7,4, KCl 0,15 M, Glicerol 20%). A atividade EROD foi analisada imediatamente após a obtenção das frações celulares, com o objetivo de evitar a perda de atividade devido ao congelamento e descongelamento das amostras.

2.2.3 Atividade 7-etóxi-resorufina O-deetilase (EROD)

A atividade EROD foi medida por método adaptado de Burke e Mayer (1974), utilizando placas de 96 poços pretas e de fundo plano (Greiner Bio-One Fluotrac™, *flat bottom 96-well black plates*). Exceto quando descrito, as condições das reações do ensaio consistiram em: fração microssomal ou citosólica (300 μ g de proteínas), tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 7,4), NADPH 4 mM e 7-ER 10 μ M (diluída a partir de estoque em metanol a 1mM). As amostras foram misturadas por agitação leve durante 1 min com 7-ER e incubadas no escuro a 30 °C por 10 min. Após esse período, o NADPH foi adicionado para iniciar a reação. Todas as soluções foram mantidas a 30°C (ou respectiva temperatura) durante o preparo das reações. Reações em branco (sem amostra) foram monitoradas em paralelo aos ensaios.

A formação de resorufina foi quantificada utilizando-se o espectrofluorímetro Spectramax M5, Molecular Devices (Sunnyvale, EUA), com excitação a 530 nm, emissão a 585 nm, limite de corte (*cutoff*) a 550 nm, tubos fotomultiplicadores (PMT) alto, durante 1 h, com intervalo de leitura de 1 min.

O efeito de matriz da amostra, que resulta em absorção (*quenching*) da fluorescência emitida, foi corrigido por meio do coeficiente de calibração (CC) determinado para cada amostra e adaptado de Nilsen, Berg e Goksøyr (1998) com a seguinte abordagem: após a leitura cinética, uma leitura da fluorescência da resorufina foi

realizada (*endpoint*, Ex 530/Em 585) nas reações com amostra e branco (AMi e BRi, respectivamente), então, 100 pmol de resorufina foi adicionado em cada poço com amostra ou branco e outra leitura foi realizada nas mesmas condições (AMf e BRf). O coeficiente de calibração foi calculado usando a **Equação 2**. Um coeficiente de calibração maior do que 1,0 indica um efeito de *quenching* da amostra.

Equação 2:

$$CC = \frac{BRf - BRi}{AMf - AMi}$$

Para transformar a unidade de fluorescência relativa (RFU) obtida em fmol de resorufina, uma curva padrão com concentrações conhecidas de resorufina foi obtida nas mesmas condições do ensaio enzimático. O estoque de resorufina foi diluído em metanol. Uma curva padrão foi obtida para cada pH e temperatura testados. O coeficiente angular (*S*) de cada curva foi obtido por regressão linear.

A atividade EROD foi normalizada pela concentração de proteínas de cada amostra, determinado pelo ensaio de Bradford (BRADFORD, 1976), utilizando o kit BioRad™ protein assay da BioRad (Hercules, EUA), de acordo com o protocolo do fabricante e usando a proteína albumina bovina sérica como padrão.

A atividade EROD foi corrigida pelo coeficiente de calibração (CC) e expressa por fmol.min⁻¹ mg.proteína⁻¹, de acordo com a **Equação 3**. AM indica reações com amostra e BR reações em branco.

Equação 3:

$$\text{Atividade EROD} = \frac{(AM \text{ miliRFU} \cdot \text{min}^{-1} - BR \text{ miliRFU} \cdot \text{min}^{-1}) \times S \times CC}{\text{mg proteína} \cdot \text{mL}^{-1} \times \text{volume da amostra (mL)}}$$

2.2.4 Padronização das condições para a atividade EROD e parâmetros cinéticos

Para a padronização da temperatura e pH do ensaio foram realizados ensaios com NADPH 4mM e 7-ER 10 μ M a 20, 25, 30, 35, 40 e 45 °C e pH 7,0; 7,2; 7,4; 7,6; 7,8 e 8,0, respectivamente.

Os ensaios de teste de coenzimas foram realizados com NADPH 4mM, NADH 4mM ou NADH e NADPH juntos a 4mM cada. A concentração ótima das coenzimas foram determinadas previamente. Para o teste de desnaturação, as amostras foram aquecidas a 100 °C por 10 min e imediatamente colocadas no gelo. Esse procedimento foi repetido três vezes.

A concentração final de 7-ER no experimento para determinação do K_m aparente (K_{mapp}) e velocidade máxima (V_{max}) foram: 1,875; 2,5; 3,75; 5,0; 7,5; 10; 15 e 20 μ M. A regressão não-linear foi realizada utilizando a equação de Michaelis-Menten e os parâmetros de Michaelis-Menten (K_{mapp} e V_{max}) foram calculados pelo programa GraphPad Prism 5.0 para Windows.

O limite de quantificação do método foi determinado de acordo com Eggens e Galgani (1992), com pequenas modificações: a taxa de formação de resorufina ($\text{fmol}\cdot\text{min}^{-1}$) foi monitorada nas reações de atividade EROD com diferentes concentrações de microssomas de brânquias e glândula digestiva (% de Fração Microssomal: 100%, 75%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 2,5%, em que 100% correspondem a 40 μ L de fração microssomal pura). A regressão linear foi realizada utilizando os dados de taxa de formação de resorufina e a concentração de microssoma. Para obter o limite de quantificação do método para a brânquia e glândula digestiva, selecionou-se a menor diluição para cada tecido cuja taxa de formação de resorufina manteve um $r^2 > 0,98$ com as diluições mais concentradas na análise de regressão linear. A linearidade (r^2) foi estimada e considerada significativa para $p < 0,05$. Ao valor de formação de resorufina dessa amostra foi somado três vezes o seu desvio padrão e esse valor foi considerado o limite de quantificação do método.

2.2.5 *Ensaios com inibidores de CYP1*

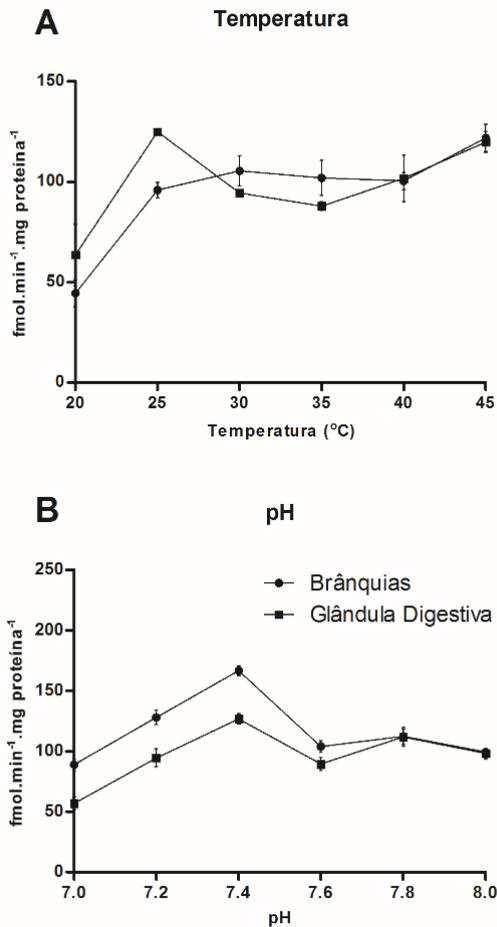
Os inibidores de CYP1 de mamíferos: elipticina (ELP), furafilina (FRF) e α -naftoflavona (ANF) foram testados. As concentrações dos inibidores utilizadas nos ensaios foram escolhidas baseadas em um estudo piloto e na solubilidade de cada inibidor. A ELP foi adicionada nas concentrações finais de 10, 20, 40, 60, 80 e 100 μ M, enquanto a ANF e FRF foram utilizadas na concentração final de 100 μ M. Os inibidores foram dissolvidos em DMSO e reações controle foram realizadas com a mesma concentração de DMSO, na ausência de inibidor. A concentração de DMSO em todas as reações foi inferior a 0,25%. Os ensaios com ELP e ANF foram realizados incubando amostra, 7-ER e o inibidor por 10 min, seguido da adição de NADPH para iniciar a reação. Os ensaios com FRF foram realizados incubando NADPH, FRF e amostra por 10 min seguido da adição de 7-ER para iniciar a reação. Os valores de atividade foram comparados por ANOVA de uma via, seguida do teste complementar de Dunnett. As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$.

2.3 RESULTADOS

As padronizações da temperatura e pH foram realizadas nas frações microssomais de brânquias e glândula digestiva para estabelecer as condições do ensaio da atividade EROD em *C. brasiliana* (**Figura 11A e B**, respectivamente).

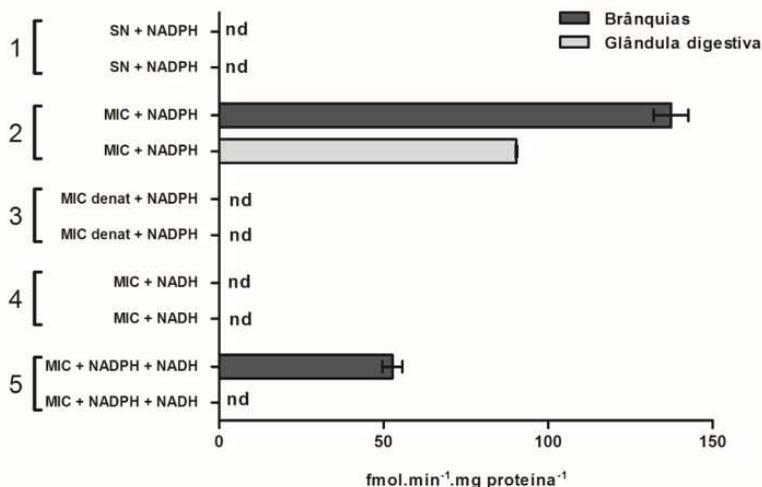
A atividade EROD foi quantificada a 20, 25, 30, 35, 40 e 45 °C. Nos microssomas de brânquias, as atividades mínimas e máxima observadas foram a 20 °C e 45 °C, respectivamente, e foi quase constante entre 25 e 40 °C. Em glândula digestiva, a menor atividade enzimática foi observada a 20°C e um pico de atividade foi observado a 25 °C. A atividade EROD foi monitorada em pH 7,0; 7,2; 7,4; 7,6; 7,8 e 8,0 e foi maior em pH 7,4 em ambos os tecidos estudados.

Figura 11. Efeito da temperatura (A) e do pH (B) na atividade EROD de microsomas de brânquias e de glândula digestiva de *C. brasiliiana*. Os ensaios foram realizados com 7-ER 10 μM , NADPH 4 mM a pH 7,4 (A) e 7-ER 10 μM , NADPH 4 mM e 30 °C (B). Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão (n = 3 réplicas técnicas, pool de seis animais).



A atividade EROD foi avaliada nas frações citosólicas e microsossomais de brânquias, glândula digestiva e manto de *C. brasiliiana* (**Figura 12**). O manto não apresentou atividade EROD. A atividade EROD não foi detectada na fração citosólica, entretanto, foi quantificada na fração microsossomal de brânquias ($137,35 \text{ fmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prote\acute{a}na}^{-1}$) e glândula digestiva ($90,35 \text{ fmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prote\acute{a}na}^{-1}$), utilizando NADPH como coenzima. As amostras desnaturadas não apresentaram atividade EROD.

Figura 12. Atividade EROD em frações citosólicas (SN) e microsossomais (MIC) de brânquias e glândula digestiva de *C. brasiliiana* utilizando diferentes coenzimas (NADH e NADPH). As condições de ensaio foram: 1. Fração citosólica, NADPH 4 mM; 2. Fração microsossomal, NADPH 4 mM; 3. Fração microsossomal desnaturada, NADPH 4 mM; 4. Fração microsossomal, NADH 4 mM; 5. Fração microsossomal, NADH e NADPH 4mM de cada. Todos os ensaios foram realizados com $10 \mu\text{M}$ de 7-ER, pH 7,4 e 30°C . nd: não detectado. Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão ($n = 3$ réplicas técnicas, *pool* de oito animais).

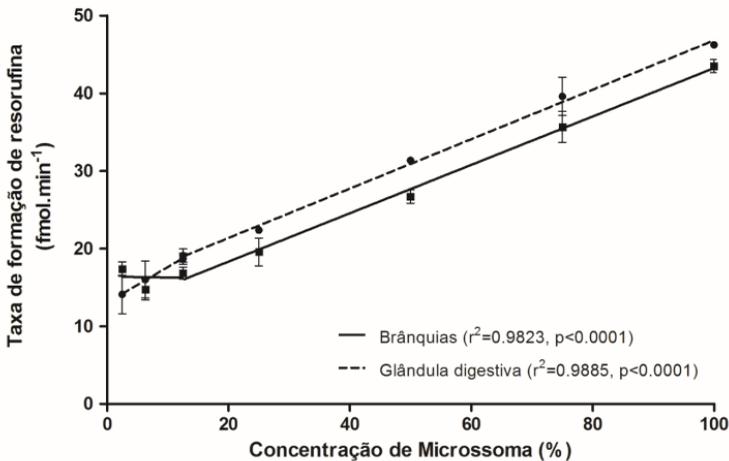


A atividade EROD não foi detectada em ambos os tecidos quando o NADH foi utilizado como coenzima. As reações realizadas com NADH em conjunto com NADPH mostraram atividade EROD apenas em

brânquias ($52,65 \text{ fmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg proteína}^{-1}$) e essa atividade foi 2,6 vezes menor que aquela quantificada apenas com NADPH nesse tecido.

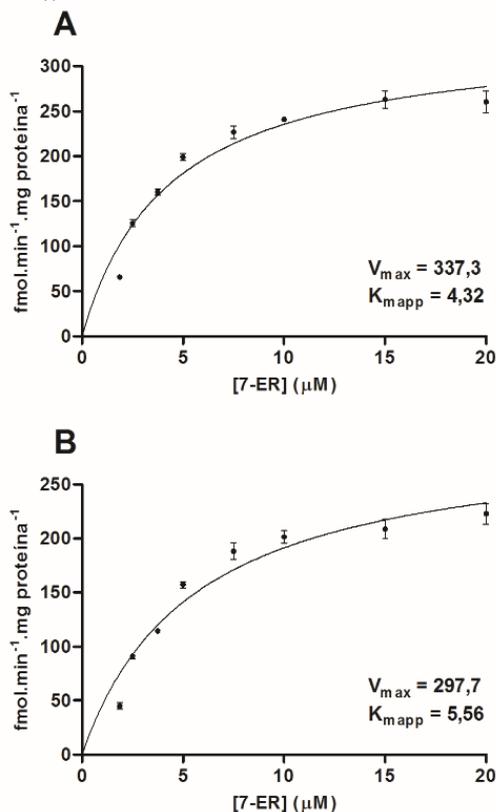
O limite de quantificação do ensaio foi determinado medindo a taxa de formação de resorufina ($\text{fmol}\cdot\text{min}^{-1}$) em diferentes concentrações de amostras da fração microsomal. O limite de quantificação foi de $20 \text{ fmol}\cdot\text{min}^{-1}$ em brânquias e $22 \text{ fmol}\cdot\text{min}^{-1}$ em glândula digestiva (**Figura 13**). As taxas detectadas abaixo desses limites foram consideradas não detectadas (nd). A concentração de microsomas de 12,5% (diluição 1: 8 v / v) foi a menor diluição cuja taxa de formação de resorufina manteve linearidade com as amostras de microsomas mais concentradas em ambos os tecidos. O valor de r^2 foi de 0,98 para brânquias e 0,99 para glândula digestiva considerando os dados de 100%, 75%, 50%, 25% e 12,5% para a análise.

Figura 13. Taxa de formação de resorufina em diferentes concentrações de microsomas de brânquias e glândula digestiva (expressos em percentual da amostra não diluída) de *C. brasiliensis*. Valor de r^2 considerando dados de 100%, 75%, 50%, 25% e 12,5%; valor de p expressa o ajuste dos dados ($n = 3$ réplicas técnicas, *pool* de oito animais).



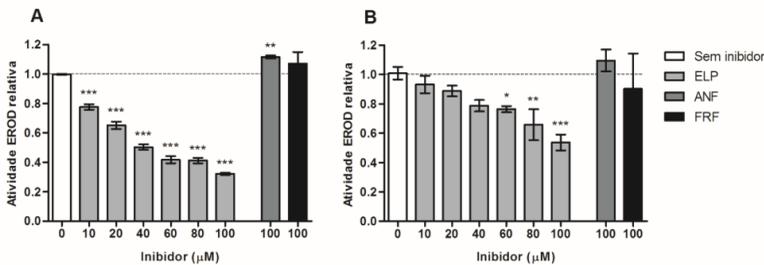
A caracterização cinética da atividade EROD foi realizada pela equação de cinética enzimática de Michaelis-Menten. O K_{mapp} da EROD em brânquias e glândula digestiva foi 4,32 e 5,56 μM , respectivamente. A V_{max} foi de 337,3 e 297,7 $\text{fmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}$ de proteína $^{-1}$ para brânquias e glândula digestiva, respectivamente (**Figura 14**). O valor de r^2 na equação de Michaelis-Menten foi de 0,9320 para as brânquias e 0,9315 para a glândula digestiva.

Figura 14. Atividade EROD em diferentes concentrações de 7-etóxi-resorufina (7-ER) na fração microsomal de brânquias (**A**) e glândula digestiva (**B**) de *C. brasiliiana*. Os ensaios foram realizados com NADPH 4 mM, pH 7,4. Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão ($n = 3$ réplicas técnicas, *pool* de seis animais). K_{mapp} : K_m aparente. V_{max} : velocidade máxima.



O estudo de inibição foi realizado em ostras utilizando os inibidores de CYP1 de mamífero: ELP, FRF e ANF (**Figura 15**). A atividade EROD foi inibida por ELP, mas não por ANF e FRF. Nas brânquias, a ELP inibiu a atividade EROD em todas as concentrações testadas enquanto que na glândula digestiva a ELP inibiu a atividade EROD a partir da concentração de 60 μM . Na concentração mais alta de ELP analisada (100 μM), 78% da atividade EROD foi inibida nas brânquias e 47% na glândula digestiva. Nas brânquias, a ANF causou um aumento de 11,5% na atividade EROD. Uma vez que ANF e FRF não inibiram a atividade EROD, apenas os resultados da concentração 100 μM são apresentados para esses inibidores.

Figura 15. Efeito dos inibidores elipticina (ELP), furafilina (FRF) e α -naftoflavona (ANF) na atividade EROD em microsomas de brânquias (**A**) e glândula digestiva (**B**) de *C. brasiliensis*. Os ensaios foram realizados com 10 μM de 7-ER, NADPH 4 mM, pH 7,4 e 30 °C. Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão. A análise estatística realizada foi ANOVA de uma via, seguida do teste complementar de Dunnett. * Representa diferença significativa entre o grupo com inibidor comparado com o grupo controle, * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$ ($n = 3$ réplicas técnicas, *pool* de nove ostras).



2.4 DISCUSSÃO

A quantificação da atividade EROD em microsomas de ostra é importante para seu uso como biomarcador da contaminação de HPAs e HAH em estudos ecotoxicológicos e em programas de biomonitoramento. Além disso, é importante caracterizar a cinética

enzimática e validar métodos analíticos antes de sua extensa utilização em tais estudos.

As condições do ensaio EROD foram padronizadas em relação ao pH e à temperatura. O mesmo pH ótimo para a atividade dessa enzima foi observado nas brânquias e na glândula digestiva, o que sugere que o mesmo grupo de enzimas catalisa a reação em ambos os tecidos.

Com o intuito de identificar a localização subcelular das enzimas responsáveis pela atividade EROD em *C. brasiliiana*, as frações celulares citosólica e microsomal foram separadas por centrifugação. A atividade EROD foi detectada apenas em frações microsomais, como esperado para uma enzima CYP que realiza biotransformação de xenobióticos (DANIELSON, 2002). Além disso, não foi detectada atividade nas amostras desnaturadas por aquecimento, indicando que a formação da resorufina quantificada durante o ensaio é uma reação catalisada por uma enzima.

A ausência de atividade EROD nas frações subcelulares do manto sugere que esse tecido não expressa enzimas CYP1-like. No entanto, dos Reis et al. (2015), por meio da técnica de hibridização *in situ* e estudos de qPCR, observaram um nível de transcritos elevado do gene *CYP2AU1* no manto de *C. brasiliiana* comparado a outros tecidos. Esse gene foi induzido pela exposição ao fenantreno (PHE), sugerindo que esse tecido também pode ter um papel de biotransformação além das funções clássicas do manto associadas ao armazenamento de reservas de nutrientes e à gametogênese em moluscos bivalves (GOSLING, 2003).

O ciclo catalítico de CYP necessita de duas etapas de transferência de elétrons para ativar o oxigênio molecular. A fonte de equivalentes redutores é o NADPH e/ou NADH, que têm seus elétrons transferidos para o CYP pelas enzimas redutases: NADPH-citocromo P450 redutase e/ou NADH-citocromo b5 redutase via citocromo b5 (KANDEL; LAMPE, 2014). A NADPH-citocromo P450 redutase pode transferir ambos os elétrons do NADPH para o CYP. Alternativamente, o citocromo b5 pode transferir para o CYP ambos os elétrons da NADH-citocromo b5 redutase ou o segundo elétron da NADPH-citocromo P450 redutase durante o

ciclo catalítico de CYP (HANNEMANN et al., 2007). A atividade EROD foi avaliada na presença de NADH, NADPH e NADH com NADPH. Os resultados indicam o envolvimento apenas da enzima NADPH-citocromo P450 redutase como doadora de elétrons para a atividade EROD em *C. brasiliانا*. Curiosamente, quando NADH e NADPH foram adicionados simultaneamente, foi observada uma menor atividade enzimática na brânquia comparada a atividade EROD com NADPH, enquanto nenhuma atividade enzimática foi quantificada na glândula digestiva, o que sugere que o NADH interfere na atividade EROD, entretanto, esse mecanismo de interação não foi investigado neste trabalho.

A atividade EROD tem sido observada em espécies de moluscos (BINELLI et al., 2006; CHEAH et al., 1995; SILVA et al., 2012). Apesar de alguns estudos detectarem atividade EROD em ostras, nenhum deles demonstrou que a resorufina detectada era devido a uma atividade enzimática relacionada a CYP1-like (MARANHO et al., 2012; SEABRA-PEREIRA et al., 2014).

A atividade enzimática de BPH, considerada uma atividade enzimática referente a membros da família CYP1, foi demonstrada em *C. gigas*, mas, curiosamente, a atividade EROD não foi encontrada nesse mesmo estudo (SCHLENK; BUHLER, 1989). As diferenças na detecção da atividade de EROD entre *C. brasiliانا* e *C. gigas* podem estar relacionadas às diferenças na expressão das proteínas que realizam essa atividade enzimática ou diferenças de afinidades pelo substrato. Além disso, a abordagem metodológica adotada no presente estudo pode ter melhorado o ensaio. A investigação da atividade EROD em *C. gigas* encontra-se descrita no capítulo III deste documento.

Em comparação com outras espécies de bivalves, uma V_{max} menor da atividade EROD foi encontrada em ostra (AGUIRRE-MARTÍNEZ; DELVALLS; MARTÍN-DÍAZ, 2015; BINELLI et al., 2006; DE LAFONTAINE et al., 2000). No entanto, atividade EROD com velocidades que variam entre $\text{fmol a pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg de proteína}^{-1}$ foi encontrada em outros organismos como cnidários (HEFFERNAN; WINSTON, 1998), moluscos (CHEAH et al., 1995; MONARI et al., 2009) e artrópodes (FARIA et al.,

2010), em estudos que usaram abordagens metodológicas semelhantes ao deste estudo. Curiosamente, o mesmo padrão observado por Heffernan e Winston (1998) na atividade EROD de cnidários foi observado nas ostras, em que amostras com baixa atividade EROD mostraram uma diminuição na fluorescência durante os minutos iniciais do ensaio cinético. Neste e no trabalho citado, os cálculos foram determinados apenas a partir da fase linear. O limite de quantificação do ensaio foi menor do que as taxas normalmente detectadas em microsomas de ostra, indicando que o método é suficientemente sensível para quantificar a atividade EROD nesses organismos. As diferenças nos limites de quantificação entre os tecidos são consequência do efeito de *quenching* da amostra, que é maior na glândula digestiva.

O parâmetro cinético de Michaelis-Menten V_{max} nas brânquias e na glândula digestiva é menor do que o V_{max} de peixes e outras espécies de vertebrados (WANWIMOLRUK; WANWIMOLRUK, 2006; ZAMARATSKAIA; ZLABEK, 2009). A baixa atividade EROD observada em *C. brasiliiana* pode estar associada à alta bioacumulação de HPAs normalmente detectada em moluscos bivalves (LEÓN et al., 2013).

O valor de K_{mapp} da EROD de *C. brasiliiana* é maior que o observado nos peixes: bagre do canal (1,8 μM), salmão do atlântico (0,2 μM) e truta arco-íris (0,6 μM) (GONZÁLEZ et al., 2009) e outros organismos vertebrados: pinguim (K_{m1} 51 nM), humano (K_m 788nM) e porco (K_{m1} 10 nM) (WANWIMOLRUK; WANWIMOLRUK, 2006; ZAMARATSKAIA; ZLABEK, 2009).

A constante K_m representa uma relação das constantes de dissociação e de formação do complexo enzima-substrato da seguinte forma: $(k_{-1}+k_2)/k_1$, em que k_1 representa a taxa de formação do complexo enzima-substrato a partir da enzima e do substrato livres, k_{-1} a taxa de dissociação desse complexo e k_2 a taxa de formação de produto e enzima livre a partir do complexo enzima-substrato (SEGEL, 1993). Assumindo que a constante de formação do produto (k_2) é insignificante em comparação com a constante de dissociação enzima-substrato ($k_2 \ll k_{-1}$),

o alto valor de K_{mapp} observado em ostras sugere que as enzimas CYP1-*like* responsáveis pela atividade enzimática possuem baixa afinidade (definida como k_{-1}/k_1) para 7-ER nessa espécie.

Inibidores da atividade enzimática de CYP1 foram testados para investigar se a atividade EROD é catalisada por uma enzima CYP1-*like*. A ELP é um inibidor clássico de CYP1A1 em humanos (HALPERT et al., 1994) e é sugerida como um inibidor de CYP1A2 (TASSANEYAKUL et al., 1993). A ELP inibe a atividade EROD em espécies de peixes (LEMAIARE; LIVINGSTONE, 1995, ROTCHELL; STEVENTON; BIRD, 2000) e inibiu a atividade de EROD em ambos os tecidos de *C. brasiliiana*, o que sugere que a atividade EROD seja catalisada por uma enzima CYP1A-*like*. A ELP atua como um inibidor não competitivo em ratos (AIMOVÁ; STIBOROVÁ, 2005) e a ausência de inibição total da atividade de EROD nas ostras na presença de ELP pode sugerir que mais de um membro CYP1-*like* metaboliza o substrato 7-ER, no qual um desses membros não seria inibido por ELP. Curiosamente, o transcriptoma de *C. brasiliiana* (LÜCHMANN et al., 2015) mostrou a existência de dois genes semelhantes a *CYP1A* de vertebrados e esses mesmos genes apresentaram níveis de transcritos maiores em organismos expostos à FAA do óleo diesel e ao PHE. Os produtos proteicos desses genes são candidatos à atividade EROD demonstradas neste estudo.

A FRF, um inibidor não competitivo de CYP1A2 em seres humanos (SESARDIC et al., 1990) e a ANF, um inibidor competitivo de CYP1A1 e CYP1A2 em humanos (CHANG; GONZALEZ; WAXMAN, 1994, KOLEY et al., 1997), não inibiram a atividade EROD. A ELP causou uma diminuição na atividade EROD enquanto que a FRF mostrou um potencial de inibição menor em peixes (ROTCHELL; STEVENTON; BIRD, 2000). Em brânquias de ostras, a presença de ANF no ensaio causou um aumento da atividade EROD, o que pode estar relacionado com uma ativação de enzimas do tipo CYP3A-*like*. Em mamíferos, foi demonstrado que a ANF pode se ligar e ativar seletivamente uma subpopulação de enzimas CYP3A, seguido por um aumento na hidroxilação de BaP (KOLEY, 1997). A falta de efeito inibitório dos inibidores clássicos de EROD de mamíferos pode ser

atribuída a diferenças estruturais nas enzimas CYP entre moluscos e outros *taxa* de animais.

Em um estudo de Zacchi (2017), realizado por nosso grupo de pesquisa, a atividade EROD foi avaliada nas brânquias de ostras expostas aos HPAs pireno e fluoreno e ostras expostas a 100 µg/L de pireno apresentaram maior atividade EROD em relação ao grupo controle, após 96 h. Apesar da indução da expressão de genes *CYP1* e atividade EROD ocorrerem algumas horas após a exposição à agonistas de AHR em peixes (GAO et al., 2011; PESONEN; GOKSOYR; ANDERSSON, 1992), em moluscos, o aumento na atividade EROD ocorre somente após 48 h de exposição (BINELLI et al., 2006).

Um aumento na atividade EROD foi observada em glândula digestiva de vieiras *Chlamys farreri* expostas por até 21 dias ao criseno (XIU et al., 2015), em mexilhões *Dreissera polymorpha* expostos por 96 h à mistura de PCBs Aroclor (BINELLI et al., 2006) e em brânquias de ostras *Crassostrea rhizophorae* transplantadas por 28 dias a locais do sistema estuarino de Santos, que apresenta intensa urbanização, atividade industrial e portuária (MARANHO et al., 2012). O aumento da atividade EROD em moluscos expostos aos xenobióticos sugere o potencial dessa enzima como biomarcador de contaminantes ambientais também nesse grupo de animais.

A indução da atividade EROD pelo pireno sugere o envolvimento de uma via de ativação do AHR nessa resposta, como ocorre em vertebrados (DENISON et al., 2011). A conservação desse mecanismo de resposta via AHR seria um indício de que a atividade EROD detectada nesses organismos seja codificada por genes *CYP1-like* que apresentam uma relação de homologia com *CYP1* de vertebrados. Entretanto, como discutido no capítulo III deste documento, **não há evidência** da existência de *CYP1* em invertebrados não deuterostômios e da relação evolutiva entre genes *CYP1-like* desses organismos com os *CYP1* de vertebrados (GOLDSTONE et al., 2007).

O papel exato das enzimas que catalisam a atividade EROD na biotransformação de HPAs ainda é desconhecido em ostras. Apesar da

detecção da atividade EROD nesses organismos, essa atividade enzimática é baixa em brânquias e glândula digestiva e não foi detectada no manto. Os resultados deste estudo sugerem que enzimas CYP1-*like* teriam uma capacidade limitada para metabolizar esses compostos. Apesar deste e de outros estudos indicarem que os bivalves possuem um sistema de biotransformação de xenobióticos responsivo a exposição de HPAs (LÜCHMANN et al., 2015, PIAZZA et al., 2016), isso não invalida o uso desses organismos como sentinelas da exposição à HPAs, considerando que sob condições naturais esses organismos sésseis estão sendo constantemente expostos aos xenobióticos.

2.5 CONCLUSÕES

Os dados apresentados neste trabalho possibilitaram as seguintes conclusões:

- Foi detectada a atividade EROD em microsomas de brânquias e glândula digestiva de *C. brasiliiana*, mas não no manto;
- Os parâmetros cinéticos revelaram um perfil típico de uma enzima que apresenta uma cinética de Michaelis-Menten, com baixa V_{max} e alto K_{mapp} em comparação com a atividade EROD de outros animais, o que poderia explicar o alto potencial de bioacumulação de HPAs nesses animais;
- Apesar da baixa atividade EROD, o estudo *in vitro* com inibidores de CYP1 indicou que uma enzima CYP1A-*like* provavelmente é responsável pela deetilação da 7-ER;
- Pela primeira vez o substrato 7-ER e os inibidores de CYP1 foram utilizados com sucesso para demonstrar a atividade de EROD em ostras.

3 CAPÍTULO III: GENES CITOCROMO P450 CANDIDATOS PARA A ATIVIDADE ETÓXI-RESORUFINA O-DEETILASE NA OSTRA *Crassostrea gigas**

Marília Nardelli Siebert^a, Jacó Joaquim Mattos^b, Guilherme Toledo-Silva^a, Guilherme Razzera^a, Afonso Celso Dias Bainy^a

^a Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica (LABCAI), Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

^b Núcleo de Estudos de Patologias Aquícolas (NEPAQ), Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

*Os dados deste capítulo estão no artigo de Siebert et al. (2017b), publicado na revista *Aquatic Toxicology*

RESUMO

As enzimas citocromo P450 da família 1 (CYP1) metabolizam compostos endógenos e xenobióticos nos animais vertebrados e geralmente apresentam sua expressão induzida por seus substratos. A atividade etóxi-resorufina *O*-deetilase (EROD) é um método utilizado para quantificar a atividade das enzimas CYP1 nesses organismos. Apesar da ausência dessa família gênica em animais protostômios, genes semelhantes a *CYP1* (*CYP1-like*) foram identificados em várias espécies desse grupo, embora nenhuma relação evolutiva com a família *CYP1* de vertebrados tenha sido estabelecida. No presente estudo, a atividade EROD foi avaliada na fração microsomal de brânquias, glândula digestiva e manto da ostra *Crassostrea gigas*. A atividade enzimática foi quantificada em brânquias, entretanto, nenhuma atividade foi detectada na glândula digestiva e no manto. A caracterização cinética da atividade EROD em brânquias pela equação de Michaelis-Menten demonstrou um K_m aparente de 1,15 μM e velocidade máxima de 229,2 $\text{fmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}\cdot\text{proteína}^{-1}$. A atividade EROD foi analisada na presença de inibidores de CYP1, elipticina (ELP), furafilina (FRF), clotrimazol (CTZ) e α -naftoflavona (ANF) e o surfactante não iônico Triton X-100. O CTZ inibiu a atividade EROD em todas as concentrações testadas, enquanto Triton X-100 (0,5 mM) causou 16% de inibição. Os níveis de transcritos de quatro genes *CYP1-like* foram determinados em brânquias, glândula digestiva e manto. Em geral, os genes *CYP1-like* apresentaram níveis de transcritos mais elevados nas brânquias em comparação com outros tecidos. Os níveis de transcritos de *CYP1-like 1* e *2*, analisados em conjunto, correlacionaram-se positivamente com a atividade EROD observada em brânquias, sugerindo o possível envolvimento desses dois produtos gênicos na atividade EROD nesse tecido. Os modelos de homologia feitos a partir das sequências deduzidas de aminoácidos de *CYP1-like 1* e *2* foram gerados com base na estrutura de CYP1A1 humana e foram semelhantes à estrutura geral de citocromo P450. A análise de ancoragem molecular demonstrou que as estruturas preditas de CYP1-

like de ostras têm potencial para metabolizar a 7-etóxi-resorufina (7-ER), embora a contribuição de outros genes *CYP1-like* não pode ser descartada. As proteínas codificadas pelos genes *CYP1-like 1* e *2* são candidatas plausíveis para a atividade de EROD observada em brânquias de *C. gigas*.

Palavras-chave: biotransformação de fase I. CYP1, citocromo P450. EROD. moluscos.

3.1 INTRODUÇÃO

A superfamília CYP é constituída por proteínas heme-tioladas encontradas em diversos organismos, como bactérias, fungos, plantas e animais, e que desempenham um papel importante na biossíntese de compostos endógenos e na biotransformação de xenobióticos (MEUNIER; DE VISSER; SHAIK, 2004; NELSON et al., 2013). Essas enzimas são monooxigenases que utilizam o oxigênio molecular como substrato, catalisando reações como C-hidroxilação, oxigenação de heteroátomos e liberação de heteroátomo (dealquilação) (DENISOV et al., 2005; ISIN; GUENGERICH, 2007). Nesse processo, os CYPs microssomais recebem equivalentes redutores de NADPH ou NADH por meio de um sistema de transporte de elétrons composto pelas enzimas NADPH-citocromo P450 redutase ou NADH-citocromo b5 redutase (HANNEMANN et al., 2007).

A família gênica *CYP1* de vertebrados é composta pelas subfamílias *CYP1A*, *CYP1B*, *CYP1C* e *CYP1D* (GOLDSTONE et al., 2009). As subfamílias *CYP1A* e *1B* estão presentes em todos os grupos de vertebrados, enquanto o gene *CYP1C* está ausente em mamíferos e o *CYP1D* em aves (GOLDSTONE et al., 2006; JÖNSSON et al., 2011; UNO et al., 2011). Além disso, existe variação na quantidade de genes dessas subfamílias nas diferentes classes de vertebrados (GOLDSTONE et al., 2007) e, ocasionalmente, entre espécies da mesma classe (IWAMOTO et al., 2012; JÖNSSON et al., 2011), refletindo a complexidade da história evolutiva da superfamília do CYP.

A família *CYP1* provavelmente se originou nos deuterostômios basais (GOLDSTONE et al., 2007) e ainda não foi descrita em nenhuma espécie de animais protostômios. Entretanto, vários estudos demonstram genes *CYP1-like* em grupos protostômios (DEJONG; WILSON, 2014, LÜCHMANN et al., 2015, ZANETTE et al., 2010) com base em semelhanças com genes *CYP1* de vertebrados, embora nenhuma relação de homologia tenha sido estabelecida. Em moluscos, genes *CYP1-like* foram identificados em *M. edulis*, *C. brasiliiana*, *C. gigas* e *C.*

virginica (JENNY et al., 2016; LÜCHMANN et al., 2015, ZANETTE et al., 2013, ZHANG et al., 2012).

As enzimas CYP1 metabolizam compostos endógenos como estradiol (LEE et al., 2003) e eicosanóides (CAPDEVILA; HARRIS; FALCK, 2002), assim como xenobióticos, incluindo HPAs (SHIMADA et al., 1996), arilaminas e aminas heterocíclicas (MCMANUS et al., 1990).

Os substratos de CYP1 também induzem a expressão do gene *CYP1*, pois essas substâncias, em geral, atuam como agonistas do AHR, conduzindo à ativação desse receptor e ao aumento na transcrição de genes-alvo, como o *CYP1* (DENISON et al., 2011; HAHN, 2002). Uma taxa de transcrição mais elevada de *CYP1* pode aumentar a síntese da enzima CYP1, culminando com uma maior taxa de biotransformação dos xenobióticos metabolizados por essa enzima (DENISON et al., 2002; HAHN, 2002). Esse padrão de indução pelo substrato, que leva a um aumento na atividade de enzimas CYP1, permite o uso da atividade dessas enzimas como biomarcadores clássicos da exposição à agonistas de AHR em vertebrados (CHAHIN et al., 2013; SCHLEZINGER; STEGEMAN, 2001). Apesar da presença de homólogos de AHR em espécies de protostômios, os genes-alvo do AHR e moléculas agonistas não foram identificados nesses organismos (BUTLER et al., 2001; HAHN, 2002; ZANETTE et al., 2013).

Além dos compostos que induzem a expressão de CYP1, existem substâncias que atuam como inibidores da atividade CYP1 e representam uma ferramenta importante para a caracterização *in vitro* dessas enzimas (HALPERT et al., 1994). Dentre esses inibidores, elipticina, furafilina e clotrimazol atuam como inibidores não competitivos de membros da família CYP1, enquanto que a α -naftoflavona compete com o substrato pelo sítio ativo das enzimas dessa família, agindo como inibidor competitivo (AIMOVÁ; STIBOROVÁ, 2005; BURKINA; ZLABEK; ZAMARATSKAIA, 2013; KOLEY et al., 1997; SESARDIC et al., 1990).

Vários métodos quantificam a atividade de CYP1 *in vitro* como a hidroxilação de benzo[a]pireno, a *O*-deetilação de fenacetina, a 4-

hidroxilação de 17- β Estradiol e a atividade de *O*-deetilação da 7-ER (CHANG; WAXMAN, 2006; TOMINGAS et al., 1973). Dentre esses métodos, a atividade EROD é um dos métodos mais comumente usados em estudos envolvendo a atividade de CYP1A. Nesse ensaio, a atividade enzimática é medida pela quantificação da resorufina formada como um produto da reação de *O*-deetilação de 7-etóxi-resorufina, cuja catálise é realizada pelas enzimas CYP1 (BURKE; MAYER, 1974).

Em humanos, todas as enzimas CYP1 apresentam atividade EROD, embora CYP1A1 tenha uma eficiência catalítica maior que CYP1B1 e CYP1A2 (SHIMADA et al., 1997). Essas diferenças são atribuídas principalmente a variações na composição de resíduos de aminoácidos no sítio ativo dessas enzimas e não a diferenças gerais da estrutura do CYP (LEWIS; MACKENZIE; MINERS, 2007). Vários grupos de invertebrados como Cnidaria, Mollusca e Arthropoda também apresentam atividade EROD (CHEAH et al., 1995, HARITOS et al., 1994; HEFFERNAN; WINSTON, 1998; REWITZ et al., 2006), embora essas atividades não tenham sido associadas a genes *CYP1-like*.

Em moluscos, a expressão de proteínas *CYP1-like* é desconhecida, uma vez que nesses organismos anticorpos anti-CYP1 de vertebrados apresentam reação cruzada com proteínas do citoesqueleto (GRØSVIK et al., 2006). No entanto, nesse grupo de organismos, foi demonstrada a atividade de BPH e atividade EROD, sendo ambos ensaios de quantificação da atividade enzimática de CYP1 (SCHLENCK; BUHLER, 1989; SEABRA-PEREIRA et al., 2014). Curiosamente, ostras da espécie *C. brasiliiana* apresentam atividade EROD em brânquias e glândula digestiva, enquanto que a atividade dessa enzima não foi demonstrada em *C. gigas* (SCHLENCK; BUHLER, 1989; SIEBERT et al., 2017a).

Tendo em vista a caracterização da atividade EROD em *C. brasiliiana* e a evidência de vários genes *CYP1-like* no genoma de *C. gigas*, o objetivo deste estudo foi continuar a investigar a atividade EROD em ostras do gênero *Crassostrea*. A atividade EROD e os níveis de transcritos de genes *CYP1-like* foram analisados em diferentes tecidos e análises *in*

silico de modelagem e de ancoragem molecular foram realizadas com as sequências de aminoácidos deduzidas de genes *CYP1-like*.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Químicos

Os reagentes 7-ER, resorufina, NADH, NADPH, metanol, DMSO, PMSF, Clotrimazol (CTZ), DTT, Triton X-100 e ANF foram adquiridos de Sigma-Aldrich (St Louis, EUA). ELP e FRF foram adquiridos de Santa Cruz Biotechnology (Dallas, EUA). Todos reagentes utilizados foram de qualidade analítica.

3.2.2 Preparo das frações citosólicas e microssomais

Indivíduos da espécie *C. gigas* (média de 100 mm, 2 anos de idade) foram obtidos, durante a primavera, em um cultivo de ostra de Florianópolis, Brasil. Brânquias, glândula digestiva e manto foram homogeneizados na proporção 1 g de tecido para 5 mL de tampão TRIS-HCl 0,1 M, pH 7,4 (contendo sacarose 0,5 M, KCl 0,15 M, DTT 1 mM e PMSF 0,1 mM). Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 9.000 g por 30 min a 4 °C e o sobrenadante resultante dessa centrifugação foi submetido a duas etapas de ultracentrifugação. A primeira dessas etapas consistiu na ultracentrifugação das amostras a 100.000 g por 70 min a 4 °C. Em seguida, a fração sobrenadante (citosólica) foi removida e as frações microssomais foram lavadas com 500 µL de tampão de homogeneização (sem DTT e PMSF), seguida de ultracentrifugação a 100.000 g por 30 min a 4 °C. A fração microssomal resultante foi ressuspendida em tampão TRIS-HCl 0,1 M, pH 7,4, contendo KCl 0,15 M e glicerol 20%. Os microssomas foram imediatamente usados nas análises (HODSON et al., 1991).

3.2.3 Atividade 7-etóxi-resorufina O-deetilase (EROD)

Ensaio Padrão: A atividade EROD foi quantificada nas frações microssomais utilizando placas pretas de 96 poços (*Greiner Bio-One Fluotrac™, flat bottom 96-well black plates*) por meio do ensaio adaptado de Burke e Mayer (1974). O ensaio foi realizado com a fração microssomal de brânquias, glândula digestiva ou manto (300 µg de proteína), tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4), NADPH 4 mM e 7-ER 10 µM, de acordo com Siebert et al. (2017a) e como descrito no capítulo II. A formação de resorufina foi quantificada utilizando o espectrofluorímetro Spectramax M5 com excitação a 530 nm, emissão a 585 nm, comprimento de onda de corte (*cutoff*) de 550 nm e PMT alto, por 30 min com intervalos de leitura de 1 min.

A atividade EROD foi normalizada pela concentração de proteínas determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), utilizando o kit BioRad™ protein assay da empresa BioRad, de acordo com as instruções do fabricante, a soro albumina bovina foi utilizada como padrão.

Uma curva padrão com concentrações conhecidas de resorufina foi realizada nas mesmas condições do ensaio cinético para transformar as unidades de fluorescência relativas (RFU) em fmol de resorufina. O estoque de resorufina foi diluído em metanol. A inclinação da reta foi obtida por regressão linear. O coeficiente de calibração e o cálculo da atividade EROD foi realizado como descrito no capítulo anterior e de acordo com Siebert et al. (2017a). A atividade foi apresentada como $\text{fmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}\cdot\text{proteína}^{-1}$ ou relativizada pela atividade do grupo controle respectivo.

Parâmetros cinéticos: a concentração final de 7-ER nos experimentos para determinação de K_{mapp} e V_{max} foram: 0,31; 0,62; 1,25; 2,5; 5,0; 10; 15 e 20 µM. Os parâmetros de Michaelis-Menten (K_{mapp} e V_{max}) foram calculados utilizando o programa GraphPad Prism 5.0 para Windows. O ajuste dos dados nos modelos cinéticos isoenzimático, de autoativação (equação de Hill) e inibição de substrato, além do modelo

de Michaelis-Menten foi analisado, utilizando o programa SigmaPlot Enzyme Kinetics 1.4 (**Figura 16**). O modelo cinético com melhor ajuste dos dados (maior valor de r^2) foi selecionado como aquele que melhor descreveu os dados.

Figura 16. Equações dos modelos cinéticos de Michaelis-Menten, isoenzimático, autoativação por substrato e inibição por substratos.

$$\text{Michaelis-Menten:} \quad V_0 = V_{max} \cdot \frac{[S]}{K_m + [S]}$$

$$\text{Cinética isoenzimática:} \quad V = \sum_{i=1}^n V_{max_i} \cdot \frac{[S]}{K_{m_i} + [S]}$$

$$\text{Autoativação por substrato:} \quad V = V_{max} \cdot \frac{[S]^n}{K' + [S]^n}$$

$$\text{Inibição por substrato:} \quad V = V_{max} \cdot \frac{[S]}{1 + \left(\frac{K_m}{[S]}\right) + \frac{[S]}{K_i}}$$

Ensaio com coenzimas e inibidores de CYP1: Foram testadas as coenzimas NADPH (4 mM), NADH (4 mM) ou NADH + NADPH (4 mM cada) nas condições de ensaio descritas acima. A atividade EROD foi quantificada na presença dos inibidores de CYP1 de vertebrados: elipticina (ELP), furafilina (FRF), clotrimazol (CTZ) e α -naftoflavona (ANF) e do surfactante não iônico Triton X-100. A concentração dos inibidores foi escolhida baseada em um estudo preliminar. ELP, ANF e FRF foram testados a uma concentração final de 0,1 mM e o Triton X-100 de 0,5 mM. CTZ foi analisado nas concentrações finais de 0,1, 0,2 e 0,3 mM. ELP, ANF e FRF foram diluídos em DMSO, enquanto CTZ foi diluído em metanol. Para cada caso, reações controle foram realizadas nas mesmas concentrações de DMSO ou metanol. A concentração final de DMSO e metanol nas reações foi abaixo de 0,25% e 2%, respectivamente. O Triton X-100 foi diluído em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4. Os ensaios com

ELP, CTZ, ANF e Triton X-100 foram realizados incubando-se 7-ER com a amostra e o inibidor ou o surfactante por 10 min a 30 °C, seguido da adição de NADPH. O ensaio com furafilina foi realizado incubando o inibidor com as amostras e NADPH por 10 min a 30 °C, seguida da adição de 7-ER. Os valores de atividade foram comparados às atividades dos ensaios respectivos sem a presença de inibidor pelo teste de ANOVA de uma via, seguida do teste complementar de Dunnett. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

3.2.4 Análise dos níveis de transcritos de CYP1-like

Seleção de genes e desenho dos iniciadores: uma busca pelo domínio funcional de P450 (código do domínio: PF00067.19, e-value $< 1.10^{-3}$) foi realizada nas sequências polipeptídicas de *C. gigas*, disponível no GenBank (www.ncbi.nih.gov) utilizando o servidor Pfam, versão 29.0 (<http://pfam.xfam.org/>). Como CYPs de eucariotos possuem em média 500 resíduos de amino ácidos (aa), proteínas menores que 300 aa foram excluídas das análises.

A busca por sequências de proteínas CYP1-like foi realizada após o alinhamento global das sequências CYP de *C. gigas* às sequências CYP1A1 (pdb|4I8V|A), CYP1A2 (pdb|2HI4|A) e CYP1B1 (pdb|3PM0|A) de humanos, utilizando o programa Muscle (EDGAR, 2004). Foram selecionadas as sequências com identidade acima de 25% com os membros de CYP1 humanos. Apenas sequências anotadas como *Cytochrome P450 1* foram empregadas para a análise. Foram desenhados iniciadores de oligonucleotídeos para as sequências CYP1-like 1, 2, 3, 4 e de genes candidatos a gene referência por meio do programa PrimerQuest® (Integrated DNA Technologies - IDT, <http://www.idtdna.com>). O nome hipotético das sequências, o número de acesso de GenBank e os iniciadores respectivos estão na **Tabela 1**.

Extração de RNA total e síntese de cDNA: os níveis de transcritos de quatro genes CYP1-like foram analisados em brânquias, glândula digestiva e manto de 11 ostras. Os tecidos analisados (100 mg) foram

removidos dos animais e imediatamente congelados em nitrogênio líquido. O RNA foi extraído utilizando o reagente QIAzol Lysis® (Qiagen, Germantown, EUA) seguindo o protocolo do fabricante. A concentração de RNA total de cada amostra foi determinada por espectrofotometria a 260 nm. Um µg de RNA de cada amostra foi utilizado para a síntese de cDNA por meio de transcrição reversa com o kit QuantiTect® Reverse Transcription (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante. As amostras foram diluídas e armazenadas a -20 °C.

Tabela 1. Gene (nome hipotético), número de acesso do GenBank para sequência de DNA codificante (CDS), número de acesso do GenBank para a sequência de proteína e sequência dos iniciadores utilizados para análise dos níveis de transcritos. F, iniciador *forward* e R, iniciador *reverse*

Gene	Acesso CDS	Acesso Proteína	Iniciadores
<i>CYP1-like 1</i>	XM_011442190.1	XP_011440492.1	F- GCCCACGGTTGTAATATGCGGTAAG
<i>CYP1-like 2</i>	XM_011458840.1	XP_011457142.1	R- GGCTCTTCATGTCGTTCAGACTCTTGAT
	XM_011458841.1	XP_011457143.1	
<i>CYP1-like 3</i>	JH815887.1	EKC22039.1	F- TCCATTGCTGGTCATCATGTGGAGAA R- AGGATCACTTGCAGGCTTCCATCTT
<i>CYP1-like 4</i>	XM_011453784.1	XP_011452086.1	F- TGTGGTTTCTCCTCAGTTCGCCGCTCTAT R- ATCCCTGCCAACAACTTGGTCCATCTC
28S	EKC22548.1	-	F- CCCTTCACAGCGACTTCTTTCTTA R- AAACCCGAGTGGCTACAGAG

Análise por PCR quantitativo em tempo real (qPCR): os níveis de transcritos foram analisados por qPCR utilizando o termociclador Rotor-Gene TM 600® (Qiagen). A eficiência das reações de qPCR foram determinadas para cada par de iniciador por meio de uma curva padrão de cDNA preparada a partir de um *pool* de amostras. Iniciadores cujas curvas de cDNA apresentaram r^2 maior que 0,97 e eficiências entre 95 e 105% foram considerados adequados para as análises. A especificidade dos iniciadores foi conferida pela presença de uma única temperatura

de *melting* ao final das reações de qPCR. O tamanho do produto de PCR foi verificado em gel de agarose 3%, TBE 1X. As reações de qPCR foram realizadas a partir de 100 ng de cDNA com o kit QuantiNova® SYBR Green PCR kit (Qiagen), seguindo as recomendações do fabricante, e analisadas no programa Rotor Gene 6000 Series. Genes candidatos a gene referência foram testados e analisados utilizando o método 2^{-Cq} (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008) e o gene *28S* foi selecionado para a normalização dos níveis de transcritos. Todos os dados estão relativizados pelos níveis de transcritos da brânquia. As informações dos genes candidatos a gene referência e seus respectivos resultados de nível de transcritos para cada tecido estão apresentados nas Informações Suplementares deste capítulo.

Os testes de D'Agostino & Pearson e Bartlett, respectivamente, foram utilizados para testar a normalidade e homocedasticidade dos dados. A análise de ANOVA de uma via seguida do teste complementar de Tukey foi aplicada para comparar as diferenças de níveis de transcritos entre os tecidos. As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$.

Correlação entre atividade EROD e os níveis de transcritos:

Paralelamente a análise dos níveis de transcritos, a atividade EROD individual foi obtida dos mesmos animais analisados por qPCR. As condições dos ensaios foram as mesmas descritas na seção 3.2.3. A análise de correlação entre a atividade EROD e os níveis de transcritos dos genes *CYP1-like* foi realizada pelo teste de correlação de Pearson, depois da confirmação que os dados apresentavam normalidade. A correlação foi considerada significativa para $p < 0,05$. As análises foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism 5.0.

3.2.5 Modelagem de CYP1-like por homologia e ancoragem molecular de 7-ER

As sequências de aminoácidos de *CYP1-like* de *C. gigas* foram obtidas no GenBank (**Tabela 1** para o número de acesso) e

separadamente alinhadas com sequências de CYP1 de vertebrados (**Tabela 3**, em Informações Suplementares) pelo programa Clustal Omega (SIEVERS et al., 2011). Os alinhamentos resultantes foram submetidos ao programa de modelagem por homologia SwissModel (ARNOLD et al., 2006) e os modelos foram construídos com base na estrutura de CYP1A1 humano resolvida por cristalografia (PDB:4I8V).

O desvio médio das raízes quadradas (RMSD - *Root mean square deviation*) entre cada modelo predito e o modelo humano foi estimado depois do alinhamento das duas estruturas por meio do método MUSTANG, disponível no programa YASARA (Yet Another Scientific Artificial Reality Application) versão 11.3.22 (KRIEGER; KORAIMANN; VRIEND, 2002). As estruturas preditas com identidade da sequência de aminoácidos <30% ou RMSD >0,40 não foram consideradas adequadas para a análise. Com base nesse critério, os modelos por homologia e a ancoragem molecular do substrato 7-ER foram realizados em CYP1-*like* 1 e 2.

Para o posicionamento do grupo heme dentro do sítio ativo das estruturas preditas de CYP1-*like* 1 e 2 de ostra, essas estruturas foram sobrepostas à estrutura CYP1A1 humano e o grupo heme das estruturas de CYP1-*like* foi definido como ocupando a mesma posição que em CYP1A1. A ligação entre a cadeia polipeptídica e o grupo heme foi realizada ligando-se covalentemente o átomo de ferro do heme e o enxofre do resíduo de cisteína C452 em ambos os modelos. Essas edições foram realizadas no programa Quimera UCSF (PETTERSEN et al., 2004).

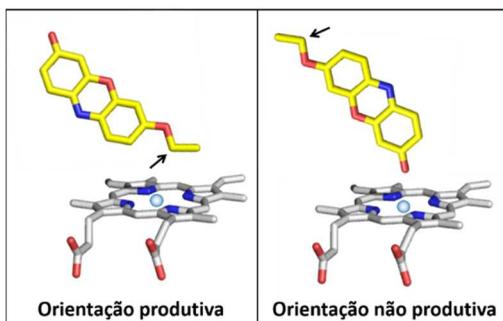
Em seguida, as estruturas foram minimizadas usando o mesmo programa, com as configurações padrões fornecidas, exceto para o resíduo de cisteína C452, que coordena o grupo heme, que foi considerado em estado não protonado. As cargas parciais foram atribuídas com base no modelo de carga Amber ff14SB Force Field e Gasteiger, o estado de oxidação do ferro do grupo heme foi considerado como +3, que é o estado de oxidação do ferro quando o substrato entra no sítio ativo (**Figura 4, passo B**).

As simulações de ancoragem molecular foram realizadas utilizando a 7-ER como ligante. A estrutura de 7-ER foi obtida na base de dados de ZINC versão 12 (IRWIN; SHOICHET, 2005), código de acesso ZINC03872522. A análise de ancoragem foi submetida ao programa Swiss Docking (GROSDIDIER; ZOETE; MICHIELIN, 2011), atribuindo 3 Å de flexibilidade para as cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos e ancoragem do tipo acurada. A região de ancoragem foi definida como um cubo de 1000 Å cúbicos ao redor do centro geométrico do ligante de CYP1A1 humano. Foram analisadas ligações com energia de ligação (ΔG) inferior a -6,00 kcal/mol.

A distância entre o átomo de ferro do heme e o carbono localizado na posição de oxidação do substrato 7-ER foi medida usando o programa UCSF Chimera (PETTERSEN et al., 2004). O carbono localizado na posição de oxidação foi considerado o átomo de carbono do grupo etil ligado ao oxigênio com função éter na molécula de 7-ER. As orientações de ligação foram consideradas produtivas quando o grupo etil do ligante 7-ER se orientou em direção ao ferro do grupo heme e a orientação não produtiva foi considerada quando o grupo etil da 7-ER estava orientado na direção oposta (**Figura 17**).

As interações resíduo-ligante dentro do sítio de ligação foram estimadas utilizando LigPlot + v.1.4 (LASKOWSKI; SWINDELLS, 2011).

Figura 17. Tipos de orientações do ligante 7-ER em relação ao ferro do grupo heme. A seta indica o carbono localizado na posição de oxidação na molécula de 7-ER.



3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Cinética da atividade EROD e análise dos níveis de transcritos de genes CYP1-like

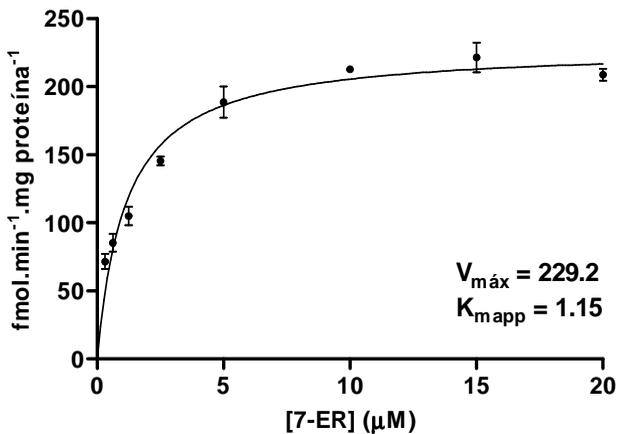
A atividade da EROD foi avaliada, inicialmente, na fração microsomal de brânquias, glândula digestiva e manto de *C. gigas*, entretanto, não foi detectada atividade na glândula digestiva e no manto. Assim, a caracterização cinética da atividade EROD foi realizada apenas nas brânquias, por meio da equação de Michaelis-Menten. O K_{mapp} e V_{max} da atividade EROD nas brânquias foi de 1,15 μM e 229,2 $\text{fmol}\cdot\text{min}^{-1}\text{ mg}\cdot\text{proteína}^{-1}$, respectivamente (**Figura 18**).

O K_{mapp} de *C. gigas* foi menor do que de *C. brasiliiana* (5,56 μM) (SIEBERT et al., 2017a) e peixes (bagre do canal 1,8 μM e tilápia 2,1 μM) (GONZÁLEZ et al., 2009), mas superior a outros organismos como o salmão do Atlântico (0,2 μM), pinguim (K_{m1} 51 nM) e humanos (788nM) (GONZÁLEZ et al., 2009; WANWIMOLRUK; WANWIMOLRUK, 2006). A V_{max} observada em *C. gigas* foi menor do que *C. brasiliiana*, peixes e outras espécies de vertebrados (GONZÁLEZ et al., 2009; WANWIMOLRUK; WANWIMOLRUK, 2006; ZAMARATSKAIA; ZLBEK, 2009). Dessa forma, a alta bioacumulação observada em moluscos é esperada devido à baixa atividade EROD, representada pelo baixo valor V_{max} , e a baixa concentração de metabólitos de HPAs, normalmente observada nesses organismos (BUSTAMANTE et al., 2012; LEÓN et al., 2013).

Nas brânquias de *C. gigas* também foi detectada a atividade de BPH, mas não se observou a atividade EROD (SCHLENK; BUHLER, 1989). As diferenças nos resultados encontrados nos estudos de Schlenk e Buhler (1989) e no presente estudo podem estar relacionadas a variações intraespecíficas, que podem incluir desde variações genéticas e gênicas até no nível de expressão das proteínas responsáveis por essa

atividade nas duas populações estudadas e/ou as abordagens metodológicas.

Figura 18. Atividade EROD em diferentes concentrações de 7-etóxi-resorufina (7-ER) na fração microsomal de brânquias de *C. gigas*. Os ensaios foram realizados com NADPH 4mM, pH 7,4, 30 °C. Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão (n=3 réplicas técnicas, pool de 11 animais). K_{mapp} : K_m aparente. V_{max} : Velocidade máxima.



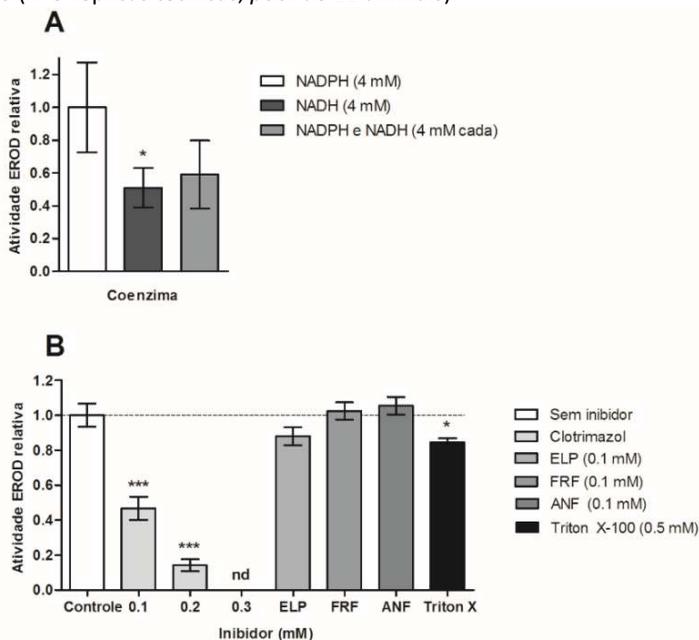
O modelo cinético isoenzimático demonstrou um melhor ajuste dos dados ($r^2 = 0,97$) do que o modelo clássico de Michaelis-Menten ($r^2 = 0,95$), sugerindo que diferentes populações de enzimas catalisam a deetilação do substrato 7-ER em brânquias. De fato, diferentes genes foram anotados como *CYP1-like* no genoma de *C. gigas* (ZHANG et al., 2012) e é possível que as proteínas codificadas por mais de um desses genes sejam responsáveis pela atividade EROD observada.

Os efeitos de NADH e NADPH na atividade EROD foram avaliados, uma vez que ambas as coenzimas podem atuar como doadores de elétrons durante o ciclo catalítico do CYP (**Figura 19A**). A atividade EROD quantificada na presença de NADH foi 51% da atividade quantificada com NADPH. Tanto o NADH como o NADPH podem doar elétrons para ativar o oxigênio molecular durante o ciclo catalítico do CYP (HANNEMANN et al., 2007; IYANAGI, 2005). Nesse processo, dois

elétrons podem ser transferidos do NADPH para CYP pela NADPH-citocromo P450 redutase ou dois elétrons podem ser transferidos a partir do NADH pela NADH-citocromo b5 redutase, um processo que envolve o citocromo b5. O citocromo b5 pode, alternativamente, transferir o segundo elétron da enzima NADPH-citocromo P450 redutase (HANNEMANN et al., 2007). Devido ao maior efeito do NADPH na atividade de EROD, a enzima NADPH-citocromo P450 redutase possivelmente tem um papel mais importante do que a NADH-citocromo b5 redutase na transferência de elétron para a atividade EROD em *C. gigas*.

Após verificar o efeito das coenzimas NADPH e NADH, o efeito dos inibidores de CYP1 ELP, FRF, CTZ, ANF e o surfactante não-iônico Triton X-100 na atividade EROD de *C. gigas* foi testado (**Figura 19B**).

Figura 19. Atividade EROD com diferentes coenzimas (A) e inibidores (B) na fração microsomal de brânquias de *C. gigas*. Os ensaios foram realizados com 10 μM de 7-ER, pH 7,4, 30 °C. Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão (n=3 réplicas técnicas, *pool* de 11 animais).



A ELP é um inibidor de membros da subfamília CYP1A em humanos (HALPERT et al., 1994; TASSANEEYAKUL et al., 1993) e atua como inibidor da atividade EROD em espécies de peixes e na ostra *C. brasiliiana* (LEMAIARE; LIVINGSTONE, 1995; ROTCHELL; STEVENTON; BIRD, 2000; SIEBERT et al., 2017a). Curiosamente, a ELP inibiu a atividade EROD em *C. brasiliiana*, mas não em *C. gigas*, indicando diferentes respostas de inibição entre as duas espécies de ostras.

A FRF, um inibidor não competitivo de CYP1A2 (SESARDIC et al., 1990), e ANF, um inibidor competitivo de CYP1A1 e CYP1A2 humanos (CHANG; GONZALEZ; WAXMAN, 1994; KOLEY et al., 1997), não inibiram a atividade EROD em *C. gigas*. O ANF atua como um inibidor competitivo em outras espécies e o efeito do ANF em diferentes concentrações de 7-ER foi testado, mas não foi observado um efeito inibitório dessa molécula na atividade EROD de ostra (dados não apresentados). A ausência de inibição por inibidores clássicos de atividade CYP1 de mamíferos pode ser atribuída a diferenças estruturais nas enzimas CYP entre moluscos e vertebrados.

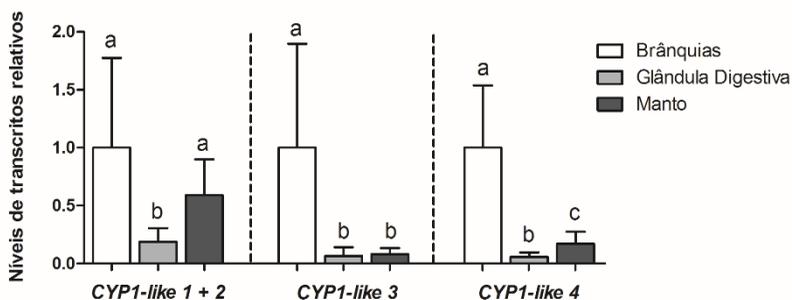
O CTZ inibiu a atividade EROD da ostra *C. gigas* em todas as concentrações testadas e na concentração mais alta testada, 0,3 mM, não foi detectada atividade EROD. A atividade EROD também foi inibida por CTZ em peixes (BURKINA; ZLABEK; ZAMARATSKAIA 2013; MIRANDA et al., 1998). O mecanismo inibitório pode ser não competitivo (BURKINA; ZLABEK; ZAMARATSKAIA, 2013) ou não competitivo misto (LEVINE; ORIS, 1999). O CTZ pode se ligar direta e reversivelmente ao grupo heme no sítio ativo de CYP, diminuindo a deetilação de 7-ER (LEVINE; CZONSYKA; ORIS, 1997). Esses resultados sugerem que a presença desse fungicida derivado do imidazol no ambiente aquático pode inibir a atividade CYP1-like em ostras *in vivo* e comprometer o sistema de biotransformação.

O Triton X-100 causou 16% de inibição na atividade EROD de *C. gigas*. Esse surfactante pode inibir a atividade EROD interagindo diretamente com a enzima CYP, como monômero, ou alterando a estrutura da membrana, como micelas (DA SILVA; MEIRELLES, 2004). A

concentração micelar crítica (CMC) de Triton X-100 é de cerca de 0,25 mM (TILLER et al., 1984), portanto na concentração testada (0,5 mM), as interações do surfactante ocorreram por meio da formação de micelas, possivelmente perturbando a estrutura da membrana lipídica dos microsomas contendo CYP e redutases associadas e comprometendo a transferência de elétrons entre essas enzimas.

A busca por genes *CYP1-like* no banco de sequências de *C. gigas* resultou na seleção de quatro sequências semelhantes à CYP1. Devido à elevada identidade (96%) entre as sequências de nucleotídeos de *CYP1-like 1* e *CYP1-like 2*, esses genes foram analisados em conjunto. Os níveis de transcritos de genes *CYP1-like* foram determinados em brânquias, glândula digestiva e manto (**Figura 20**) e, em geral, os genes *CYP1-like* apresentaram um nível de transcritos mais elevados nas brânquias. A análise de *CYP1-like 1 + 2* apresentou nível de transcritos mais elevado nas brânquias em relação à glândula digestiva, mas não ao manto. *CYP1-like 3* e *4* demonstraram níveis de transcritos mais elevados nas brânquias em relação à glândula digestiva e manto.

Figura 20. Níveis de transcritos de *CYP1-like 1 + 2*, *3* e *4* em brânquias, glândula digestiva e manto de *C. gigas*, normalizados pelo nível de transcritos de *28S*. Os níveis de transcritos foram analisados por qPCR e estão expressos relativos ao nível de transcritos das brânquias. Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão (n=11). A análise estatística realizada foi ANOVA de uma via, seguida do teste complementar de Tukey. Letras diferentes representam diferença significativa entre os tecidos, $p < 0,05$.



Níveis de transcritos de *CYP1-like* mais elevados nas brânquias corrobora com o padrão de atividade EROD dessa espécie, detectada apenas nas brânquias, e sugere que esse órgão pode ter um papel importante na biotransformação e detoxificação em *C. gigas*. Curiosamente, nessa espécie de ostra, as brânquias apresentam taxas altas de absorção, acumulação e depuração de HPAs em comparação com outros órgãos, como glândula digestiva e manto (BUSTAMANTE et al., 2012).

Além disso, o bivalve *M. edulis* demonstrou níveis de transcritos de genes *CYP1-like* mais elevados na glândula digestiva em comparação com as brânquias (ZANETTE et al., 2013), sugerindo que diferentes espécies de moluscos podem ter diferentes mecanismos reguladores da transcrição gênica de *CYP1-like* em diferentes tecidos.

A análise de correlação entre a atividade EROD e os níveis de transcritos de *CYP1-like* de cada indivíduo revelou uma correlação positiva entre a atividade EROD com os níveis de transcritos de *CYP1-like 1 + 2* ($r^2 = 0,75$; $p = 0,0005$) (**Figura 21**). Não foi observada correlação da atividade EROD com os níveis de transcritos de outros genes *CYP1-like*. A correlação entre *CYP1-like 1 + 2* com a EROD está de acordo com o modelo cinético isoenzimático que sugere a atuação de duas populações de enzimas na atividade EROD de *C. gigas*.

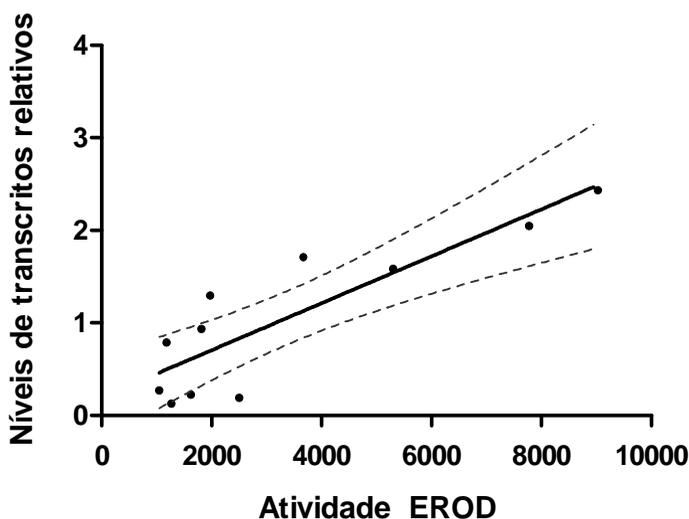
Entre os quatro genes *CYP1-like* analisados, os genes *CYP1-like 1* e *2* apresentam maior identidade da sequência deduzida de aminoácidos com CYP1A1 de humanos (respectivamente 35,21% e 34,56%). Esses resultados sugerem que as proteínas codificadas pelos genes *CYP1-like 1* e *2* são candidatas plausíveis para a catálise da atividade EROD em brânquias de *C. gigas*.

Análises estruturais

Os modelos de homologia de *CYP1-like* e a ancoragem molecular de 7-ER foram realizados com base na sequência de aminoácidos deduzida de *CYP1-like 1* e *2*.

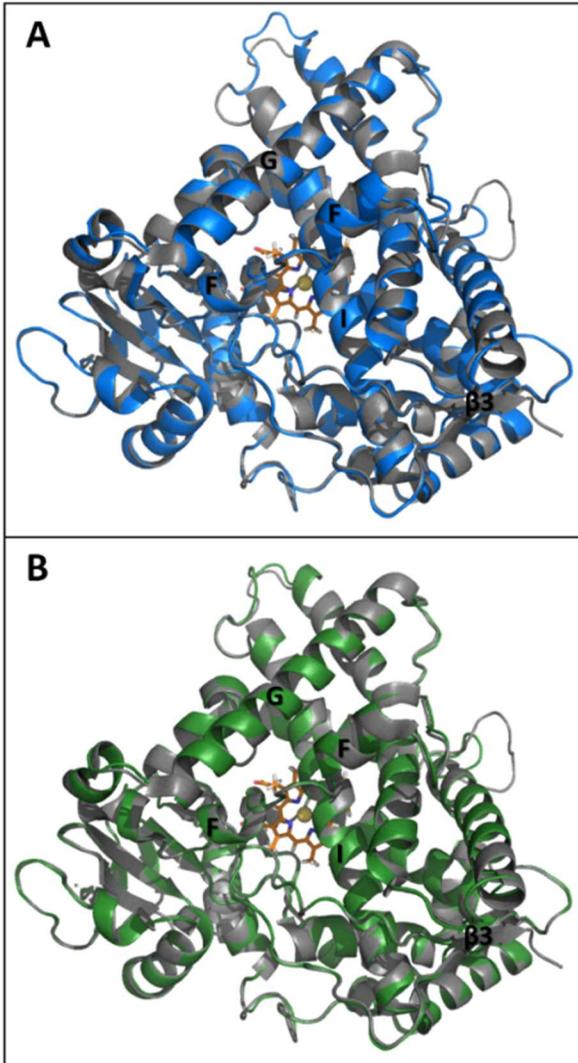
As estruturas preditas de CYP1-like 1 e 2 compartilham 94% de identidade em suas sequências de aminoácidos e as estruturas previstas foram muito semelhantes (**Figura 22A e B**). As estruturas preditas de CYP1-like 1 e 2 exibiram ambas 12 α -hélices e 2 folhas β , contrastando ligeiramente com o enovelamento geralmente apresentado por enzimas CYP, composto de 12 α -hélices e 4 folhas β (POULOS; JOHNSON, 2005).

Figura 21. Correlação entre a atividade EROD e os níveis de transcritos de *CYP1-like 1* e *CYP1-like 2* em brânquias de *C. gigas* (n=11; $r^2=-0,75$, $p=0,0005$). Para auxiliar na visualização, uma linha de regressão linear (linha em negrito) e os intervalos de confiança de 95% (linhas pontilhadas) estão representadas.



As α -hélices adicionais encontradas nos membros CYP1 humanos estão presentes em ambas as estruturas CYP1-like 1 e 2 de ostra. A ruptura da hélice F, observada na família CYP1 humana, também está presente em ambas as estruturas de ostra. A distorção causada por essa interrupção contribui para a distribuição espacial de resíduos na cavidade do sítio ativo (SANSEN et al., 2007, WANG et al., 2011).

Figura 22. Estrutura geral preditas de CYP1-like 1 e 2 de ostras *C. gigas*. **A.** Estrutura predita de CYP1-like 1 (azul) alinhada por átomos de carbonos α à estrutura de CYP1A1 humana (4i8v - cinza). **B.** Estrutura predita de CYP1-like 2 (verde) alinhada por átomos de carbonos α à estrutura de CYP1A1 humana (4i8v - cinza). Estruturas secundárias destacadas no texto estão demonstradas em ambos os modelos. O grupo heme está representado como bastões em cinza claro, a esfera central amarela representa o átomo de ferro.



As principais diferenças nas estruturas secundárias foram observadas nas folhas β , uma vez que as estruturas das ostras não possuem as folhas $\beta 3$ e $\beta 4$. A ausência da estrutura $\beta 3$ na ostra foi a maior diferença secundária observada entre as estruturas CYP1-*like* de ostra e CYP1 humana, já a folha $\beta 4$ também está ausente em CYP1A1 e CYP1A2 de humanos, enquanto que é observada em CYP1B1 (SANSEN et al., 2007; WALSH; SZKLARZ; SCOTT, 2013).

Entre os 22 resíduos que compõem a cavidade do sítio ativo do CYP1A1 humano, 15 são idênticos e estão localizados na mesma posição em CYP1-*like* 1 (68%) e 13 em CYP1-*like* 2 (59%) (**Tabela 2**). CYP1-*like* 1 e 2 de ostras diferem apenas em cinco resíduos que compõem o sítio ativo. Notavelmente, CYP1-*like* 1 e 2 diferem no resíduo 378. Esse resíduo ocupa a mesma posição do resíduo 382 em membros de CYP1A humanos e está relacionado com o metabolismo de alcóxi-resorufinas. A presença de leucina nessa posição em CYP1A2 humano (L382) aumenta o metabolismo de metóxi-resorufina, enquanto a presença do resíduo de valina em CYP1A1 (V382) está relacionada ao aumento do metabolismo de 7-ER (LIU et al., 2004, TU et al., 2008). Nos modelos preditos de ostra, CYP1-*like* 1 tem leucina na posição 378 e CYP1-*like* 2 tem valina, sugerindo que CYP1-*like* 1 pode ter um perfil catalítico mais semelhante ao CYP1A2 e CYP1-*like* 2 a CYP1A1 em relação às preferências por alcóxi-resorufinas.

CYP1-*like* 3 e 4 possuem, respectivamente, 26% e 25% de identidade com CYP1A1 humano e a identidade dos resíduos de aminoácidos que compõem a cavidade do sítio ativo é de apenas 18% (4 resíduos de 22) em CYP1-*like* 3 e 23% (5 de 22 resíduos) em CYP1-*like* 4. Portanto, CYP1-*like* 3 e 4 não foram considerados adequados para estudos de modelagem por homologia.

Tabela 2. Resíduos que compõem a cavidade do sítio ativo na estrutura de CYP1A1 de *Homo sapiens* (WALSH et al. 2013) e nas estruturas preditas de CYP1-like 1 e CYP1-like 2 de *C. gigas*. Cinza indica resíduos de mesma posição nas estruturas e com cadeia lateral com as mesmas características químicas em CYP1A1 e CYP1-like 1 ou CYP1-like 2.

CYP1A1 <i>H. sapiens</i>	CYP1 - like 1 <i>C. gigas</i>	CYP1-like 2 <i>C. gigas</i>
I115	L118	L118
S116	N119	N119
S120	S123	G123
S122	S125	S125
F123	F126	F126
N222	A217	A217
F224	F219	F219
G225	Q220	Q220
L254	L249	L249
N255	A250	V250
F258	F253	F253
L312	Q308	Q308
D313	D309	D309
G316	G312	G312
A317	A313	A313
F319	F315	F315
D320	D316	E316
T321	T317	T317
V382	L378	V378
I386	I382	I382
L496	L491	L491
T497	T492	S492

Análise in silico da ancoragem molecular de 7-ER em CYP1-like 1 e CYP1-like 2: Características em comum

As análises de ancoragem da molécula 7-ER demonstraram que esse ligante apresenta um encaixe plano contra a hélice I em todas as poses observadas, provavelmente devido à planaridade no sítio ativo, característica também observada em todos os membros humanos de CYP1 (**Figura 23**) (SANSEN et al., 2007; WALSH; SZKLARZ; SCOTT, 2013; WANG et al., 2011).

Ancoragem molecular de 7-ER em CYP1-like 1:

Cinco poses foram analisadas para a ancoragem molecular de 7-ER no modelo de CYP1-like 1, três dessas posem apresentaram o grupo etil da 7-ER orientado em direção ao ferro do grupo heme, orientação classificada como uma orientação produtiva, enquanto duas poses demonstraram o grupo etil da 7-ER na direção oposta, orientação não produtiva. Na pose de menor energia ($\Delta G = -7,8$ kcal/mol), que apresentou orientação produtiva, o átomo de carbono da 7-ER localizado na posição de oxidação está a 4,3 Å do ferro do heme (**Figura 23A**). Nesse estado, a 7-ER interage com dez resíduos no sítio de ligação de CYP1-like 1: S125, F126, F219, F253, Q308, D309, G312, A313, L378, L491 (**Figura 23A e Figura 25**).

A superfície do ligante pode interagir com a ligação peptídica planar entre os resíduos G312 e A313, localizada na hélice I, uma vez que foi observada uma interação semelhante do ligante ANF e análogos no sítio de ligação de CYP1A1, CYP1A2 e CYP1B1 humanos (SANSEN et al., 2007; WALSH; SZKLARZ; SCOTT, 2013; WANG et al., 2011). Além disso, no modelo CYP1-like 1 de ostra, as cadeias laterais hidrofóbicas dos resíduos F126, L491, L378 e F253 podem interagir por meio de força de Van der Waals com a 7-ER no sítio de ligação enquanto que a cadeia lateral do resíduo F219, localizado adjacente à quebra na hélice F, pode

interagir com a 7-ER por meio de empilhamento π - π (WALSH et al., 2013).

O sítio de ligação de CYP1-*like* 1 da ostra mostra a posição 308 ocupada por uma glutamina (Q308). Em CYP1A1, CYP1A2 e CYP1B1 humanos essa posição corresponde aos resíduos de leucina (L312), asparagina (N312) e treonina (T325), respectivamente (SANSEN et al., 2007; WALSH; SZKLARZ; SCOTT, 2013; WANG et al., 2011). Estudos mostraram que o mutante de CYP1A1 L312N mantém 42% da atividade EROD em relação ao tipo selvagem, indicando que a presença de um grupo amida na cadeia lateral de um resíduo nesta posição, como o da glutamina, pode interferir na atividade EROD (LIU et al., 2004). Assim, o grupo amida em Q308 pode afetar negativamente as propriedades catalíticas CYP1-*like* 1. A posição de S125 de CYP1-*like* 1 de ostra é homóloga a S122 em CYP1A1 e T124 em CYP1A2 de humanos. O mutante CYP1A1 S122T humano demonstrou um aumento significativo da atividade de EROD, enquanto que o mutante CYP1A2 T124S mostrou uma atividade reduzida de *O*-deetilação (LIU et al., 2004). Assim, a presença de um resíduo de serina nessa posição em CYP1-*like* 1 sugere uma atividade reduzida de *O*-deetilação em comparação com a presença de treonina.

Ancoragem molecular de 7-ER em CYP1-like 2:

Seis poses de ancoragem molecular da 7-ER no sítio de ligação de CYP1-*like* 2 foram analisadas. Duas dessas poses apresentaram orientação produtiva e quatro apresentaram orientação não produtiva. Na pose de menor energia ($\Delta G = -8,17$ kcal/mol), o átomo de carbono da 7-ER localizado na posição de oxidação está a 4,9 Å de distância do ferro do grupo heme, em orientação produtiva (**Figura 23B**). Nesta posição, os resíduos que interagem com a 7-ER são semelhantes aos de CYP1-*like* 1. Como em CYP1-*like* 1, os resíduos F126, F219, F253, Q308, D309, G312, A313 e L491 interagem com 7-ER (**Figura 23B** e **Figura 25**). Além desses resíduos, prevê-se que em CYP1-*like* 2 os resíduos N119 e E316 também

interajam com 7-ER. Em CYP1-like 2, a cadeia lateral do resíduo de asparagina (N119) possivelmente interage por meio de ligação de hidrogênio com o oxigênio de função cetona localizado na posição 3 do anel fenoxazina da 7-ER, enquanto o glutamato (E316) pode desempenhar um papel essencial na atividade catalítica, uma vez que se assume que o resíduo de aspartato encontrado na mesma posição em outro CYP esteja envolvido na cisão de ligação O-O (GERBER; SLIGAR, 1994).

Ancoragem molecular de 7-ER em CYP1A 1 humano comparado aos CYP1-like 1 e 2 de ostras.

O modelo por homologia e a ancoragem molecular de 7-ER também foram realizados com CYP1A1 humano, que demonstrou seis de um total de nove poses analisadas com uma orientação produtiva da 7-ER em relação ao grupo heme. Curiosamente, Walsh, Szklarz e Scott (2013) observaram uma mesma proporção de orientação produtiva/não produtiva na ancoragem molecular de 7-ER. No CYP1A1 humano, o átomo de carbono 7-ER localizado na posição de oxidação está a 4,8 Å de distância do ferro do heme na pose de menor energia analisada ($\Delta G = -8,07$ kcal/mol). Distâncias e ΔG semelhantes foram observadas na análise de ancoragem de 7-ER nas estruturas previstas de CYP1-like 1 e 2 de ostras, sugerindo o potencial de catálise da 7-ER por essas enzimas em *C. gigas*.

Os modelos de homologia e os resultados de ancoragem molecular mostraram duas estruturas semelhantes a CYP1 e com potencial para o metabolismo 7-ER em brânquias de ostras *C. gigas*. Ambas as proteínas CYP1-like compartilham vários resíduos de aminoácidos no sítio de ligação com membros de CYP1 humanos. Além disso, é importante destacar que os resíduos não conservados entre as enzimas de ostras e humanas, especialmente aqueles presentes no sítio de ligação, podem ser responsáveis por uma menor estabilidade de ligação da 7-ER, o que poderia contribuir para a baixa atividade de EROD

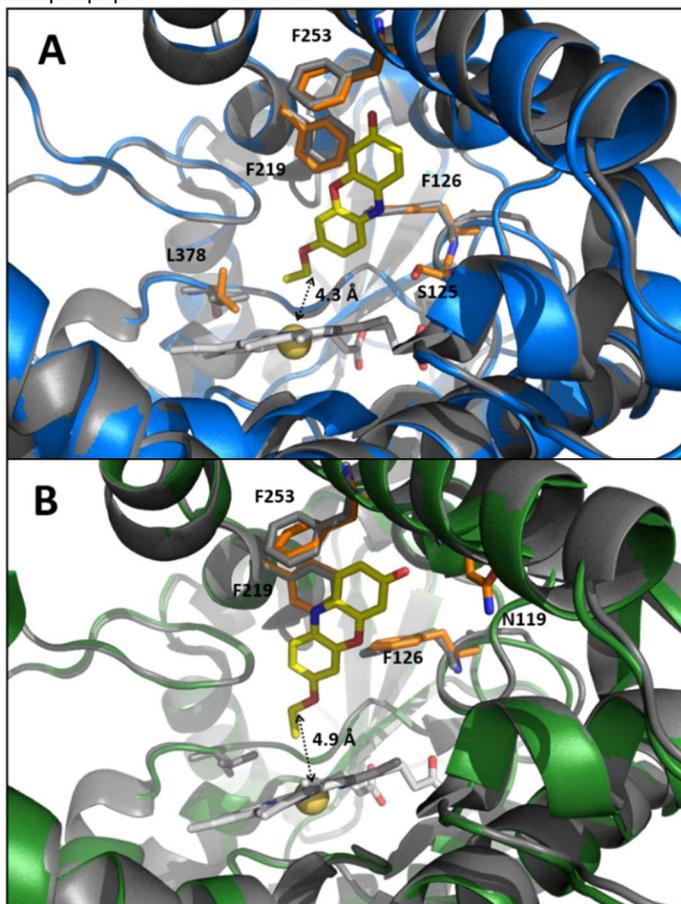
observada nesses organismos. A baixa atividade de EROD também pode ser explicada por uma baixa expressão das proteínas codificadas pelos genes *CYP1-like*, uma vez que os níveis de expressão de proteínas codificadas por esses genes são desconhecidos.

Apesar da família gênica *CYP1* ter possivelmente se originado em organismos deuterostômios basais (GOLDSTONE et al., 2007), as evidências de atividade de EROD em protostômios sugerem que possivelmente proteínas análogas à família *CYP1* de vertebrados desenvolveram um perfil catalítico semelhante nesses organismos. Esse perfil semelhante de atividade EROD foi observado em outros invertebrados (CHEAH et al., 1995; HARITOS et al., 1994; HEFFERNAN; WINSTON, 1998). No entanto, essa possível convergência bioquímica e a relação evolutiva entre *CYP1-like* de invertebrados e a família *CYP1* de vertebrados ainda não foi totalmente elucidada.

3.4 CONCLUSÕES

A atividade EROD observada em microsomas de brânquias de *C. gigas* correlacionou-se com os níveis de transcritos de *CYP1-like 1* e *CYP1-like 2*. Os modelos de homologia e os resultados de ancoragem molecular demonstraram que as estruturas putativas de *CYP1-like 1* e *2* possuem potencial para o metabolismo de 7-ER e o envolvimento desses dois produtos gênicos na atividade EROD é suportado pelo modelo cinético de isoenzima. Juntos, esses resultados sugerem que os produtos gênicos de *CYP1-like 1* e *CYP1-like 2* são candidatos plausíveis para realizar a atividade de EROD observada em brânquias de *C. gigas*. No entanto, a contribuição de produtos de outros genes *CYP1-like* na atividade EROD não pode ser descartada.

Figura 23. Ancoragem molecular de 7-ER nas estruturas preditas de CYP1-*like* 1 e 2 de ostras *C. gigas* **A.** CYP1-*like* 1 (azul) alinhado ao CYP1A1 humano (4i8v - cinza) com a pose de menor energia da ancoragem molecular da 7-ER. **B.** CYP1-*like* 2 (verde) alinhado ao CYP1A1 humano (4i8v - cinza) com a pose de menor energia da ancoragem molecular da 7-ER. O grupo heme está representado como bastões em cinza claro, a esfera central amarela representa o átomo de ferro. Setas indicam a distância entre o carbono da 7-ER localizado na posição de oxidação e o ferro do grupo heme. Os números de resíduos representam a sequência polipeptídica deduzida da ostra.



3.5 INFORMAÇÕES SUPLEMENTARES

Análise dos genes candidatos a gene referência

Os genes *28S*, *60S*, *ACT*, *ADP*, *EF*, *G3PDH*, *H2A* e *TUB* foram selecionados como candidatos a gene referência para normalizar a expressão dos genes alvo. O desenho dos iniciadores e as reações de qPCR foram realizados como descrito na seção de Materiais e Métodos deste capítulo. O código, o nome do gene, o número de acesso de GenBank e os iniciadores respectivos para cada gene candidato a gene referência estão na **Tabela 3**

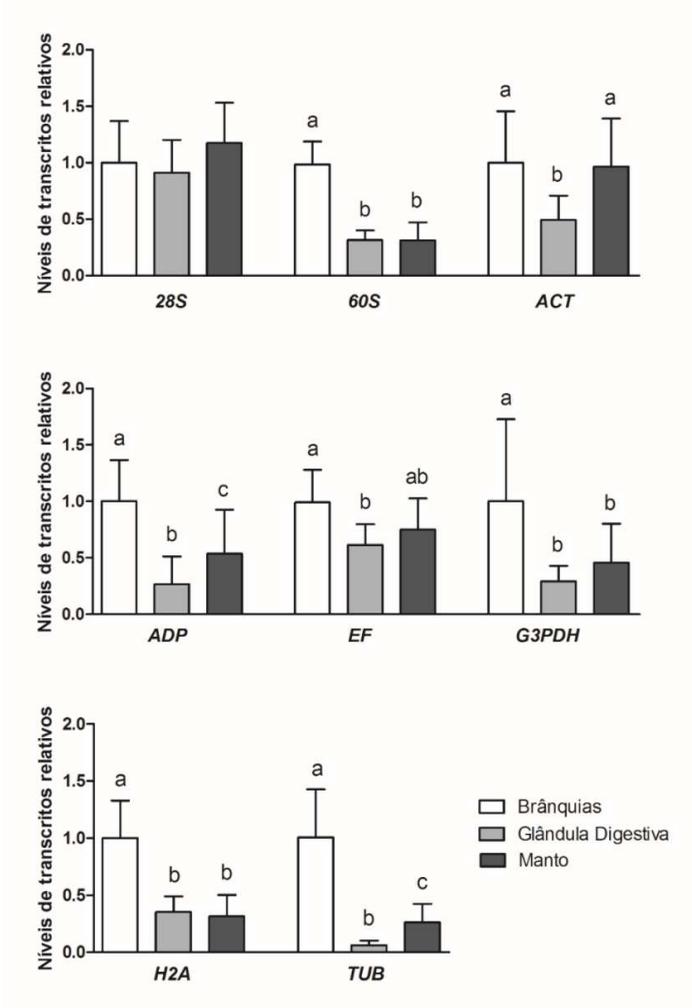
A variação no nível de transcritos dos genes foi testada e analisada por meio do método 2^{-Cq} (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008) e os dados estão apresentados relativizados pelo nível de transcritos das brânquias (**Figura 24**). Os testes de D'Agostino & Pearson e Bartlett, respectivamente, foram utilizadas para testar a normalidade e homocedasticidade dos dados. Após a confirmação da normalidade e homocedasticidade dos dados, aplicou-se o teste de ANOVA de uma via seguida do teste complementar de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$ e genes que apresentaram variação no nível de transcritos entre os tecidos não foram considerados gene referência.

Os níveis de transcritos dos genes *60S*, *ACT*, *ADP*, *EF*, *G3PDH*, *H2A* e *TUB* variaram de acordo com o tecido. Dessa forma, o gene *28S* ($p=0,22$) foi selecionado para a normalização dos níveis de transcritos.

Tabela 3. Código, nome do gene, número de acesso do GenBank e as sequências dos iniciadores utilizados para análise dos níveis de transcritos dos genes candidatos a gene referência. F, iniciador *forward* e R, iniciador *reverse*.

Código	Gene	Acesso GenBank	Iniciadores
<i>28S</i>	<i>rRNA 28S</i>	EKC22548.1	F –CCCTTCACAGCGACTTCTTTCTTA R –AAACCCGAGTGGCTACAGAG
<i>60S</i>	<i>Proteína ribossomal 60S L6</i>	XM_011419934.2	F- CATTCAAGCGTTCGGGCAATTTA R- TTGGTTACAGTCCATTCCATCTT
<i>ACT</i>	<i>Actina</i>	NM_001308859.1	F- GAGAGAAAATCGTCAGAGACATCAA R- GATGAGGATGAAGCAGCAGTAG
<i>ADP</i>	<i>Fator de ADP-ribosilação</i>	XM_020068907.1	F- GTCGTCATCATGCCCTTCTGATAC R- ATGACCTTGACCCTTCATCCT
<i>EF</i>	<i>Fator de elongação 1-alfa</i>	NM_001305313.1	F- TTCTGTGCAGCCTTGGTGACTTTG R- TATGGTCTCATGGTCCAGCAA
<i>G3PDH</i>	<i>Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase</i>	XM_011446602.2	F- GTCCAAGGATGGTGCTGAATAC R- GGGCAGAGATGATGACTTTCTTT
<i>H2A</i>	<i>Histona H2A</i>	EU152938.1	F- TGCCGATGAGTGACTTGTGAATATG R- TCAGAGGAGACGAAGAGTTGGATT
<i>TUB</i>	<i>Tubulina alfa-1A</i>	XM_011456384.2	F- ACAACTCCATTCTGACCACCCACTAC R- TCAATGTCCAGTTACGGCGACAGAT

Figura 24. Níveis de transcritos de *28S*, *60S*, *ACT*, *ADP*, *EF*, *G3PDH*, *H2A* e *TUB* em brânquias, glândula digestiva e manto de *C. gigas*. Os níveis de transcritos foram analisados por qPCR e estão expressos relativos ao nível de transcritos das brânquias. Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão ($n=11$). A análise estatística realizada foi ANOVA de uma via, seguida do teste complementar de Tukey. Letras diferentes representam diferença significativa entre os tecidos, $p < 0,05$.

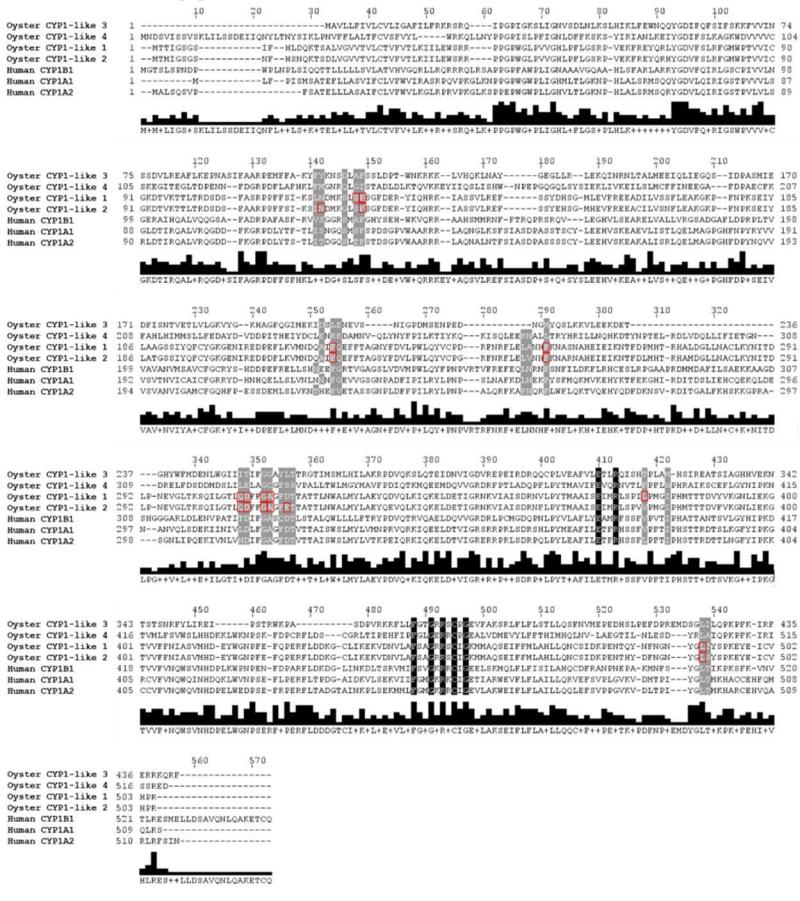


Informações adicionais sobre as análises in silico

Tabela 4. Espécie de vertebrado, isoforma de CYP1 e código de acesso do GenBank das seqüências de aminoácidos usadas no alinhamento da modelagem por homologia de CYP1-like de ostras *C. gigas*.

Espécie	Isoforma	Acesso do Genbank
<i>Bos taurus</i>	CYP1B1	NP_001179223.1
<i>Callithrix jacchus</i>	CYP1A2	NP_001191363.1
<i>Canis lupus familiaris</i>	CYP1B1	NP_001153156.1
<i>Danio rerio</i>	CYP1A1	NP_571954.1
<i>Danio rerio</i>	CYP1C1	NP_001018446.2
<i>Felis catus</i>	CYP1A1	NP_001020030.1
<i>Homo sapiens</i>	CYP1A1	4I8V
<i>Homo sapiens</i>	CYP1A2	2HI4
<i>Homo sapiens</i>	CYP1B1	3PM0
<i>Macaca mulatta</i>	CYP1D1	NP_001233600.1
<i>Macaca mulatta</i>	CYP1A1	NP_001035328.1
<i>Macaca mulatta</i>	CYP1B1	NP_001253797.1
<i>Mus musculus</i>	CYP1A1	NP_034122.1
<i>Mus musculus</i>	CYP1A2	NP_034123.1
<i>Mus musculus</i>	CYP1B1	NP_034124.1
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	CYP1C2	NP_001171961.1
<i>Pongo abelii</i>	CYP1A1	NP_001125460.1
<i>Rattus norvergicus</i>	CYP1A1	NP_036672.2
<i>Rattus norvergicus</i>	CYP1B1	NP_037072.1
<i>Sus scrofa</i>	CYP1A1	NP_999577.1

Figura 25. Alinhamento das seqüências de aminoácidos de CYP1A1, CYP1A2 e CYP1B1 de *Homo sapiens* e CYP1-like 1, 2, 3 e 4 de *C. gigas*. O alinhamento foi realizado com o programa Muscle (EDGAR, 2002) e a edição das cores com o programa Jalview 2.9.0b2 (WATERHOUSE et al., 2009). Cinza: resíduos de aminoácidos do sítio ativo de CYP1 humano e sítio ativo predito de CYP1-like de ostras. Preto: motivos conservados EXXR e FXXGXRXCXG de CYP. Caixas vermelhas: resíduos que interagem com a 7-ER no sítio ativo de CYP1-like 1 e CYP1-like 2 de *C. gigas*.



4 CAPÍTULO IV: NÍVEIS DE TRANSCRITOS E ATIVIDADES DE ENZIMAS DE BIOTRANSFORMAÇÃO EM OSTRAS *Crassostrea gigas* EXPOSTAS AO PIRENO E FLUORENO*

Marília N. Siebert^a, Flávia L. Zacchi^a, Jacó J. Mattos^b, Fabrício Flores-Nunes^a, Guilherme Toledo-Silva^a, Isis M. M. dos Reis^a, Clei E. Piazza^a, Silvio T. Sasaki^c, Márcia C. Bicego^c e Afonso C. D. Bainy^a

^a Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica (LABCAI), Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

^b Núcleo de Estudos de Patologias Aquícolas (NEPAQ), Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

^c Laboratório de Química Orgânica Marinha, Instituto Oceanográfico (IO), Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, Brasil.

*Este capítulo será submetido à revista *Aquatic Toxicology*, juntamente com os dados apresentados na tese da doutoranda Flávia Lucena Zacchi, do Programa de Pós-graduação em Aquicultura da UFSC, referentes à espécie *C. brasiliiana*. O delineamento experimental foi o mesmo para ambas as espécies, com o objetivo principal de comparar o padrão de respostas entre as duas espécies (*C. brasiliiana* e *C. gigas*).

RESUMO

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são um grupo de moléculas que constituem o petróleo e são considerados contaminantes ubíquos do ambiente aquático. Dentre os HPAs, o pireno e o fluoreno estão na lista dos 16 HPAs prioritários da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, sendo ambos detectados em abundância no petróleo e em locais contaminados. Devido à importância que moluscos bivalves possuem em programas de biomonitoramento e à lacuna que existe sobre o sistema de biotransformação nesses organismos, o objetivo deste trabalho foi investigar o efeito do pireno e fluoreno no nível de transcritos e na atividade de enzimas de biotransformação em ostras da espécie *Crassostrea gigas*. Ostras *C. gigas* foram expostas às concentrações de 50 e 100 µg/L de pireno ou de 100 e 200 µg/L de fluoreno por 24 e 96 h. Após esse período, os níveis de transcritos dos genes *CYP1-like*, *CYP2-like*, *CYP2AU2*, *CYP356A1*, *CYP17α-like*, *GSTΩ-like*, *GSTmic-like* e *SULT-like* e a atividade das enzimas de biotransformação etóxi-resorufina *O*-deetilase (EROD), Glutathione *S*-transferase (GST) total e GST microsomal (GSTmic) foram analisados nas brânquias desses animais. O tempo de meia-vida do pireno na água foi menor do que do fluoreno, o que possivelmente está relacionada com a menor solubilidade em água e maior lipofilicidade do pireno. A atividade EROD foi considerada abaixo do limite de detecção em todos os animais do experimento de exposição ao pireno e após 96 h de exposição ao fluoreno. A exposição ao pireno não teve efeito nos níveis de transcritos dos genes de biotransformação, mas a atividade GSTmic nos organismos expostos a 100 µg/L de pireno foi maior que nos demais grupos após 96 h de exposição, o que sugere um papel protetor contra o estresse oxidativo em brânquias desse grupo de animais. Os níveis de transcritos dos genes *CYP2AU2*, *GSTΩ-like* e *SULT-like* nos organismos expostos a 200 µg/L de fluoreno foi maior que nos demais grupos após 24 h de exposição, o que sugere que os produtos desses genes estejam envolvidos no metabolismo desse HPA. A exposição ao fluoreno não teve

efeito na atividade das enzimas EROD, GST total e GSTmic. O mecanismo pelo qual o fluoreno aumentou os níveis de transcritos não está claro, mas pode envolver a participação uma molécula xenosensora que regule a expressão desses genes.

Palavras-chave: bivalve. biotransformação. EROD. GST. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. Moluscos.

4.1 INTRODUÇÃO

Os HPAs são constituídos por dois ou mais anéis aromáticos fusionados e compõem um grupo de moléculas que constitui o petróleo (DOUBEN, 2003), sendo utilizados em combustíveis, asfalto, tintas, plásticos e em processos industriais, como na produção de pesticidas e fármacos (ABDEL-SHAFY; MANSOUR, 2015).

O amplo uso dos HPAs, somados aos processos de lixiviação de regiões urbanas, de extração e transporte de petróleo e afloramentos naturais tornam esses compostos contaminantes ubíquos do ambiente aquático (NRC, 2003). Nesses ambientes, os HPAs tornam-se rapidamente biodisponíveis e causam diversos efeitos deletérios aos organismos aquáticos, como efeitos genotóxicos e embriotóxicos (MITCHELMORE; CHIPMAN, 1998; PÉREZ-CADAHÍA et al., 2004; WESSEL et al., 2007).

Dentre os HPAs, o pireno e o fluoreno, ambos de baixo peso molecular e baixo ponto de fusão, estão na lista dos 16 HPAs considerados prioritários pela EPA (KEITH, 2014), sendo ambos detectados em abundância no petróleo (KERR et al., 1999) e em locais contaminados (VALAVANIDIS et al., 2008; XU et al., 2007).

A exposição de organismos aquáticos ao pireno ocasiona estresse oxidativo, efeitos fisiológicos, comportamentais, reprodutivos e no desenvolvimento embrionário (INCARDONA; COLLIER; SCHOLZ, 2004; JENSEN; NIELSEN; DAHLLÖF, 2008; OKAY et al., 2006; OLIVEIRA; GRAVATO; GUILHERMINO, 2012; OLIVEIRA et al., 2013; SHIRDEL et al., 2016; SUN et al., 2008; XIE et al., 2017). A exposição ao fluoreno causa nesses organismos diversos efeitos fisiológicos, comportamentais e em nível de população e comunidade (BOYLE et al., 1985; FINGER et al., 1985; GONÇALVES et al., 2008; SINAEL, 2013; THOMAS; WOFFORD; NEFF, 1981).

Os HPAs podem ser metabolizados pelas enzimas do sistema de biotransformação, constituído de enzimas de fase I e II. As enzimas de fase I são majoritariamente integrantes da superfamília CYP e catalisam

principalmente reações de hidroxilação de substratos hidrofóbicos (GUENGERICH; MACDONALD, 1984; ISIN; GUENGERICH, 2007), expondo ou gerando no metabólito sítios eletrofilicos para ação das enzimas de fase II (ZAMEK-GLISZCZYNSKI et al., 2006).

As enzimas de fase II catalisam reações de conjugação, assim, substratos endógenos hidrossolúveis são conjugados ao xenobiótico ou seu metabólito, tornando-o mais hidrossolúvel e facilmente excretado da célula (IYANAGI, 2007; OMIECINSKI et al., 2011). Entre as enzimas de fase II estão SULTs e GSTs (OMIECINSKI et al., 2011) que conjugam ao xenobiótico, respectivamente, o substrato sulfonato (SO_3^-) e glutationa (GSH) (BOARD; MENON, 2013; GAMAGE et al., 2006). Há ainda uma terceira fase no sistema de biotransformação que abrange proteínas transportadoras de membrana, que bombeiam para fora da célula o xenobiótico nativo ou seus metabólitos (BARD, 2000).

Devido à entrada constante de HPAs no ambiente aquático e aos efeitos deletérios causados por esses contaminantes, moluscos bivalves têm sido utilizados mundialmente em programas de biomonitoramento com a finalidade de monitorar a presença e os efeitos dos HPAs nesses ambientes (SCHÖNE; KRAUSE, 2016; THEBAULT et al., 2007). Os bivalves, como a ostra *C. gigas*, são preferencialmente utilizados por serem sésseis, filtradores e apresentarem ampla distribuição geográfica (SCHÖNE; KRAUSE, 2016).

Nos programas de biomonitoramento, as análises químicas de quantificação de contaminantes nos tecidos dos animais podem ser associadas às análises de alterações biológicas, que denotam exposição ou efeito (e.g. dano em biomoléculas) desses contaminantes nos organismos. Nesse contexto, as variações em níveis de transcritos, de expressão de proteínas e de atividades de enzimas do sistema de biotransformação são investigadas como alterações biológicas com potencial uso como biomarcadores da contaminação ambiental por HPAs e outros contaminantes (GAGNON; RAWSON, 2017; LU, WANG, ZHU, 2008; MATTOS et al., 2010; NANHGANG et al., 2010).

Apesar do sistema de biotransformação de xenobióticos em bivalves não estar completamente elucidado, vários estudos demonstraram a presença de genes e a atividade de enzimas de biotransformação nesses organismos (LUCHMANN et al., 2015; REWITZ et al., 2006; RUST et al., 2004; SCHLENK; BUHLER, 1989; SIEBERT et al., 2017a; SOLÉ; LIVINGSTONE, 2005; ZHANG et al., 2012). Além disso, a exposição a HPAs altera níveis de transcritos de genes de biotransformação em bivalves, como um maior nível de transcritos dos genes de fase I *CYP2AU1* e *CYP356A1* em brânquias de ostras *C. brasiliiana* expostas ao fenantreno e de genes de fase II, *GST Ω* e *SULT* em vieiras expostas a esse mesmo contaminante (LUCHMANN et al., 2014; PIAZZA et al., 2016). Somado a isso, variações na atividade de enzimas de biotransformação em resposta à exposição a HPAs também têm sido observadas nesses organismos, como uma maior atividade EROD em ostras *C. rhizophorae* transplantadas por 28 dias a locais com intensa urbanização, atividade industrial e portuária (MARANHO et al., 2012), em vieiras *C. farreri* expostas ao HPA criseno (XIU et al., 2015) e na atividade GST em ostras *C. brasiliiana* expostas à FAA do óleo diesel (LUCHMANN et al., 2011).

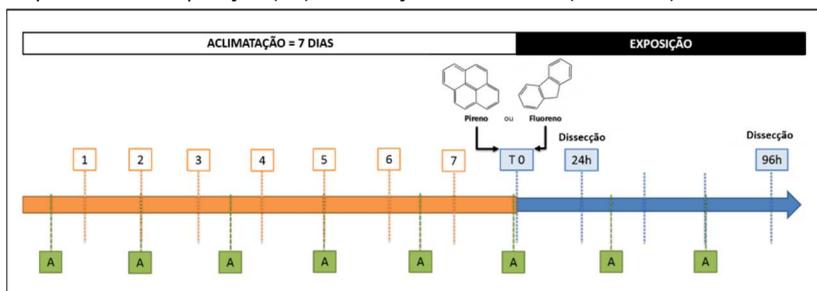
Estudos abordando especificamente o efeito que a exposição a cada HPA exerce em moluscos bivalves são escassos (BADO-NILLES et al., 2008; GAGNAIRE et al., 2006; LUCHMANN et al., 2014; PIAZZA et al., 2016). O estudo desses contaminantes separadamente permite elucidar mecanismos de ação dessas moléculas e prever possíveis efeitos em nível de organismo e população. A investigação dos efeitos desses contaminantes no nível de transcritos e atividade de enzimas do sistema de biotransformação auxilia na elucidação desses mecanismos em moluscos e representa uma oportunidade para a descoberta de novos biomarcadores bioquímicos e moleculares de exposição aos HPAs. Dessa forma, no presente estudo, buscou-se analisar o nível de transcritos e atividade de enzimas do sistema de biotransformação em ostras da espécie *C. gigas* expostas aos HPAs pireno e fluoreno.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Delineamento experimental

Ostras da espécie *C. gigas* ($10,0 \pm 1,8$ cm) foram obtidas em uma fazenda de cultivo de ostras de Florianópolis, SC, e aclimatadas por 7 dias em um sistema de recirculação de água (1000 L), em tanques de 150 L, temperatura de $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, salinidade 25, fotoperíodo de 12h: 12h, pH $7,8 \pm 0,1$ e amônia de 0 a $0,25\text{ mg/L}$. A alimentação foi realizada a cada 36 h com ração comercial Phyto B- Plus, em uma proporção de 200 milhões de células (*Nitzschia closterilum*, *Chaetoceros* sp., *Nannochloropsis oculata* e *Chlorella* sp.) por ostra, com tempo de alimentação de 2 h (**Figura 26**).

Figura 26. Linha do tempo do período de aclimação (laranja) e de exposição (azul) ao pireno ou fluoreno. Os animais foram alimentados a cada 36 h (verde). Os números em caixas laranja indicam dias. Os números em caixas azuis indicam os períodos de exposição (T0) e dissecação dos animais (24 e 96 h).



Fonte: SIEBERT, M. N., Adaptado de ZACCHI, F.L, 2017.

Após o período de 7 dias de aclimação, os animais foram expostos aos HPAs pireno (Aldrich 185515, 98% de pureza) ou fluoreno (Aldrich 128333, 98% de pureza), utilizando DMSO como solvente (Sigma D4540, >99,5% de pureza), em regime semi-estático. As ostras foram expostas a 50 e $100\text{ }\mu\text{g/L}$ de pireno (P50 e P100, respectivamente) ou 100 e $200\text{ }\mu\text{g/L}$ de fluoreno (F100 e F200, respectivamente) durante 24 e 96 h (**Figura 27**). Paralelamente aos aquários com animais expostos,

foram mantidos grupos controle para cada tempo de exposição, com a mesma concentração do solvente (DMSO 0,002%) (**Figura 27**). Todo o experimento foi realizado em triplicata, ou seja, três aquários independentes por grupo de exposição ou controle.

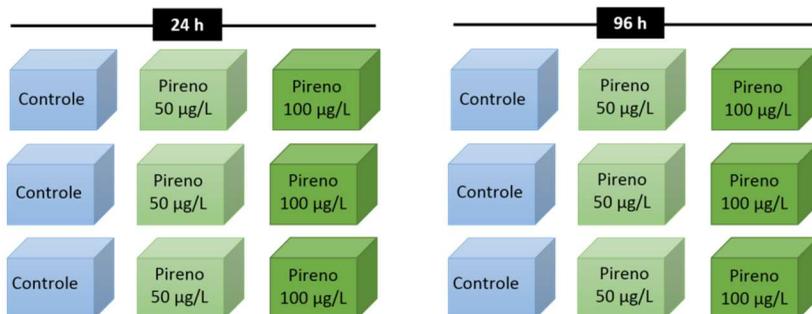
Para a exposição a cada HPA, os animais foram distribuídos em 18 aquários de vidros com seis animais por aquário (3L/ostra). Desses 18 aquários, nove formaram o grupo exposto por 24 h e nove formaram o grupo exposto por 96 h. Dos seis animais mantidos em cada aquário, quatro foram destinados às análises enzimáticas e de níveis de transcritos (n=9 para as análises enzimáticas e n=10 para análises de níveis de transcritos por tratamento) e dois às análises químicas (*pool* de seis animais por tratamento).

Durante a exposição, os animais foram mantidos a salinidade 25, temperatura de 20 °C ±1 °C, fotoperíodo de 12 h: 12 h e alimentação a cada 36 h. A alimentação durante a exposição seguiu o protocolo: **1)** a água com contaminante foi completamente retirada dos aquários; **2)** os aquários foram preenchidos com água do mar limpa (1L/ostra); **3)** os animais foram alimentados durante 2 h com Phyto B- Plus; **4)** após a alimentação, a água contendo a ração foi removida e cada aquário foi preenchido novamente com água do mar com as respectivas concentrações dos contaminantes. Em experimento piloto, através do monitoramento fluorimétrico desses HPAs, foi verificado que não ocorre a depuração dos HPAs durante o período de 2 h de alimentação. A manutenção da rotina de alimentação a cada 36 h permitiu que ambos os grupos dos tempos de exposição de 24 ou 96 h permanecessem 24 h em jejum antes da dissecação (**Figura 26**).

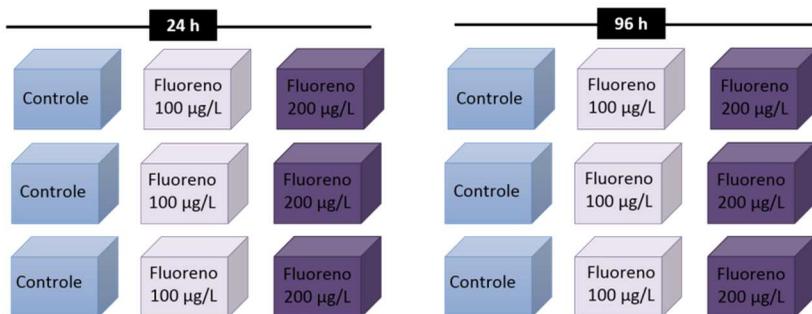
A fim de evitar a contaminação entre os aquários com diferentes tratamentos e a contaminação do ar, os três aquários de cada tratamento foram mantidos em caixas de madeira fechadas, contendo filtros para vapores orgânicos (**Figura 28**). A aeração foi mantida constante durante o período de exposição, com fonte de ar externa ao local de exposição.

Figura 27. Esquema de exposição de *C. gigas* ao pireno (A) e ao fluoreno (B). As ostras foram expostas durante 24 e 96 h às concentrações de 50 e 100 µg/L de pireno e de 100 e 200 µg/L de fluoreno (n=6 animais por aquário; desses animais, quatro por aquário destinados às análises de atividade enzimática e níveis de transcritos e dois para as análises químicas).

A. Desenho experimental da exposição ao Pireno



B. Desenho experimental da exposição ao Fluoreno



Os resíduos líquidos resultantes dos experimentos foram submetidos à filtração por carvão ativo. O projeto das caixas de vedação, o sistema de troca de água das unidades experimentais e de tratamento do resíduo líquido foi desenvolvido e executado pelo engenheiro de aquicultura Dr. Fabrício Flores Nunes.

Figura 28. Experimento de exposição de ostras *C. gigas* ao pireno e fluoreno. **A.** Acimação de ostras *C. gigas* em sistema de recirculação de água. **B.** Aspecto geral do Laboratório de Bioensaios durante os experimentos com aquários em caixas fechadas. **C.** Triplicata de aquários com ostras expostas a 100 µg/L de fluoreno por 96 h. **D.** Caixas de madeira com filtros para vapores orgânicos.



Após cada período de exposição, os animais destinados às análises enzimáticas e de níveis de transcritos foram mortos e tiveram suas brânquias removidas. 400 mg de tecido foram imediatamente processados para as análises enzimáticas e o restante de tecido foi congelado em nitrogênio líquido para análises de níveis de transcritos. Os animais destinados às análises químicas tiveram a parte mole removida e imediatamente congelada em um único *pool* para cada tratamento e tempo de exposição.

Paralelamente à exposição de *C. gigas*, foi realizada a exposição de ostras da espécie *C. brasiliana* aos mesmos HPAs. Os experimentos

de exposição de *C. brasiliensis* aos HPAs pireno e fluoreno integram a tese de doutorado de Flávia Lucena Zacchi, do Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, da Universidade Federal de Santa Catarina (ZACCHI, 2017). O objetivo principal da exposição simultânea das duas espécies foi comparar suas respostas em relação aos níveis de transcritos e atividade de enzimas de biotransformação após a exposição aos HPAs. Apesar dos experimentos de exposição terem sido realizados em conjunto, cada tese apresentará os resultados de apenas uma espécie. A aclimação e os experimentos de exposição foram realizados na Sala de Bioensaios do Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica da UFSC (Cadastro da Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA: BIO067).

4.2.2 Análises químicas

Monitoramento de pireno e fluoreno na água

A concentração de pireno e fluoreno na água dos aquários dos grupos controle e expostos foi monitorada por fluorimetria durante as primeiras 24 h de exposição. Paralelamente aos aquários com ostras, monitorou-se aquários mantidos nas mesmas condições experimentais (água do mar em salinidade 25, temperatura de 20 °C, DMSO 0,002%), mas sem ostras. O monitoramento fluorimétrico do pireno foi realizado em comprimento de onda de excitação de 270 nm e emissão de 382 nm e do fluoreno com excitação a 258 nm e emissão de 313 nm utilizando o espectrofluorímetro Spectramax M5, no módulo de leitura de cubeta, imediatamente após a coleta de 1 mL de água de cada aquário. As unidades de RFU obtidas foram transformadas em µg/L por regressão linear de uma curva padrão de pireno ou fluoreno, com concentrações de 6,25 a 800 µg/L, realizadas nas mesmas condições do experimento de exposição (água do mar em salinidade 25, temperatura de 20 °C, DMSO 0,002%). O monitoramento foi realizado durante 24 h, da seguinte forma: a cada 15 min na primeira hora após a exposição, incluindo o

momento da exposição (tempo zero); a cada 30 min nas 2 h subsequentes; a cada 1 h nas 3 h subsequentes; a cada 2 h até 12 h após a exposição e ao final de 24 h. A meia-vida dos HPAs nos aquários com ostras foi calculada baseada na equação de regressão exponencial.

Quantificação de HPAs nos tecidos das ostras

A quantificação dos HPAs foi realizada em *pool* de tecidos moles de 6 animais de cada tratamento após 24 h e 96 h de exposição e em um *pool* de 6 animais coletados imediatamente antes do início de cada experimento. As ostras foram homogeneizadas e processadas segundo MacLeod et al. (1986), com pequenas modificações. As amostras foram extraídas a partir de um grama de tecidos de ostras liofilizados (liofilizador Thermo Savant, Módulo D, Waltham) com n-hexano e diclorometano 50% (v/v) utilizando o aparelho Soxhlet durante 8 h. Antes da extração, foram adicionados os padrões internos: naftaleno-d₈, acenaftaleno-d₁₀, fenantreno-d₁₀, criseneno-d₁₂ e perileno-d₁₂ (5 ng μL^{-1}) a todas as amostras, brancos e referência (SRM 2974a – Organics in Freeze-Dried Mussel Tissue – *Mytilus edulis*). O extrato evaporado foi purificado em coluna de cromatografia de sílica (contendo 8 g de sílica gel sobre 16 g de alumina) e eluído em uma mistura de n-hexano e diclorometano (50%). O eluato foi concentrado e o padrão p-terfenil (5 ng μL^{-1}) foi adicionado. A determinação dos HPAs dos tecidos das ostras foi efetuada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) com modo de aquisição SIM (monitoramento seletivo de íons).

A identificação de fluoreno e pireno foi feita por comparação dos tempos de retenção com padrões de referência da Accustandard (New Haven, EUA) e Fluka (St Louis, EUA). Os compostos analisados no GC-MS também foram identificados através do íon de quantificação (razão massa/carga, m/z). A quantificação foi feita por razões entre os padrões internos e os compostos de interesse, baseada nas curvas analíticas

montadas com pelo menos 5 concentrações diferentes de cada grupo de compostos.

Essa análise foi realizada pelo Laboratório de Química Orgânica Marinha, Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, coordenado pela Prof^a. Dr^a. Márcia Caruso Bicego.

4.2.3 Análise dos níveis de transcritos

Seleção de genes e desenho dos iniciadores: foram utilizados iniciadores para os genes *CYP1-like*, *CYP2-like*, *CYP2AU2*, *CYP356A1*, *CYP17 α -like*, *GST Ω -like*, *GSTmic-like*, *SULT-like*, *28S*, *G3PDH* e *EF* (**Tabela 5**). Uma busca pelas sequências de genes envolvidos no sistema de biotransformação foi realizada no genoma de *C. gigas*, disponível no GenBank (www.ncbi.nih.gov). Foram desenhados iniciadores de oligonucleotídeos para as sequências de genes de fase I do sistema de biotransformação: *CYP2-like*, *CYP2AU2*, *CYP356A1*, *CYP17 α -like* e para as sequências de genes de fase II: *GST Ω -like*, *GSTmic-like* e *SULT-like*, por meio do programa PrimerQuest[®] (IDT, <http://www.idtdna.com>). Além desses, foram utilizados os iniciadores para os genes *CYP1-like 1* e 2 (neste capítulo referidos como *CYP1-like*) e para genes candidatos a referência *28S*, *G3PDH* e *EF* descritos no capítulo III.

Extração de RNA total e síntese de cDNA: a extração de RNA total e a síntese de cDNA foram realizados como descritos no capítulo III. A extração de RNA foi realizada a partir de 100 mg de brânquias, utilizando o reagente QIAzol Lysis[®] (Qiagen) e a síntese de cDNA foi realizada a partir de 1 μ g de RNA total com kit QuantiTect[®] Reverse Transcription (Qiagen), ambos os procedimentos seguiram as recomendações dos fabricantes. A concentração de RNA total e de cDNA para cada amostra foi determinada por espectrofotometria a 260 nm.

Análise por PCR quantitativo em tempo real (qPCR): os níveis de transcritos foram analisados a partir de 100 ng de cDNA com o kit QuantiNova[®] SYBR Green PCR kit (Qiagen), seguindo as recomendações

Tabela 5. Código e nome do gene, número de acesso do GenBank para sequência de DNA codificante (CDS) e sequência dos iniciadores. F, iniciador *forward* e R, iniciador *reverse*.

Código	Gene	Acesso GenBak	Iniciadores
<i>CYP1-like</i>	Citocromo P450 1A1-like	XM_011442190.1 XM_011458840.1 XM_011458841.1	F - GCCCACGGTTGTAATATGCGGTAAG R- GGCTCTTCATGTCGTTCCAGACTCTTGAT
<i>CYP2-like</i>	Citocromo P450 2B15-like	XM_011431418.1	F- ATCCTCGGTGTCGGCGATGAGTTT R- CGGTCCAGGAATGTCTGTTGATGGTGT
<i>CYP2AU2</i>	Citocromo P450 2AU2	XM_011436993.2	F- GCCACTTCTAGTCCATCTTACCTGC R- GCTCTTCGATTACTTCATTTGCGAACCC
<i>CYP356A1</i>	Citocromo P450 356A1	EF645271.1	F- TGAACCTTCCAGCCAGGAGTCAACA R- GGTCTGAACGAGGTGCGTATCATCCA
<i>CYP17α-like</i>	17 α - hidroxilase/ 17,20 liase-like	XM_011455885.1	F- AAGGACCAGAGCAATTTGACCCACATC R- CTGAGAATGGAAGCCAACCTTCCGGTTT
<i>GSTO-like</i>	Glutathione S- transferase ω 1-like	XM_011448982.1	F- CCGAACCTGACTGCTTACATGGAT R- TCTCGGAATCACTACAGTCCAACG
<i>GSTMic-like</i>	Glutathione S- transferase 3-like Microsomal	XM_011451463.1	F- TGGTTACTACACAGGAGATCCCAGCA R- GATGATGGAGCATACCAGCATTGTCAG
<i>SULT-like</i>	Sulfotransferase- like	XM_011438750.1	F- CAGGTGCCGATGGTGTCTAGTT R- CGAGACAATCACGTCTTTGGGATTCTCG
28S	rRNA 28S	EKC22548.1	F -CCCTTCACAGCGACTTCTTTCTTA R -AAACCCGAGTGGCTACAGAG
<i>EF</i>	Fator de elongação 1-alfa	NM_001305313.1	F- TTCTGTGCAGCCTTGGTGACTTTG R- TATGGTCTCATGGTCCCAGCAA
<i>G3PDH</i>	Gliceraldeído 3- fosfato desidrogenase	XM_011446602.2	F- GTCCAAGGATGGTGCTGAATAC R- GGGCAGAGATGATGACTTCTTT

do fabricante, utilizando o termociclador Rotor-Gene TM 600 (Qiagen) e analisados no programa Rotor Gene 6000 Series Software. A eficiência das reações de qPCR foi determinada para cada par de iniciador por uma curva padrão de cDNA preparada a partir de um *pool* de amostras, que incluiu amostras de todos os grupos de exposição, com reações nas seguintes quantidades de cDNA: 25, 50, 100, 200 e 400 ng. Todos os iniciadores utilizados apresentaram curvas de cDNA com r^2 maior que 0,97 e eficiências entre 95 e 105% e foram considerados adequados para as análises. A especificidade dos iniciadores foi conferida pela presença de *amplicons* com uma única temperatura de *melting* ao final das reações de qPCR e o tamanho do produto de PCR foi verificado em gel de agarose 3%, TBE 1X e comparada com um marcador de massa molecular de 100 bp.

Genes candidatos a gene referência foram testados e analisados utilizando o método 2^{-Cq} (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008) e a média geométrica entre os genes EF e G3PDH foi utilizada para a normalização dos níveis de transcritos em ambos os experimentos de exposição ao pireno e ao fluoreno. Para cada tempo de exposição, os níveis de transcritos estão relativizados pelo nível de transcritos do grupo controle.

As informações dos genes candidatos a gene referência e seus respectivos resultados de níveis de transcritos para cada tratamento estão apresentados nas Informações Suplementares deste capítulo

4.2.4 Análises enzimáticas

Preparo das amostras: Imediatamente após a dissecação dos animais, 400 mg de brânquia de cada ostra foram homogeneizadas como descrito no capítulo III: em tampão TRIS-HCl 0,1 M, pH 7,4 (contendo sacarose 0,5 M, KCl 0,15 M, DTT 1 mM e PMSF 0,1 mM), na proporção 1 g de tecido para 5 mL de tampão, seguida de centrifugação a 9.000 g por 30 min a 4 °C. O sobrenadante resultante foi submetido à ultracentrifugação a 100.000 g por 70 min, a 4 °C. Em seguida, a fração

sobrenadante (citossólica) foi removida e armazenada a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posterior dosagem de atividade de GST total e proteínas totais. A fração microssomal foi lavada com $500\text{ }\mu\text{L}$ de tampão de homogeneização (sem DTT e PMSF), seguida de ultracentrifugação a 100.000 g por 30 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. A fração microssomal resultante foi ressuspendida em tampão TRIS-HCl $0,1\text{ M}$, pH $7,4$, contendo KCl $0,15\text{ M}$ e Glicerol 20% . Essa fração foi imediatamente usada nas análises de atividade EROD e em seguida armazenada a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para análise de GSTmic e proteínas totais.

Atividade EROD: Essa enzima foi quantificada a partir das frações microssomais das brânquias em microplaca de 96 poços, como descrito no capítulo III. Resumidamente, as reações foram realizadas em tampão fosfato $0,1\text{ M}$ (pH $7,4$) contendo NADPH 4 mM e 7-ER $10\text{ }\mu\text{M}$ e a formação de resorufina foi quantificada com Ex 530 nm /Em 585 nm . As unidades de fluorescência relativa (RFU) foram transformadas em fmol de resorufina a partir de uma curva padrão de resorufina e a atividade foi normalizada pela concentração de proteínas.

Atividade Glutathiona S-transferase (GST) total e microssomal (GSTmic): A atividade de GST total e GSTmic foram determinadas a partir das frações citossólicas e microssomais, respectivamente. A atividade GST foi quantificada de acordo com Keen et al. (1976), utilizando 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) como substrato. Nesse ensaio, a conjugação de glutathiona reduzida (GSH) com o CDNB, catalisada pela enzima GST, produz um composto (GS-DNB) que pode ser detectado em 340 nm ($\epsilon=9,6\text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). O ensaio foi realizado em tampão fosfato de potássio $0,1\text{ M}$, pH $7,0$, com EDTA 1 mM e GSH 1 mM . Para iniciar a reação, foi adicionado 1 mM de CDNB e a cinética da reação foi monitorada a 340 nm , por 5 min a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Proteínas totais: As atividades enzimáticas foram normalizadas pela quantidade de proteínas totais determinadas em cada fração (citossólica ou microssomal). A quantificação de proteínas totais foi realizada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), utilizando o kit BioRad TM Protein Assay, de acordo com as instruções do fabricante. A soro albumina bovina foi utilizada como padrão.

4.2.5 Análises estatísticas

Os pressupostos de normalidade e homocedasticidade dos dados de nível de transcritos e de atividade enzimática foram testados para a aplicação dos testes paramétricos. Quando os dados não se ajustaram à curva normal ou apresentaram variâncias heterogêneas entre os grupos (heterocedásticos), foram aplicados testes estatísticos não-paramétricos.

Os dados inicialmente foram submetidos ao teste de Grubbs para remoção de valores discrepantes (*outliers*) e, em seguida, foram submetidos ao teste de normalidade de D'Agostino e Pearson e homocedasticidade de Levene. Dados que não apresentaram distribuição normal e/ou homocedasticidade foram transformados considerando $Y=\log Y$ e novamente submetidos aos testes de normalidades e homocedasticidade. Após cumprir os requisitos para as análises estatísticas paramétricas, foi realizado o teste paramétrico ANOVA de uma via, seguido do teste de comparação múltipla de Tukey. Quando a premissa de normalidade ou homocedasticidade não foi cumprida, o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do teste *post hoc* de Dunn's foi aplicado. Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. As análises foram realizadas nos programas GraphPad Prism 5.0 e Statistica 13.0 e de acordo com Sokal e Rohlf (2012).

4.3 RESULTADOS

Análises químicas

Ostras da espécie *C. gigas* foram expostas a duas concentrações de pireno (50 e 100 µg/L) ou de fluoreno (100 e 200 µg/L) por 24 e 96 h para analisar o efeito que a exposição aos HPAs exerce nos níveis de transcritos e nas atividades de enzimas de biotransformação nas brânquias desses organismos. A concentração do pireno e fluoreno na

água do mar foi monitorada nas primeiras 24 h de exposição nos aquários dos animais expostos aos HPAs e nos aquários controle (**Figura 29A e B**, respectivamente).

Após 24 h, a concentração de pireno nos aquários com ostras expostas a 50 e 100 µg/L de pireno foi de $1,99 \pm 1,27$ e $4,99 \pm 1,32$ µg/L, respectivamente, e nos aquários com ostras expostas a 100 e 200 µg/L de fluoreno foi de $5,50 \pm 0,3$ e $13,89 \pm 0,15$ µg/L, respectivamente. O tempo de meia-vida do pireno na água dos aquários com ostras expostas a esse contaminante foi em média 54,9 min e ao fluoreno de 78,2 min (**Tabela 6**).

Após 24 h de exposição ao pireno, a quantificação desse HPA nos tecidos dos animais foi de 37,88 µg/g de tecido seco no grupo exposto a 50 µg/L e 55,07 µg/g de tecido seco no grupo exposto a 100 µg/L. Após 96 h de exposição a esse contaminante, a concentração de pireno nos tecidos foi 49,66 e 93,34 µg/g de tecido seco nos animais expostos a 50 µg/L e 100 µg/L, respectivamente (**Figura 30A**).

Após 24 h de exposição ao fluoreno, a quantificação desse HPA nos tecidos foi de 10,10 µg/g de tecido seco no grupo exposto a 100 µg/L e 11,10 µg/g de tecido seco no grupo exposto a 200 µg/L. Após 96 h de exposição, a concentração de fluoreno nos tecidos foi 29,53 e 39,07 µg/g de tecido seco nos animais expostos a 100 µg/L e 200 µg/L, respectivamente (**Figura 30B**). A concentração de ambos HPAs nos grupos controles e no tempo zero (T0) foi inferior a 1 µg/g de tecido seco em todos os tempos e tratamentos.

Análises dos níveis de transcritos

Os níveis de transcritos de oito genes envolvidos no sistema de biotransformação (*CYP1-like*, *CYP2-like*, *CYP2AU2*, *CYP356A1*, *CYP17 α -like*, *GST Ω -like*, *GSTmic-like* e *SULT-like*) foram analisados nas brânquias das ostras expostas ao pireno e fluoreno por 24 e 96 h.

Os transcritos dos genes de fase I e II não foram alterados em resposta à exposição ao pireno nos dois períodos de exposição (**Figura 31 e 32**, respectivamente).

Figura 29. Monitoramento fluorimétrico de HPAs em aquários com 50 $\mu\text{g/L}$ (P50) ou 100 $\mu\text{g/L}$ (P100) de pireno (A) e em aquários com 100 $\mu\text{g/L}$ (F100) ou 200 $\mu\text{g/L}$ (F200) de fluoreno (B) por 24 h, e respectivos grupos controle. Os aquários com ostras continham seis ostras da espécie *C. gigas*, 18L/aquário, paralelamente, foram monitorados aquários sem ostras nas mesmas concentrações dos HPAs. Os valores dos aquários com ostras representam média \pm desvio padrão de três aquários.

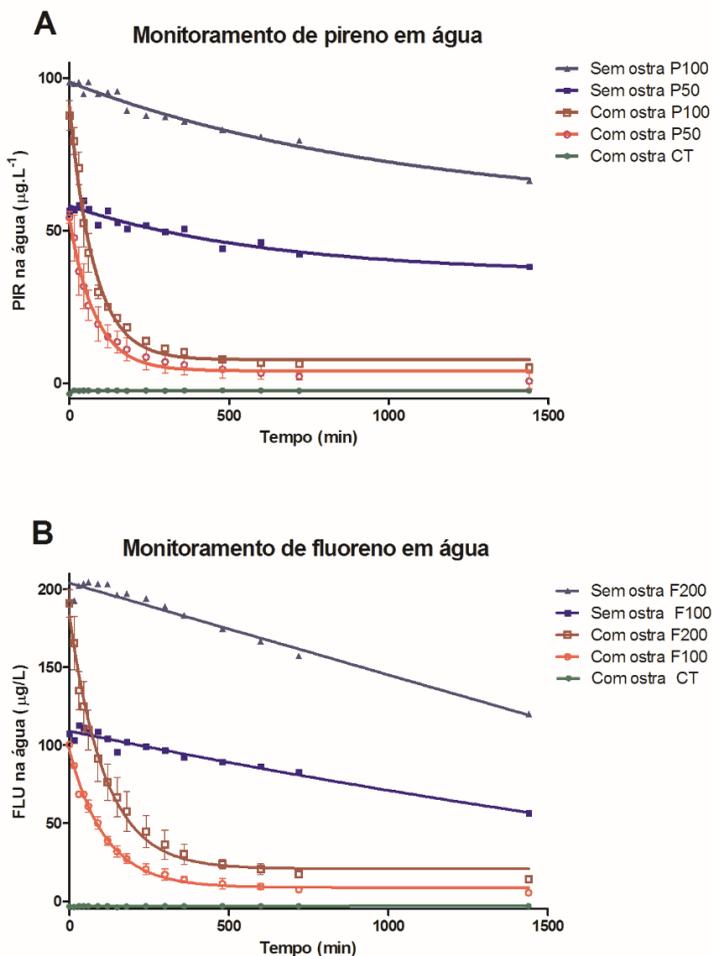
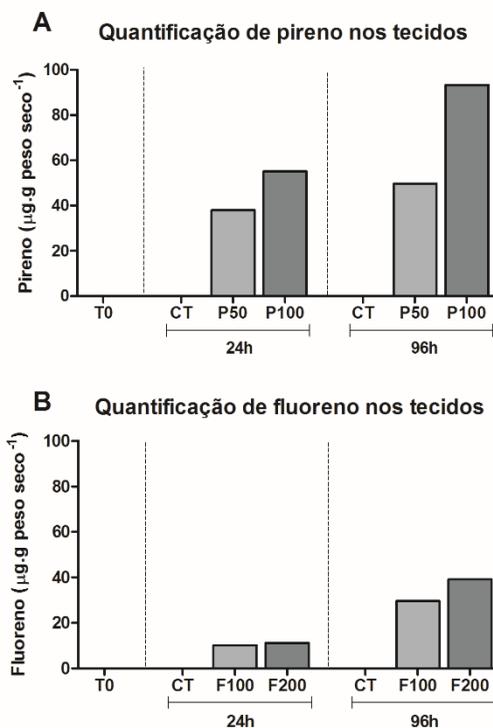


Tabela 6. Tempo de meia-vida médio de pireno e fluoreno nos aquários com ostras *C. gigas* e ajuste dos dados (r^2). Os aquários continham seis ostras da espécie *C. gigas*, 18L/aquário.

<i>Tratamento do Aquário</i>	<i>Meia-vida (min)</i>	r^2
Pireno 50 $\mu\text{g/L}$	55,7	0,94
Pireno 100 $\mu\text{g/L}$	54,0	0,98
Fluoreno 100 $\mu\text{g L}$	78,9	0,99
Fluoreno 200 $\mu\text{g/L}$	77,5	0,97

Figura 30. Quantificação de pireno e fluoreno nos tecidos das ostras *C. gigas* expostas por 24 e 96h a 50 $\mu\text{g/L}$ (P50) ou 100 $\mu\text{g/L}$ (P100) de pireno (A) e a 100 $\mu\text{g/L}$ (F100) ou 200 $\mu\text{g/L}$ (F200) de fluoreno (B) e respectivo grupo controle (CT). T0 representa ostras coletadas no início dos experimentos. A análise foi realizada em um *pool* de seis ostras para cada grupo.



Nas brânquias dos organismos expostos ao fluoreno, os níveis de transcritos dos genes *CYP2AU2*, *GST Ω -like* e *SULT-like* foram maiores nos organismos expostos a 200 $\mu\text{g/L}$ de fluoreno que nos demais grupos após 24 h de exposição. Os níveis de transcritos dos demais genes avaliados (*CYP1-like*, *CYP2-like*, *CYP356A1*, *CYP17 α -like* e *GSTMic-like*) não foram alterados após a exposição ao fluoreno (**Figura 33 e 34**).

Análises enzimáticas

As atividades das enzimas de biotransformação EROD, GST total e GSTmic foram analisadas nas brânquias dos animais expostos ao pireno e fluoreno. A atividade EROD foi considerada abaixo do limite de detecção em todos os animais do experimento de exposição ao pireno e após 96 h de exposição ao fluoreno. Dessa forma, apenas os resultados da atividade dessa enzima nos animais expostos ao fluoreno por 24 h estão apresentados nos gráficos. A atividade EROD não foi alterada pela exposição ao fluoreno por 24 h (**Figura 36**).

A atividade de GST total não foi significativamente diferente entre os grupos expostos ao pireno, em ambas as concentrações e período de exposição. A atividade de GSTmic foi maior nas brânquias de ostras expostas a 100 $\mu\text{g/L}$ de pireno que nos demais grupos após 96 h de exposição (**Figura 35**). As atividades de GST total e GSTmic não variaram entre os grupos dos animais expostos ao fluoreno em ambos os períodos de tempo (**Figura 36**).

Figura 31. Níveis de transcritos de genes de fase I do sistema de biotransformação em brânquias de ostras *C. gigas* expostas a 50 $\mu\text{g/L}$ (P50) ou 100 $\mu\text{g/L}$ (P100) de pireno por 24 h e 96 h e o grupo controle (CT) respectivo. Os níveis de transcritos dos genes *CYP1-like*, *CYP2-like*, *CYP2AU2*, *CYP356A1* e *CYP17 α -like* estão normalizados pela média geométrica dos níveis de transcritos de *EF* e *G3PDH* e relativos ao grupo controle. Os dados estão expressos como média \pm erro padrão (n=10). Letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos, $p < 0,05$.

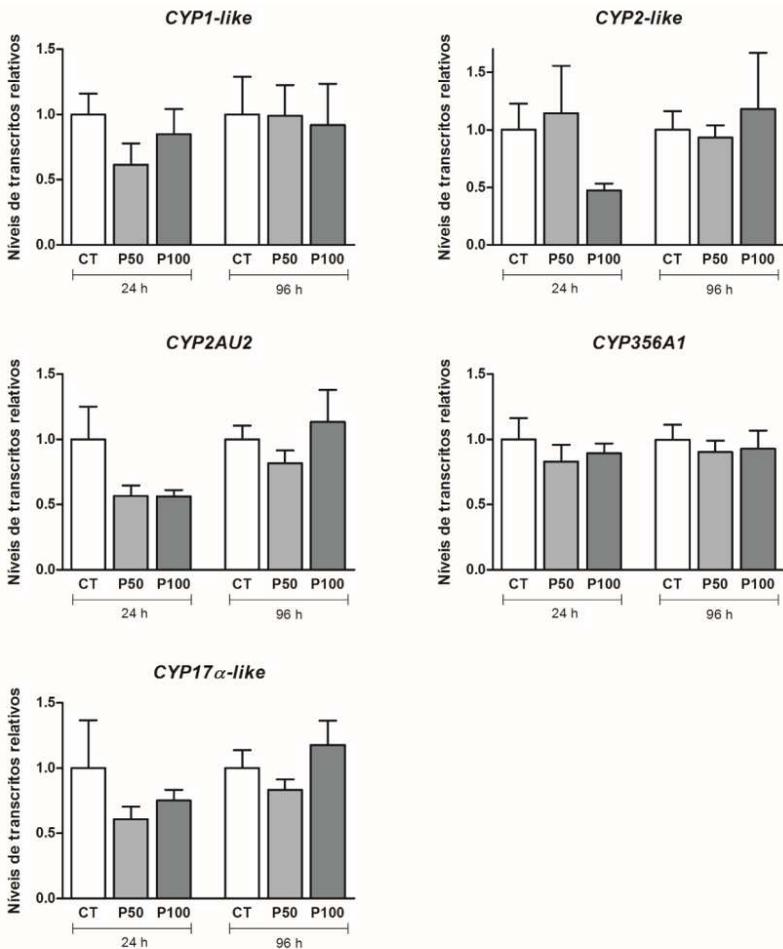


Figura 32. Níveis de transcritos de genes de fase II do sistema de biotransformação em brânquias de ostras *C. gigas* expostas a 50 µg/L (P50) ou 100 µg/L (P100) de pireno por 24 h e 96 h e o grupo controle (CT) respectivo. Os níveis de transcritos dos genes *GSTΩ-like*, *GSTMic-like* e *SULT-like* estão normalizados pela média geométrica dos níveis de transcritos de *EF* e *G3PDH* e relativos ao grupo controle. Os dados estão expressos como média ± erro padrão (n=10). Letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos, $p < 0,05$.

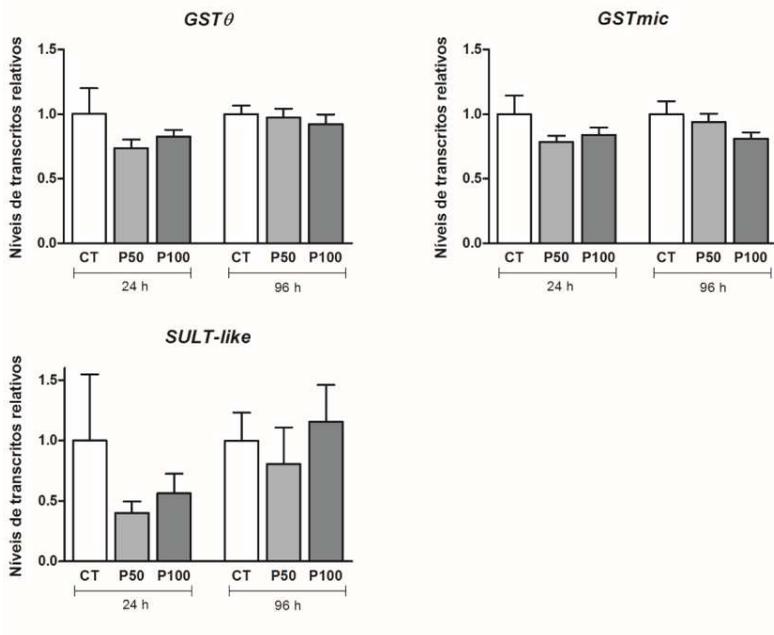


Figura 33. Níveis de transcritos de genes de fase I do sistema de biotransformação em brânquias de ostras *C. gigas* expostas a 100 µg/L (F100) ou 200 µg/L (F200) de fluoreno por 24 h e 96 h e o grupo controle (CT) respectivo. Os níveis de transcritos dos genes *CYP1-like*, *CYP2-like*, *CYP2AU2*, *CYP356A1* e *CYP17 α -like* estão normalizados pela média geométrica dos níveis de transcritos de *EF* e *G3PDH* e relativos ao grupo controle. Os dados estão expressos como média \pm erro padrão (n=10). Letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos, $p < 0,05$.

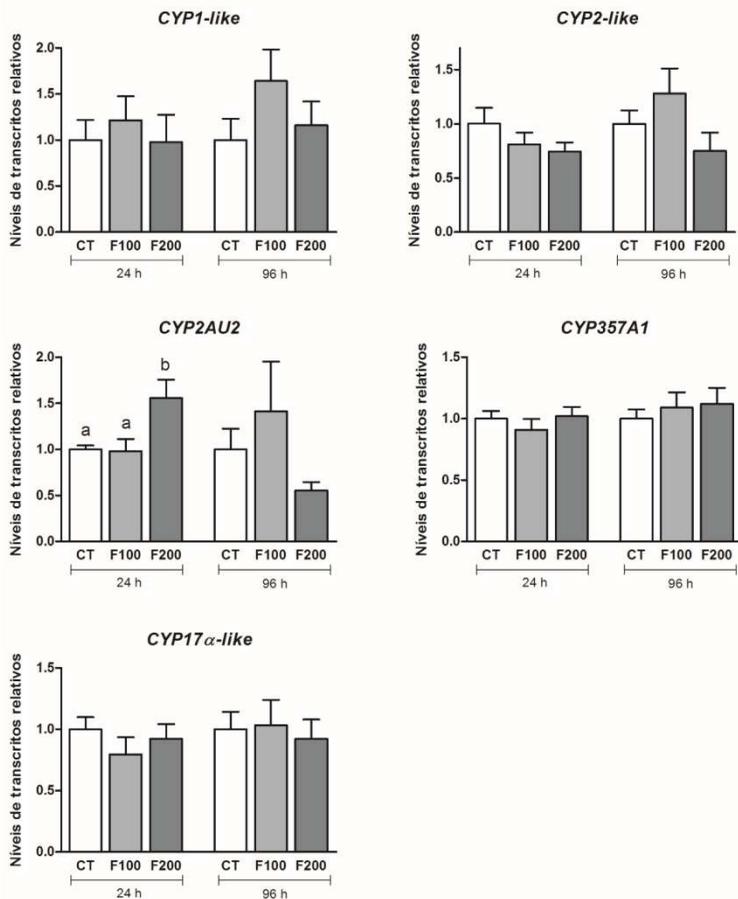


Figura 34. Níveis de transcritos de genes de fase II do sistema de biotransformação em brânquias de ostras *C. gigas* expostas a 100 $\mu\text{g/L}$ (F100) ou 200 $\mu\text{g/L}$ (F200) de fluoreno por 24 h e 96 h e o grupo controle (CT) respectivo. Os níveis de transcritos dos genes *GSTQ-like*, *GSTMic-like* e *SULT-like* estão normalizados pela média geométrica dos níveis de transcritos de *EF* e *G3PDH* e relativos ao grupo controle. Os dados estão expressos como média \pm erro padrão (n=10). Letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos, $p < 0,05$.

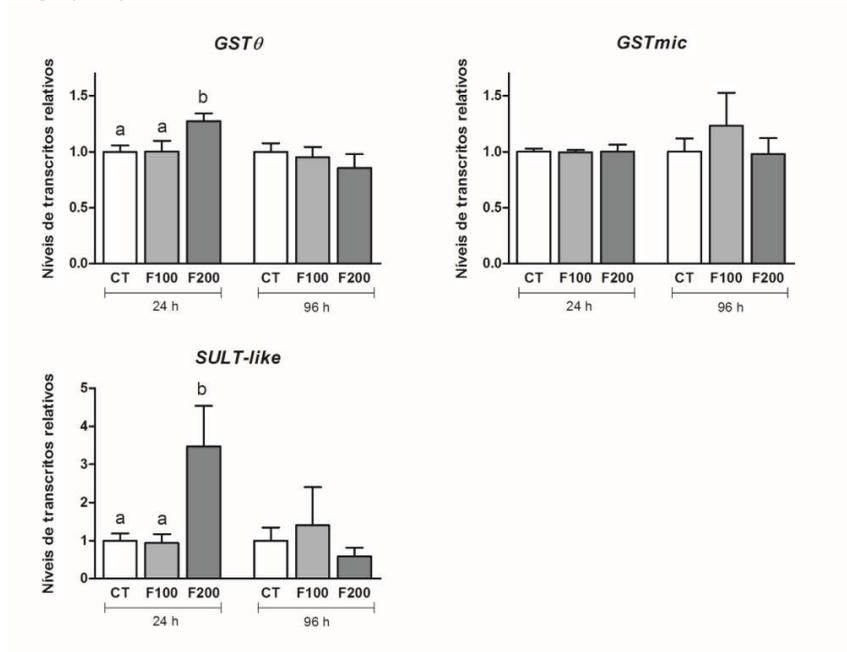


Figura 35. Atividades das enzimas GST total e GSTmic em brânquias de ostras *C. gigas* expostas a 50 $\mu\text{g/L}$ (P50) ou 100 $\mu\text{g/L}$ (P100) de pireno por 24 h e 96 h e o grupo controle (CT) respectivo. Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão (n=9). Letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos, $p < 0,05$.

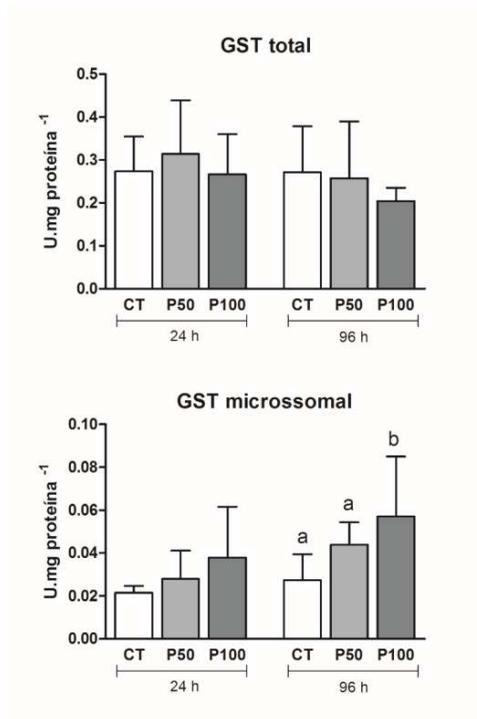
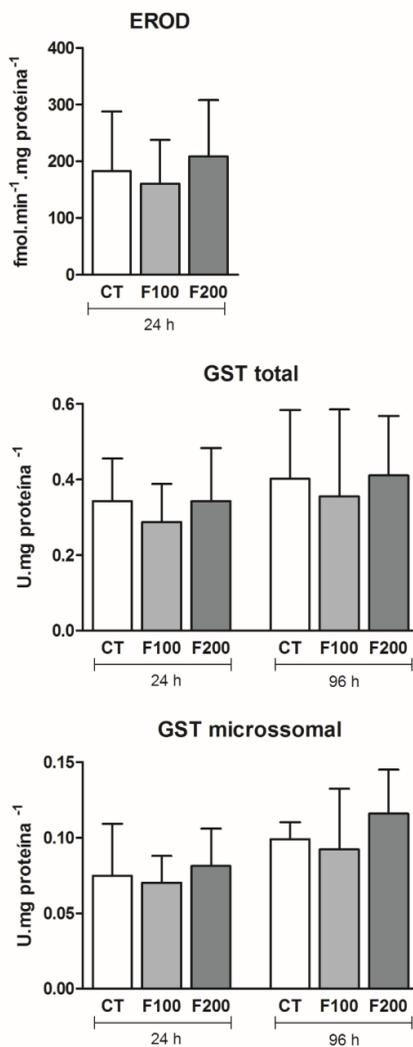


Figura 36. Atividades das enzimas EROD, GST total e GSTmic em brânquias de ostras *C. gigas* expostas a 100 µg/L (F100) ou 200 µg/L (F200) de fluoreno por 24 h e 96 h e o grupo controle (CT) respectivo. Os dados estão expressos como média ± desvio padrão (n=9). Letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos, $p < 0,05$.



4.4 DISCUSSÃO

O aumento da contaminação dos ambientes aquáticos gera um interesse crescente sobre ferramentas sensíveis de biomonitoramento ambiental. Em moluscos bivalves, a variação na expressão de genes de biotransformação, incluindo desde alterações no nível de transcritos até na atividade enzimática, pode ser um potencial biomarcador de contaminação aquática, principalmente em resposta a contaminantes ubíquos como os HPAs. Tendo em vista a ausência de informações sobre os efeitos da exposição isolada aos HPAs nos níveis de transcritos e atividades de enzimas de biotransformação em bivalves, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito que a exposição aos HPAs pireno e fluoreno exerce nos níveis de transcritos dos genes de biotransformação *CYP1-like*, *CYP2-like*, *CYP2AU2*, *CYP356A1*, *CYP17 α -like*, *GST Ω -like*, *GSTmic-like* e *SULT-like* e nas atividades das enzimas de biotransformação EROD, GST total e GSTmic em *C. gigas*.

A queda na concentração de ambos HPAs na água dos aquários com ostras em 24 h ocorre devido à absorção dos HPAs por esses animais. A absorção dos HPAs também pode ser observada ao final de 24 e 96 h de exposição, em que concentrações maiores de pireno e fluoreno foram observadas nos tecidos dos animais expostos aos HPAs em comparação aos grupos controle e aos animais coletados no tempo zero. A concentração de cada HPA parece ser maior nos tecidos dos grupos expostos por período de tempo e a concentrações maiores. Por serem sésseis, filtradores e apresentarem baixa metabolização de HPAs (BUSTAMANTE et al., 2012; GOSLING, 2003), a bioacumulação desses compostos é favorecida em moluscos bivalves. Esse processo é observado em bivalves expostos a um único HPA em condições de laboratório (PIAZZA et al., 2016; ZACCHI et al., 2017) ou em organismos que habitam ambientes contaminados (LEÓN et al., 2013; TORRES et al., 2012).

Alguns HPAs apresentam meia-vida maior que o pireno e o fluoreno em aquários com ostras *C. gigas*. A meia-vida do fenantreno em

aquários com ostras *C. brasiliana* expostas a 100 µg/L desse HPA foi de 2,85 h (LUCHMANN et al., 2014), a meia-vida de pireno foi de 2,24 h e do fluoreno de 5,93 h em aquários com ostras *C. brasiliana* expostas a 100 µg/L desses HPAs, respectivamente (ZACCHI, 2017), e a meia-vida observada do BaP foi de 4,9 h em aquários com o mexilhão *Mytilus galloprovincialis* expostos a 100 µg/L desse contaminante (REY-SALGUEIRO et al., 2017).

Ostras *C. gigas* acumulam HPAs dissolvidos em água rapidamente (BUSTAMANTE et al., 2012). Em nível celular, esses compostos devem interagir com a membrana plasmática antes de entrarem em contato com o meio intracelular, entretanto, HPAs diluídos em água não interagem passivamente com as membranas biológicas (CASTELLI; LIBRANDO; SARPIETRO; 2002; LIBRANDO; SARPIETRO; CASTELLI, 2003). Dessa forma, o fluxo gerado pela filtração das brânquias parece desempenhar um papel fundamental para a absorção de HPAs nesses organismos. A filtração pelas brânquias em *C. gigas* pode atingir taxas de 4,8 L/h⁻¹, considerando animais com 1 g de tecido seco a 20 °C (BOUGRIER et al., 1995) e esse processo provavelmente contribui para a curta meia-vida observada para o pireno e o fluoreno na água dos aquários com ostras. Devido à filtração, as brânquias possivelmente representam o principal órgão de entrada de HPAs nas ostras, além disso, esse órgão acumula HPAs a partir da água com maior velocidade e em maior concentração que os outros órgãos (BUSTAMANTE et al., 2012).

O pireno apresentou um tempo de meia-vida na água menor do que o fluoreno e, além disso, os tecidos das ostras apresentaram concentrações maiores de pireno do que fluoreno. Essas diferenças podem ser atribuídas às diferenças de solubilidade em água e de lipofilicidade entre os HPAs. Tais propriedades podem alterar a capacidade de cada HPA em interagir com as membranas celulares (SIKKEMA; BONT; POOLMAN, 1995). A solubilidade em água do fluoreno é 1,69 mg/L (MAY; WASIK; FREEMN, 1978), mais de 10 vezes maior do que a solubilidade do pireno, que é de 0,135 mg/L (MILLER, 1985).

A lipofilicidade é geralmente quantificada por meio do coeficiente de partição octanol-água ($\text{Log Partição} = \text{Log Soluto}_{\text{octanol}} - \text{Log Soluto}_{\text{água}}$). O uso desse parâmetro se baseia no fato da composição das membranas plasmáticas ser variável e um coeficiente específico de partição entre membrana plasmática e meio aquoso para cada molécula inviabilizaria uma comparação. Dessa forma, o coeficiente de partição octanol-água permite comparar a partição de moléculas entre ambientes lipofílicos e hidrofílicos (SIKKEMA; BONT; POOLMAN, 1994). O coeficiente de partição octanol-água do pireno é 5,22 e do fluoreno de 4,18 (BRUGGEMAN; VAN DER STEEN; HUTZINGER, 1982), o que demonstra que apesar dos dois HPAs serem lipofílicos, o pireno é mais lipofílico que o fluoreno.

Ambos HPAs são capazes de interagir com biomembranas (CASTELLI; LIBRANDO; SARPIETRO; 2002; LIBRANDO; SARPIETRO; CASTELLI, 2003). Entretanto, o maior coeficiente de partição octanol-água do pireno, somado a sua menor solubilidade em água, indica que esse HPA apresenta uma maior interação com as membranas celulares, sendo assim absorvido mais rapidamente e em maior quantidade pelas ostras.

Neste estudo, a análise dos níveis de transcritos incluiu genes de fase I, pertencentes à superfamília *CYP*, e de fase II, integrantes das famílias *GST* e *SULT*. Paralelamente, foram analisadas a atividade da enzima EROD, de fase I, e GST total e GSTmic, ambas de fase II.

Em vertebrados, as enzimas da família *CYP1* atuam no metabolismo de compostos endógenos e exógenos, como o HAH e HPAs (CAPDEVILA; HARRIS; FALCK, 2002; HU; BUNCE, 1999; INUI et al., 2014; LEE et al., 2003; MCMANUS et al., 1990). Genes *CYP1* têm sua expressão induzida por HPAs e outros substratos de membros da família *CYP1* devido à ativação do AHR por esses compostos (HAHN, 2002; HAHN; KARCHNER; MERSON, 2017; MURRAY; PATTERSON; PERDEW, 2014).

Os genes *CYP1-like* analisados no presente estudo apresentam cerca de 35% de identidade das sequências de aminoácidos deduzidas com genes *CYP1* de vertebrados (*Vide Capítulo III*), menos que os 40%

necessários para que ambos genes sejam considerados da família CYP1 (NELSON, 2006). Apesar de não pertencerem à família *CYP1*, os genes *CYP1-like* representam os genes do genoma de *C. gigas* com maior identidade com CYP1 de vertebrados.

O nível de transcritos de *CYP1-like* não variaram em brânquias de ostras *C. gigas* expostas ao pireno e ao fluoreno, sugerindo que o AHR de *C. gigas* não é ativado por esses HPAs ou que esses genes não sejam modulados da mesma forma que os genes *CYP1* de vertebrados (i.e. via AHR). Apesar do genoma de *C. gigas* possuir um gene anotado como *AHR* (ZHANG et al., 2012), pouco se conhece sobre a função e possíveis agonistas desse receptor nessa espécie. No bivalve *Mya arenaria*, o AHR não é ativado pelos ativadores clássicos de AHR: 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD) e β -naftoflavona (BNF) (BUTLER et al., 2001). Os níveis de transcritos de genes *CYP1-like* não foram alterados após injeção de ativadores clássicos de AHR em *M. edulis* (ZANETTE et al., 2013) e após a exposição ao fenantreno na vieira *Nodipecten nodosus* (PIAZZA et al., 2016). Adicionalmente, os níveis de transcritos de genes *CYP1-like* apresentaram baixa correlação com os níveis de HPAs encontrados nos tecidos de *C. virginica* mantidas em locais sob influência do derramamento de petróleo da *Deepwater Horizon* (JENNY et al., 2016). Esses dados sugerem que o AHR não é ativado por essas moléculas e/ou não esteja envolvido na regulação da expressão desses genes em bivalves.

É possível que esse receptor seja ativado por ligantes endógenos ou apresente atividade constitutiva nesses organismos, diferindo do papel de xenosensor que apresenta em vertebrados (HAHN; KARCHNER; MERSON, 2017). Contrariamente a esses resultados, um nível maior de transcritos de *CYP1-like* foi detectado nos bivalves *C. brasiliiana* e *C. farreri* expostos a diferentes HPAs (GUO et al., 2017; LUCHMANN et al., 2015; TIAN; PAN; SUN, 2013; TIAN; PAN; ZHANG, 2014), sugerindo que o efeito que HPAs exercem nos níveis de transcritos de genes *CYP1-like* em bivalves seja espécie-específico.

A ativação do AHR muitas vezes culmina com o aumento na atividade de enzimas CYP1, que pode ser medida por meio do ensaio EROD (BURKE; MAYER, 1974; CHANG; WAXMAN, 2006) e cuja indução é considerada um biomarcador da exposição aos HPAs (BRUNSTRÖM; BROMAN, NÄF, 1991; GAGNON; RAWSON, 2017; WHYTE et al., 2000).

A atividade EROD foi demonstrada em ostras do gênero *Crassostrea* e apresentou uma atividade maior em brânquias de *C. brasiliana* expostas ao pireno em relação ao controle (Capítulo II e III; ZACCHI, 2017). A ausência de detecção de atividade EROD em *C. gigas* no experimento de exposição ao pireno e após 96 h de exposição ao fluoreno pode estar relacionada com variações genéticas entre as populações estudadas, uma vez que as ostras utilizadas nos ensaios dos capítulos III e IV são provenientes de dois cultivos diferentes do município de Florianópolis. Além disso, a influência do estágio de desenvolvimento, de maturação e o estado nutricional dos organismos na atividade EROD não pode ser descartada. Curiosamente, a ausência de atividade EROD em brânquias também foi descrita por Schlenk e Buhler (1989), reforçando a hipótese da influência de fatores genéticos e fisiológicos na expressão dessa atividade.

As enzimas da família CYP2 estão envolvidas no metabolismo de xenobióticos, fármacos e compostos endógenos em vertebrados (NELBERT; DALTON, 2006). Em humanos, representantes dessa família metabolizam 46% dos fármacos e 43% dos xenobióticos (RENDIC; GUENGERICH, 2015). Enzimas da família CYP2 de humanos também estão envolvidas no metabolismo de HPAs: a enzima CYP2C8 realiza a 3-hidroxilação do BaP e CYP2C9 a ativação metabólica de vários HPAs-diol (SHIMADA et al., 2006; YUN; SHIMADA; GUENGERICH, 1992).

O nível de transcritos do gene *CYP2-like* não variou em brânquias de *C. gigas* expostas ao pireno e ao fluoreno. Entretanto, os níveis de transcritos de genes *CYP2-like* foram maiores em brânquias de *C. brasiliana* e de *N. nodosus* expostos ao fenantreno (LUCHMANN et al., 2014; PIAZZA et al., 2016).

Neste estudo, o *CYP2AU2* apresentou maior nível de transcritos nos organismos expostos a 200 µg/L de fluoreno que os demais grupos após 24 h. Em brânquias de *C. gigas*, o gene *CYP2AU2* também apresentou níveis de transcritos maiores em animais expostos ao ibuprofeno e ao esgoto sanitário (PESSATI et al., 2016; SERRANO et al., 2015). O possível ortólogo de *CYP2AU2* em *C. brasiliensis*, o *CYP2AU1*, apresentou maior nível de transcritos em brânquias, manto e glândula digestiva em animais expostos ao fenantreno (DOS REIS et al., 2015; LUCHMANN et al., 2014; ZACCHI et al., 2016).

Genes da família *CYP2* apresentam a transcrição modulada pelo AHR em vertebrados (RIVERA; SAARIKOSKI; HANKINSON, 2002; TIJET et al., 2006). Entretanto, considerando que genes *CYP1* estão entre os principais genes regulados pelo AHR em vertebrados e que o gene *CYP1-like* não teve o nível maior de transcritos nos grupos expostos aos HPAs, é improvável que a ativação desse receptor pelo fluoreno esteja ocorrendo. Dessa forma, supõe-se que a variação no nível de transcritos de *CYP2AU2* envolva outro mecanismo de regulação.

O gene *CYP356A1* de *C. gigas* apresenta relação filogenética com as famílias *CYP17* (metabolismo de esteroides) e *CYP1* (envolvida no metabolismo de HPAs) (TOLEDO-SILVA et al., 2008), compartilhando até 36% de identidade com genes da família *CYP17* e até 33% com a família *CYP1* de vertebrados. A expressão da proteína *CYP356A1* é significativa na glândula digestiva, brânquias e gônadas (RODRIGUES-SILVA et al., 2015), apesar do padrão de expressão de proteínas nos tecidos ser condizente com as funções desempenhadas pelas famílias com as quais esse gene apresenta maior identidade, a função desse gene em ostras permanece desconhecida.

O nível de transcritos desse gene foi maior em ostras expostas ao esgoto doméstico (FLORES-NUNES, 2015; MEDEIROS et al., 2008a; MEDEIROS et al., 2008b) e à neurotoxina brevetoxina da alga *Karenia brevis* (MELLO et al., 2012). O maior nível de transcritos desse gene devido à exposição ao esgoto sanitário não é atribuído à presença de alquilbenzenos lineares (comuns em produtos de limpeza e de higiene

peçoal) e ao fármaco ibuprofeno, ambos comumente encontrados no esgoto (FLORES-NUNES et al., 2015; SERRANO et al., 2015). O nível de transcritos do gene *CYP356A1* não variou com a exposição ao pireno e ao fluoreno, indicando que esses compostos também não são capazes de induzir a expressão desse gene em *C. gigas*. Interessantemente, brânquias de *C. brasiliiana* expostas ao fenantreno tiveram o nível de transcritos de *CYP356A1-like* maior que o grupo controle (LUCHMANN et al., 2014).

A enzima CYP17 α , denominada de citocromo P450 17 α -hidroxilase/17,20-liase (CYP17 α) é uma enzima microsossomal que apresenta duas atividades catalíticas distintas: 17 α -hidroxilase e 17,20-liase. Essa enzima atua com ambas as funções catalíticas durante a esteroidogênese, em um ponto de interseção da produção de glicocorticóides, mineralocorticóides e hormônios sexuais (LIU; YAO; PAPADOPOULOS, 2005; YADAV et al., 2015). A maior parte da via de síntese de esteroides é encontrada em moluscos (FERNANDES; LOI; PORTE, 2011), incluindo genes *CYP17 α* (TIAN; PAN; SUN, 2013; ZANETTE et al., 2010). Entretanto, a relação de ortologia e de função entre esses genes e os de vertebrados não está estabelecida (GOLDSTONE et al., 2016). Os HPAs podem agir como desreguladores endócrinos em vertebrados, com mecanismos de ação diversos (ZHANG et al., 2016b), dentre esses mecanismos está a inibição da enzima CYP17 α , que afeta a síntese de hormônios esteroides (ROCHA MONTEIRO; REIS-HENRIQUES; COIMBRA, 2000). Em bivalves, foi demonstrado que a exposição aos HPAs causa alteração no nível de transcritos do gene *CYP17 α* (DENG et al., 2016; LUCHMANN et al., 2015; TIAN; PAN; SUN, 2013) e dos hormônios 17 β -estradiol, testosterona e progesterona, podendo induzir a toxicidade gonadal (TIAN et al., 2015). Entretanto, não foi observado um efeito da exposição ao pireno e ao fluoreno no nível de transcritos de *CYP17 α* em ostras *C. gigas*.

A função intracelular de GST Ω não foi completamente elucidada, mas parece estar relacionada à resposta celular ao estresse (BURMEISTER et al., 2008; KIM et al., 2012). Após o estresse oxidativo,

algumas proteínas podem formar adutos S-tiois entre a glutatona e cisteína, o que inativa a função enzimática. A GST Ω atua na deglutationização, ou seja, na redução dos adutos do tipo S-tiol, permitindo a restauração da atividade enzimática (BOARD et al., 2000; MENON; BOARD, 2013).

Ostras expostas a 200 $\mu\text{g/L}$ de fluoreno apresentaram nível de transcritos de *GST Ω -like* maior que os demais grupos após 24 h de exposição. Diversos trabalhos mostram um nível de transcritos de *GST Ω -like* maior em *C. gigas* expostas a contaminantes e misturas ambientais, como ao fármaco ibuprofeno, ao pesticida glifosato, à FAA de óleo diesel e ao esgoto sanitário (BOUTET; TANGUY; MORAGA, 2004a; 2004b; FLORES-NUNES et al., 2015; SERRANO et al., 2015). Além disso, bivalves expostos a estresses físicos, químicos e biológicos, que incluem metais, HPAs, HAHs (WAN et al., 2009), estresse térmico (LIM et al., 2016), dinoflagelado produtor de neurotoxina *Prorocentrum lima* (ZOU et al., 2015) e o parasita *Bonamia ostreae* (MORGA et al., 2011), apresentam nível maior de transcritos de *GST Ω -like*, o que sugere que essa variação seja uma resposta genérica ao estresse, o que é condizente com a função sugerida para essa enzima.

A GSTmic apresenta ampla especificidade de substrato, incluindo CDNB (MORGENSTERN; GUTHENBERG; DEPIERRE, 1982). Essa enzima pode metabolizar metabólitos de HPAs, como de BaP e, além da atividade GST, catalisar a redução de hidroperóxidos de lipídeos dependente de glutatona. Entre esses hidroperóxidos estão hidroperóxidos orgânicos, de ácidos graxos e de fosfolipídeos (JOHANSSON et al., 2010; SIRITANTIKORN et al., 2007; MOSIALOU; MORGENSTERN, 1989). Essas enzimas apresentam uma função importante na proteção contra a peroxidação lipídica em condições de estresse oxidativo (MOSIALOU et al., 1993). O estresse oxidativo desencadeado pela exposição aos HPAs tem sido amplamente demonstrado em bivalves (SUREDA et al., 2013; XIE et al., 2017). Apesar do nível de transcritos de *GSTmic* não ter alterado nos grupos expostos ao pireno e fluoreno em relação aos grupos controle, a atividade de

GSTmic foi maior em ostras expostas a 100 µg/l de pireno do que nos demais grupos após 96 h de exposição. A maior atividade de GSTmic nos animais expostos ao pireno sugere um papel protetor contra o estresse oxidativo nesses animais.

Apesar da variação nos níveis de transcritos de *GSTmic* não ter sido observada nas ostras expostas ao pireno, outros processos podem estar envolvidos na variação dessa atividade enzimática. A atividade de GSTmic foi ativada por metabólitos de hidrocarbonetos aromáticos como benzenotriol e benzoquinona (WALLIN; MORGENSTERN, 1990), sugerindo que o aumento da atividade GSTmic detectada pode ser consequência de uma ativação direta dos metabólitos do pireno nessa enzima.

O nível de transcritos de outro gene de biotransformação da fase II analisado, *SULT-like*, foi maior nas brânquias dos animais expostos a 200 µg/L de fluoreno dos que nos demais grupos após 24 h. Os HPAs sulfatados são os principais metabólitos conjugados gerados em anfíbios, crustáceos e em algumas espécies de peixe (IKENAKA et al., 2006; 2013; UEDA et al., 2011) e são produtos da biotransformação em moluscos (BEACH; QUILLIAM; HELLOU, 2009; SHOFER; TJEERDEMA, 1993). Ostras *C. brasiliiana* e vieiras *N. nodosus* apresentaram níveis de transcritos de genes *SULT-like* maiores quando expostas ao fenantreno (LUCHMANN et al., 2015; PIAZZA et al., 2016) e a atividade SULT foi maior em vieiras *C. farreri* expostas aos HPAs: criseno, BaP e a uma mistura de criseno e BaP (GUO et al., 2017), sugerindo que essa enzima tenha um papel importante no metabolismo de HPAs em bivalves.

Diversos trabalhos mostram a variação em níveis de transcritos de genes de biotransformação em moluscos bivalves expostos aos HPAs, sugerindo a existência de um mecanismo de regulação na expressão desses genes ativada por HPAs. Entretanto, a participação do AHR nessa regulação ainda não foi estabelecida. Outros fatores de transcrição associados ao controle da expressão de genes de biotransformação também podem estar envolvidos na regulação gênica. Recentemente, foram descritos 43 genes de receptores nucleares em *C. gigas* (VOGELER

et al., 2014), dentre eles o grupo NR1J, que pode participar na resposta do estresse causado por xenobióticos em invertebrados (KING-JONES et al., 2006; LINDBLOM; PIERCE; SLUDER, 2001). Esse grupo de receptores poderia ser candidato para regulação da expressão dos genes de biotransformação. A elucidação dos mecanismos de regulação da transcrição de genes de biotransformação em resposta a contaminantes ambientais em bivalves é um desafio que auxiliará na compreensão do metabolismo de xenobióticos nesses organismos e poderá se tornar uma ferramenta no biomonitoramento da contaminação ambiental.

4.5 CONCLUSÕES

Após exposição das ostras da espécie *C. gigas* aos HPAs pireno e fluoreno por 24 e 96 h, foram obtidas as seguintes conclusões:

- O tempo de meia-vida do pireno na água foi menor do que do fluoreno e a concentração de pireno nos tecidos das ostras foi maior do que o fluoreno, o que possivelmente está relacionado com a maior interação do pireno com membranas biológicas devido à sua menor solubilidade em água e à maior lipofilicidade;
- A atividade EROD não foi detectada no experimento de exposição ao pireno e no tempo de 96 h do fluoreno, indicando que um fator genético ou fisiológico possa influenciar na atividade dessa enzima;
- A exposição ao pireno não teve efeito nos níveis de transcritos dos genes envolvidos no sistema de biotransformação analisados;
- A atividade enzimática de GSTmic em brânquias de ostras expostas a 100 µg/L de pireno foi maior do que nos demais grupos após 96 h, o que sugere um papel protetor dessa enzima contra o estresse oxidativo em brânquias desse grupo de animais;
- A exposição ao fluoreno não teve efeito na atividade das enzimas de biotransformação analisadas;
- Os níveis de transcritos dos genes *CYP2AU2*, *GSTΩ-like* e *SULT-like* foram maiores no grupo exposto a 200 µg/L de fluoreno após 24 h, o que sugere que os produtos desses genes estejam envolvidos no

metabolismo desse HPA. O mecanismo pelo qual o fluoreno aumentou os níveis desses transcritos não foi estabelecido, mas pode envolver a participação de outro xenosensor em moluscos que não o AHR.

4.6 INFORMAÇÕES SUPLEMENTARES

Análise dos genes candidatos a gene referência

Os genes *28S*, *G3PDH* e *EF* foram selecionados como candidatos a gene referência para normalizar a expressão dos genes alvo. Informações sobre os iniciadores e sobre os ensaios estão descritas na seção de métodos deste capítulo.

Com o objetivo de verificar se os níveis de transcritos desses genes variaram entre os grupos expostos a um dos HPAs e o grupo controle respectivo, em cada período de tempo, a variação no nível de transcritos dos genes foi testada e analisada por meio do método 2^{-Cq} (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008). Os dados estão apresentados relativizados pelo grupo controle respectivo. As análises estatísticas realizadas estão descritas na seção de métodos deste capítulo.

O nível de transcritos do gene *28S* foi maior no grupo tratado com 50 $\mu\text{g/L}$ de pireno em relação ao grupo controle e ao grupo tratado com 100 $\mu\text{g/L}$ de pireno, após 24 h de exposição (**Figura 37**). Os níveis de transcritos dos genes *EF* e *G3PDH* não variaram entre os grupos expostos ao pireno e seus grupos controle respectivos e esses dois genes foram selecionados como genes referência para esse experimento. Dessa forma, a média geométrica entre os genes *EF* e *G3PDH* foi utilizada para normalizar os dados do experimento de exposição ao pireno (24 h: $p=0,35$ e 96 h: $p=0,76$) (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008).

Apesar de não haver variação nos níveis dos transcritos de *28S*, *G3PDH* e *EF* entre os grupos de animais expostos ao fluoreno, em 24 e 96 h (**Figura 38**), optou-se por normalizar os dados pelos níveis de transcritos dos genes *EF* e *G3PDH* (calculados pela média geométrica) (24 h: $p=0,67$ e 96 h: $p=0,86$), assim como no experimento de exposição ao pireno.

Figura 37. Níveis de transcritos de *28S*, *G3PDH*, *EF* e *EF+G3PDH* em brânquias de ostras *C. gigas* expostas a 50 µg/L (P50) ou 100 µg/L (P100) de pireno por 24 h e 96 h e o grupo controle (CT) respectivo. Os níveis de transcritos dos genes (2^{-Cq}) estão relativos ao grupo controle. Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão (n=10). Letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos, $p < 0,05$.

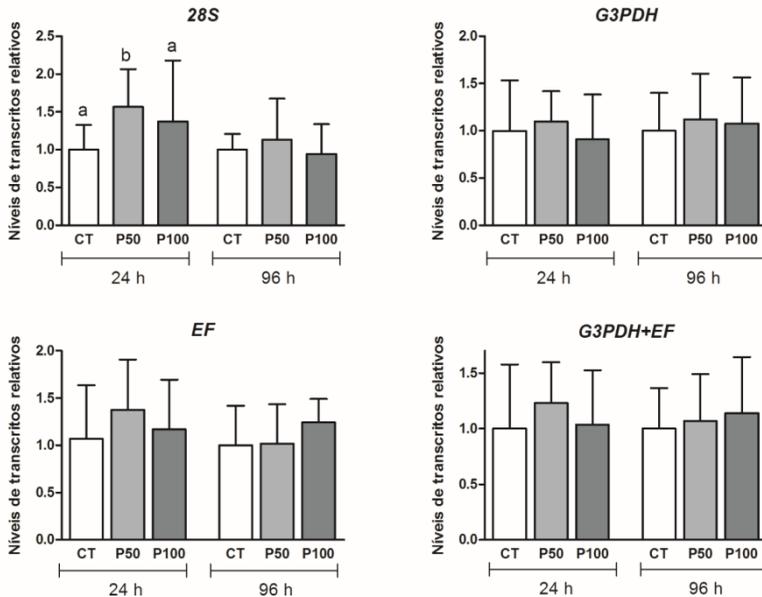
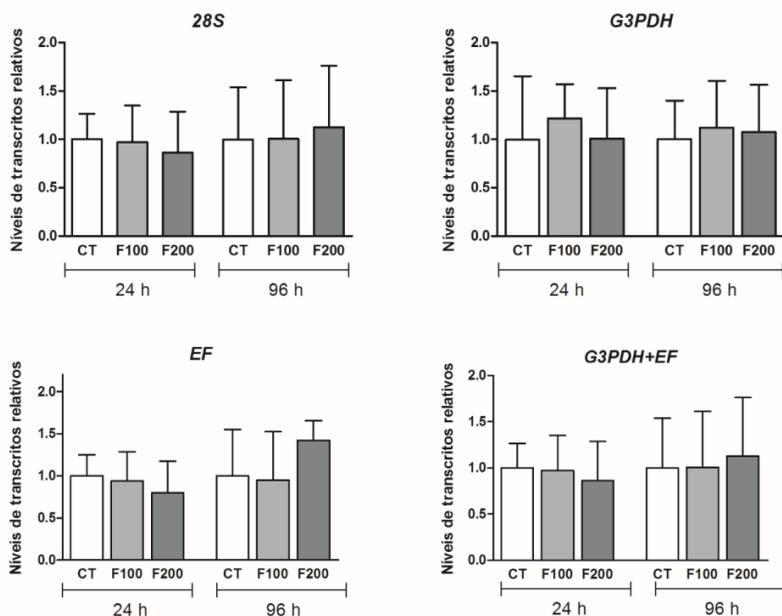


Figura 38. Níveis de transcritos de *28S*, *G3PDH*, *EF* e *EF+G3PDH* em brânquias de ostras *C. gigas* expostas a 100 µg/L (F100) ou 200 µg/L (F200) de fluoreno por 24 h e 96 h e o grupo controle (CT) respectivo. Os níveis de transcritos dos genes (2^{-Cq}) estão relativos ao grupo controle. Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão (n=10).



5 CAPÍTULO V: COMENTÁRIOS E CONCLUSÕES FINAIS

O sistema de biotransformação em moluscos e outros invertebrados é pouco conhecido. Em geral, a função e o mecanismo de regulação desses genes e enzimas não foram elucidados em invertebrados. As informações atualmente disponíveis incluem a presença de genes envolvidos nesse sistema em genomas e transcriptomas e detecção de atividade de enzimas de fase I e II (JENNY et al., 2016; LIVINGSTONE, 1998; LUCHMANN et al., 2015; REWITZ et al., 2006; SIEBERT et al., 2017a; ZHANG et al., 2012).

Estudos abordando a biotransformação em invertebrados, na maioria das vezes, assumem que pelo menos parte da função desses genes e enzimas seja conservada entre esses organismos e os vertebrados. A razão da comparação com os grupos vertebrados, em geral, não apresenta uma base evolutiva, mas ocorre devido à ampla literatura disponível sobre os vertebrados em comparação aos demais grupos animais. Portanto, é preciso considerar que ao longo do processo evolutivo novas funções podem ter sido adquiridas por genes envolvidos no sistema de biotransformação e, da mesma forma, a regulação da transcrição desses genes pode diferir dos grupos vertebrados.

Em vertebrados, as enzimas CYP1 já foram caracterizadas em relação à sua atividade e especificidade (com o uso de diversos substratos) e regulação gênica (por meio de AHR e seus elementos de resposta no DNA e caracterização de agonistas/antagonistas). Em moluscos, há genes *CYP1-like* cuja identidade com *CYP1* de vertebrados pode representar evidência de genes homólogos ou uma convergência evolutiva (caso *CYP1* e *CYP1-like* não tenham se originado a partir de um gene ancestral comum). Existe também a evidência da presença de AHR, cujos genes alvos e agonistas permanecem desconhecidos.

Tendo em vista o descompasso entre os estudos com vertebrados e invertebrados, a adaptação de ensaios enzimáticos de vertebrados para invertebrados é uma abordagem comum, mas que nem sempre representa o ensaio/substrato mais apropriado. É importante ressaltar

que o uso desses ensaios em invertebrados tem sua importância no campo da Bioquímica e Fisiologia Comparada e Biologia Evolutiva.

A atividade enzimática de EROD foi detectada em *C. brasiliiana* e *C. gigas* (Capítulo II e III). Em *C. brasiliiana*, essa atividade está presente em glândula digestiva e brânquias, enquanto que em *C. gigas* essa atividade está presente apenas nas brânquias. Em *C. brasiliiana* a atividade EROD é dependente apenas de NADPH, enquanto em *C. gigas* essa atividade pode ser demonstrada na presença de NADH. Além disso, inibidores clássicos de CYP1 foram capazes de inibir essa atividade enzimática em ambas as espécies. Em *C. brasiliiana*, o inibidor ELP inibiu a atividade EROD e em *C. gigas* o CTZ. O fato da atividade EROD ser inibida por inibidores clássicos de enzimas CYP1 de vertebrados indica uma relação de função/estrutura conservada entre as enzimas desses dois grupos. Já a presença de atividade em tecidos diferentes e respostas às coenzimas e aos inibidores distintas, sugere que essas enzimas possam ter atuações diferentes em *C. brasiliiana* e *C. gigas*. A abordagem de modelagem molecular permitiu sugerir genes candidatos para a atividade EROD em *C. gigas*, *CYP1-like 1* e *CYP1-like 2*. A ausência de informações sobre sequências completas de genes *CYP1-like* em *C. brasiliiana* inviabilizou a realização da mesma análise nessa espécie.

Em *C. gigas*, a atividade EROD não foi detectada no experimento de exposição aos HPAs pireno e fluoreno (Capítulo IV), incluindo o grupo controle. Como a ausência de atividade EROD em *C. gigas* já foi relatada na literatura científica, atribui-se essa variação a diferenças em nível de população (que incluiria diferenças genéticas entre as populações) e de indivíduo (parâmetros fisiológicos que podem incluir estado alimentar, estágio de desenvolvimento, entre outros). Dessa forma, mais estudos precisam ser realizados para caracterizar a atividade EROD em função de fatores genéticos, reprodutivos, abióticos e nutricionais.

Ostras *C. gigas* expostas ao fluoreno tiveram maiores níveis de transcritos dos genes de biotransformação *CYP2AU2*, *GST Ω -like* e *SULT-like*. Outros trabalhos do nosso grupo de pesquisa têm demonstrado maiores níveis de transcritos de genes envolvidos no sistema de

biotransformação em resposta à exposição aos HPAs em bivalves (DOS REIS et al., 2015; FLORES-NUNES et al., 2015; LUCHMANN et al., 2014, 2015; PIAZZA et al., 2016; MEDEIROS et al., 2008a, 2008b; PESSATI et al., 2016; RODRIGUES-SILVA et al., 2015; SERRANO et al., 2015; ZACCHI et al., 2016) e sugerem que exista um xenosensor (fator de transcrição) dessas moléculas nesses organismos. Comparando-se com vertebrados, o principal candidato para xenosensor seria o AHR, entretanto, a participação desse receptor nesse mecanismo em bivalves não está clara. Além disso, a função dos produtos dos genes de biotransformação no metabolismo de HPAs não foi completamente esclarecida.

Várias questões sobre a atividade *CYP1-like* e o efeito de HPAs na biotransformação de ostras do gênero *Crassostrea* ainda precisam ser elucidadas. Das quais, destacam-se: qual a relação evolutiva de *CYP1-like* de *C. gigas*, *C. brasiliana* e a família CYP1 de vertebrados? Existem fatores genéticos ou fisiológicos que influenciam na atividade EROD em *C. gigas*? O AHR é um fator de transcrição que está atuando na regulação de genes do sistema de biotransformação?

Assim, pontuam-se as conclusões deste trabalho:

- A atividade EROD foi demonstrada na fração microsomal de brânquias e glândula digestiva de *C. brasiliana* e de brânquias de *C. gigas*;
- Em *C. brasiliana*, as condições de pH e temperatura foram estabelecidas em 7,4 e 30 °C, respectivamente;
- A atividade EROD detectada está acima do limite de quantificação do método e apresenta velocidades semelhantes às observadas para outros grupos de animais;
- Os parâmetros cinéticos da atividade EROD em *C. brasiliana* e *C. gigas* revelaram perfis típicos de enzimas que apresentam uma cinética de Michaelis-Menten, com baixa V_{max} e alto K_{mapp} em comparação com a atividade EROD de outros animais, o que poderia explicar o alto potencial de bioacumulação de HPAs nesses animais;

- O NADPH é a principal coenzima que transfere elétrons para a atividade EROD em *C. brasiliiana* e *C. gigas*;
- O estudo *in vitro* com inibidores de CYP1 indicaram que uma enzima CYP1-like provavelmente é responsável pela deetilação da 7-ER em *C. brasiliiana* e *C. gigas*;
- Os produtos gênicos de *CYP1-like 1* e *CYP1-like 2* são candidatos plausíveis para realizar a atividade EROD observada em brânquias de *C. gigas*;
- A atividade EROD não foi detectada no experimento de exposição ao pireno e no tempo de 96 h do fluoreno, indicando que um fator genético ou fisiológico influencie na atividade dessa enzima em *C. gigas*;
- A exposição ao pireno não teve efeito nos níveis de transcritos dos genes envolvidos no sistema de biotransformação analisados, entretanto, a atividade GSTmic foi maior em brânquias de ostras *C. gigas* expostas a 100 µg/L de pireno por 96 h em relação aos demais grupos expostos por esse período, o que sugere um papel protetor dessa enzima contra o estresse oxidativo em brânquias desse grupo de animais;
- Os níveis de transcritos dos genes *CYP2AU2*, *GSTΩ-like* e *SULT-like* foram maiores nos animais expostos a 200 µg/L de fluoreno por 24 h em relação aos demais grupos expostos pelo mesmo período. O mecanismo pelo qual o fluoreno aumentou os níveis desses transcritos não foi estabelecido, mas pode envolver a participação de um xenosensor em moluscos;
- A exposição ao fluoreno não teve efeito na atividade das enzimas de biotransformação EROD, GST total e GSTmic.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAS, E. et al. PAH metabolites in bile, cytochrome P4501A and DNA adducts as environmental risk parameters for chronic oil exposure: A laboratory experiment with Atlantic cod. **Aquatic Toxicology**, v. 51, n. 2, p. 241–258, 2000.

ABDEL-SHAFY, H. I.; MANSOUR, M. S. M. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. **Egyptian Journal of Petroleum**, v. 25, n. 1, p. 107–123, 2015.

ACEB, Associação Cultural e Educacional Brasil. **1º Anuário Brasileiro de Pesca e Aquicultura**, 2014.

AGUIRRE-MARTÍNEZ, G. V.; DELVALLS, A. T.; MARTÍN-DÍAZ, L.M. Yes, caffeine, ibuprofen, carbamazepine, novobiocin and tamoxifen have an effect on *Corbicula fluminea* (Müller, 1774). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 120, p. 142–154, 2015.

AIMOVÁ, D.; STIBOROVÁ, M. Antitumor drug ellipticine inhibits the activities of rat hepatic cytochromes P450. **Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacký, Olomouc, Czechoslovakia**, v. 149, p. 437–440, 2005.

AL-SHAWI, M. K.; SENIOR, A. E. Characterization of the adenosine triphosphatase activity of Chinese hamster P-glycoprotein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 6, p. 4197–4206, 1993.

ANYAKORA, C. et al. Determination of polynuclear aromatic hydrocarbons in marine samples of Siokolo Fishing Settlement. **Journal of Chromatography A**, v. 1073, n. 1–2, p. 323–330, 2005.

ARNOLD, K. et al. The SWISS-MODEL workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. **Bioinformatics**, v. 22, n. 2, p. 195–201, 2006.

BADO-NILLES, A. et al. Effects of 16 pure hydrocarbons and two oils on haemocyte and haemolymphatic parameters in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). **Toxicology in Vitro**, v. 22, n. 6, p. 1610–1617, 2008.

BARD, S. M. Multixenobiotic resistance as a cellular defense mechanism in aquatic organisms. **Aquatic Toxicology**, v. 48, n. 4, p. 357–389, 2000.

BAUMARD, P. et al. Concentrations of PAHs (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons) in various marine organisms in relation to those in sediments and to trophic level. **Marine Pollution Bulletin**, v. 36, n. 12, p. 951–960, 1998.

BAUSSANT, T. et al. Bioaccumulation of polycyclic aromatic compounds: 1. Bioconcentration in two marine species and in semipermeable membrane devices during chronic exposure to dispersed crude oil. **Environmental Toxicology**, v. 20, n. 6, p. 1175–1184, 2001.

BEACH, D. G.; QUILLIAM, M. A.; HELLOU, J. Analysis of pyrene metabolites in marine snails by liquid chromatography using fluorescence and mass spectrometry detection. **Journal of Chromatography B**, v. 877, p. 2142–2152, 2009.

BERMAN, H.M. et al. The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Research**, v. 28, p. 235–242, 2000.

BINELLI, A. et al. New evidences for old biomarkers: Effects of several xenobiotics on EROD and AChE activities in Zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). **Chemosphere**, v. 62, n. 4, p. 510–519, 2006.

BOARD, P. G. et al. Identification, characterization, and crystal structure of the omega class glutathione transferases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 32, p. 24798–24806, 2000.

BOARD, P. G.; MENON, D. Glutathione transferases, regulators of cellular metabolism and physiology. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1830, n. 5, p. 3267–3288, 2013.

BOFFETTA, P.; JOURENKOVA, N.; GUSTAVSSON, P. Cancer risk from occupational and environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. **Cancer Causes & Control**, v. 8, n. 3, p. 444–72, 1997.

BOUGRIER, S. et al. Allometric relationships and effects of temperature on clearance and oxygen consumption rates of *Crassostrea gigas* (Thunberg). **Aquaculture**, v. 134, p. 143–154, 1995.

BOUTET, I.; TANGUY, A.; MORAGA, D. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hydrocarbon contamination under experimental conditions. **Gene**, v. 329, n. 1–2, p. 147–157, 2004a.

BOUTET, I.; TANGUY, A.; MORAGA, D. Characterisation and expression of four mRNA sequences encoding glutathione S-transferases pi, mu, omega and sigma classes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to hydrocarbons and pesticides. **Marine Biology**, v. 146, n. 1, p. 53–64, 2004b.

BOYLE, T.P. et al. Comparison of Laboratory and Field Assessment of Fluorene—Part II: Effects on the Ecological Structure and Function of Experimental Pond Ecosystems. **ASTM International**, 1985.

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, p. 248-254, 1976.

BRANKO, K. Inhibition of multixenobiotic resistance mechanism in aquatic organisms: ecotoxic consequences. **The Science of the Total Environment**, v. 171, n. 95, p. 197–204, 1995.

BRODIE, B.B; GILLETTE, J.R.; LA DU B.N. Enzymatic metabolism of drugs and other foreign compounds. **Annual Review of Biochemistry**, v.27, p. 427-454, 1958.

BROMAN, D. et al. An *in situ* study on the distribution, biotransformation and flux of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in an aquatic food chain (Seston-*Mytilus edulis* L.-*Somateria mollissima* L.) from the baltic: An ecotoxicological perspective. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 9, n. 4, p. 429–442, 1990.

BRUGGEMAN, W.A.; VAN DER STEEN, J.; HUTZINGER, O. Reversed-phase thin-layer chromatography of polynuclear aromatic hydrocarbons and chlorinated biphenyls: Relationship with hydrophobicity as measured by aqueous solubility and octanol-water partition coefficient. **Journal of Chromatography A**, v. 238, p. 335-346, 1982.

BRUNSTRÖM, B.; BROMAN, D.; NÄF, C. Toxicity and EROD-inducing potency of 24 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in chick embryos. **Archives of Toxicology**, v. 1, p. 485-489, 1991.

BRUSCA, R.C.; BRUSCA, G.J. **Invertebrados**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007

BURCHIEL, S. W.; LUSTER, M. I. Signaling by environmental polycyclic aromatic hydrocarbons in human lymphocytes. **Clinical immunology**, v. 98, n. 1, p. 2-10, 2001.

BURKE, M.D.; MAYER, R.T. Ethoxyresorufin: direct fluorimetric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene. **Drug Metabolism and Disposition**, v.2, n. 6, p. 583-588, 1974.

BURKINA, V.; ZLABEK, V.; ZAMARATSKAIA, G. Clotrimazole, but not dexamethasone, is a potent in vitro inhibitor of cytochrome P450 isoforms CYP1A and CYP3A in rainbow trout. **Chemosphere**, v. 92, n. 9, p. 1099-1104, 2013.

BURMEISTER C. et al. Oxidative stress in *Caenorhabditis elegans*: protective effects of the Omega class glutathione transferase (GSTO-1). **The FASEB Journal**, v.22, p. 343-354, 2008.

BUSTAMANTE, P. et al. Bioaccumulation and metabolisation of 14C-pyrene by the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed via seawater. **Chemosphere**, v. 87, n. 8, p. 938-944, 2012.

BUTLER, R. A. et al. An aryl hydrocarbon receptor (AHR) homologue from the soft-shell clam, *Mya arenaria*: Evidence that invertebrate AHR

homologues lack 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and β -naphthoflavone binding. **Gene**, v. 278, p. 223–234, 2001.

CAPDEVILA, J. H.; HARRIS, R. C.; FALCK, J. R. Microsomal cytochrome P450 and eicosanoid metabolism. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 59, p. 780–789, 2002.

CASTAÑOS, C.; PASCUAL, M.; CAMACHO, A. P. Reproductive biology oyster of the non-native oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1973), as a key factor for its successful spread along the rocky shores of northern Patagonia, Argentina. **Journal of Shellfish Research**, v. 28, n. 4, p. 837–847, 2009.

CASTELLI, F.; LIBRANDO, V.; SARPIETRO, M. G. Calorimetric approach of the interaction and absorption of polycyclic aromatic hydrocarbons with model membranes. **Environmental Science and Technology**, v. 36, n. 12, p. 2717–2723, 2002.

CHAHIN, A. et al. EROD activity induction in peripheral blood lymphocytes, liver and brain tissues of rats orally exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. **Food and Chemical Toxicology**, v. 56, p. 371–80, 2013.

CHANG, T.K., GONZALEZ, F.J., WAXMAN, D.J. Evaluation of triacetyloleandomycin, alpha-naphthoflavone and diethyldithiocarbamate as selective chemical probes for inhibition of human cytochromes P450. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 311, p. 437–442, 1994.

CHANG, T.K.H.; WAXMAN, D.J. Cytochrome P450 Nomenclature. In: PHILLIPS, I.R.; SHEPHARD, E.A. (Ed.). **Cytochrome P450 Protocols**. 2. ed. New Jersey: Humana Press Inc, 2006. p. 73-84.

CHEAH, D. M. Y. et al. *Octopus pallidus* cytochrome P-450: characterisation and induction studies with β -naphthoflavone and Aroclor 1254. **Aquatic Toxicology**, v. 33, p. 201–214, 1995.

DA SILVA, M. E. F.; MEIRELLES, N. C. Interaction of non-ionic surfactants with hepatic CYP in *Prochilodus scrofa*. **Toxicology in Vitro**, v. 18, p. 859–867, 2004.

DANIELSON, P. B. The cytochrome P450 superfamily: biochemistry, evolution and drug metabolism in humans. **Current Drug Metabolism**, v. 3, n. 6, p. 561–97, 2002.

DAVID, J. et al. Role of cytochrome P450s in insecticide resistance: impact on the control of mosquito-borne diseases and use of insecticides on Earth. **Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 368, n. 1612, 2013.

DE LAFONTAINE, Y. et al. Biomarkers in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) for the assessment and monitoring of water quality of the St Lawrence River (Canada). **Aquatic Toxicology**, v. 50, n. 1–2, p. 51–71, 2000.

DE MELO, A. G. C. et al. Molecular identification, phylogeny and geographic distribution of Brazilian mangrove oysters (*Crassostrea*). **Genetics and Molecular Biology**, v. 33, n. 3, p. 564–572, 2010.

DEJONG, C. A.; WILSON, J. Y. The cytochrome P450 superfamily complement (CYPome) in the Annelid *Capitella teleta*. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, 2014.

DENG, X. et al. Transcriptomic changes in the ovaries of scallop *Chlamys farreri* exposed to benzo[a]pyrene. **Genes & Genomics**, v. 38, n. 6, p. 509–518, 2016.

DENISON, M. S. et al. Ligand binding and activation of the Ah receptor. **Chemico-Biological Interactions**, v. 141, p. 3–24, 2002.

DENISON, M. S. et al. Exactly the Same but Different : Promiscuity and Diversity in the Molecular Mechanisms of Action of the Aryl Hydrocarbon (Dioxin) Receptor. **Toxicological Sciences**, v. 124, n. 1, p. 1–22, 2011.

DENISOV, I. G. et al. Structure and Chemistry of Cytochrome P450. **Chemical Reviews**, v.105, p. 2253-2277, 2005.

DESMOND, E.; GRIBALDO, S. Phylogenomics of sterol synthesis: insights into the origin, evolution, and diversity of a key eukaryotic feature. **Genome Biology and Evolution**, v. 1, p. 364–381, 2009.

DOONG, R. A.; LIN, Y. T. Characterization and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbon contaminations in surface sediment and water from Gao-ping River, Taiwan. **Water Research**, v. 38, n. 7, p. 1733–1744, 2004.

DOS REIS, I. M. M. et al. Histological responses and localization of the cytochrome P450 (CYP2A1) in *Crassostrea brasiliana* exposed to phenanthrene. **Aquatic Toxicology**, v. 169, p. 79–89, 2015.

DOUBEN, P.E.T. Introduction. In: DOUBEN, P.E.T. (Ed). **PAH: An Ecotoxicological Perspective**. Chichester: Wiley, 2003. 407p.

DYBING, E. et al. Hydrocarbons in Ambient Air and Cancer. **Iarc Scientific Publication**, v. 161, p. 75–94, 2010.

EDGAR, R. C. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 5, p. 1792–1797, 2004.

EDGE, K. J. et al. A biomarker of contaminant exposure is effective in large scale assessment of ten estuaries. **Chemosphere**, v. 100, p. 16–26, 2014.

EGGENS, M.L.; GALGANI, F. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in flatfish: fast determination with a fluorescence plate-reader. **Marine Environmental Research**, v. 33, p. 213-221, 1992.

EPA, UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Explanation of PAH benchmark calculations using EPA PAH ESB approach Originally developed by Dave Mount, ORD Duluth**. 2010. Disponível em <<https://archive.epa.gov/bpspill/web/pdf/explanation-of-pah-benchmark-calculations-20100622.pdf>>

EPA, UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY.

Correction of Deepwater Horizon Acute Screening Benchmarks for Aquatic Life. 2015. Disponível em
<<https://archive.epa.gov/bpspill/web/pdf/acute-benchmark-error-explanation-02-18-15.pdf>>

EPA, UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY.

Guidance for Reporting Toxic Chemicals: Polycyclic Aromatic Compounds Category, EPA 260-B-01-03, Washington, 2008.

FAO, FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED

NATIONS. **Species Fact Sheets *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793).** Fisheries and Aquaculture Department, 2005.

FARIA, M. et al. Contaminant accumulation and multi-biomarker responses in field collected zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) and crayfish (*Procambarus clarkii*), to evaluate toxicological effects of industrial hazardous dumps in the Ebro river (NE Spain). **Chemosphere**, v. 78, n. 3, p. 232–240, 2010.

FERNANDES, D.; LOI, B.; PORTE, C. Biosynthesis and metabolism of steroids in molluscs. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 127, n. 3–5, p. 189–195, 2011.

FEYEREISEN, R. Arthropod CYPomes illustrate the tempo and mode in P450 evolution. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1814, p. 19–28, 2011.

FINGER, S.E. et al. Comparison of Laboratory and Field Assessment of Fluorence—Part I: Effects of Fluorence on the Survival, Growth, Reproduction, and Behavior of Aquatic Organisms in Laboratory Tests. **ASTM International**, 1985.

FLORES-NUNES, F. et al. Effect of linear alkylbenzene mixtures and sanitary sewage in biochemical and molecular responses in pacific oyster *Crassostrea gigas*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, p.17386-17396, 2015.

GAGNAIRE, B. et al. Pollutant effects on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), hemocytes: Screening of 23 molecules using flow cytometry. **Cell Biology and Toxicology**, v. 22, n. 1, p. 1–14, 2006.

GAGNON, M. M.; RAWSON, C. A. Bioindicator species for EROD activity measurements: A review with Australian fish as a case study. **Ecological Indicators**, v. 73, p. 166–180, 2017.

GAMAGE, N. et al. Human sulfotransferases and their role in chemical metabolism. **Toxicological Sciences**, v. 90, n. 1, p. 5–22, 2006.

GAO, K. et al. Cytochrome P450 1A, 1B, and 1C mRNA induction patterns in three-spined stickleback exposed to a transient and a persistent inducer. **Comparative Biochemistry and Physiology – Part C**, v. 154, n. 1, p. 42–55, 2011.

GERBER, N. C.; SLIGAR, S. G. A role for Asp-251 in cytochrome P-450cam oxygen activation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 6, p. 4260–4266, 1994.

GERGER, C.J.; WEBER, L.P. Comparison of the acute effects of benzo-a-pyrene on adult zebrafish (*Danio rerio*) cardiorespiratory function following intraperitoneal injection versus aqueous exposure. **Aquatic Toxicology**, v. 165, p.19-30, 2015.

GOLDSTONE, J. V. et al. The chemical defensome: Environmental sensing and response genes in the *Strongylocentrotus purpuratus* genome. **Developmental Biology**, v. 300, p. 366–384, 2006.

GOLDSTONE, J. V. et al. Cytochrome P450 1 Genes in Early Deuterostomes (Tunicates and Sea Urchins) and Vertebrates (Chicken and Frog): Origin and Diversification of the CYP1 Gene Family. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, p. 2619–2631, 2007.

GOLDSTONE, J. V. et al. Cytochrome P450 1D1: A novel CYP1A-related gene that is not transcriptionally activated by PCB126 or TCDD. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 482, n. 1–2, p. 7–16, 2009.

GOLDSTONE, J. V. et al. Genetic and structural analyses of cytochrome P450 hydroxylases in sex hormone biosynthesis: Sequential origin and subsequent coevolution. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 94, p. 676–687, 2016.

GONÇALVES, R. et al. The joint effect of polycyclic aromatic hydrocarbons on fish behavior. **Environmental Research**, v. 108, p. 205-213, 2008.

GONZÁLEZ, J. J. et al. Spatial and temporal distribution of dissolved/dispersed aromatic hydrocarbons in seawater in the area affected by the Prestige oil spill. **Marine Pollution Bulletin**, v. 53, n. 5–7, p. 250–259, 2006.

GONZÁLEZ, J. F. et al. Kinetics of hepatic phase I and II biotransformation reactions in eight finfish species. **Marine Environmental Research**, v. 67, n. 4–5, p. 183–8, 2009.

GOSLING. E. **Morphology of Bivalves**. In: Gosling. E., Bivalve Molluscs: Biology, Ecology and Culture. Oxford: Fishing News Books, 2003. 443p.

GRAHAM, S.E.; PETERSON, J.A. How similar are P450s and what can their differences teach us? **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 369, n.1., p. 24-29, 1999.

GROSDIDIER, A.; ZOETE, V.; MICHIELIN, O. SwissDock, a protein-small molecule docking web service based on EADock DSS. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. SUPPL. 2, p. 270–277, 2011.

GRØSVIK, B. E. et al. CYP1A-immunopositive proteins in bivalves identified as cytoskeletal and major vault proteins. **Aquatic Toxicology**, v. 79, n. 4, p. 334–340, 2006.

GROVER, P.L.; SIMS, P. Enzyme-Catalysed Reactions of Polycyclic Hydrocarbons with Deoxyribonucleic Acid and Protein *in vitro*. **Biochemical Journal**, v.110, p.159-160, 1968.

GROVES, J. T. Cytochrome P450 enzymes: understanding the biochemical hieroglyphs. **F1000Research**, v. 4, n. 178, 2015.

- GUENGERICH, F. P. Cytochrome P450 and chemical toxicology. **Chemical Research in Toxicology**, v. 21, n. 1, p. 70–83, 2008.
- GUENGERICH, F. P.; MACDONALD, T. L. Chemical Mechanisms of Catalysis by Cytochromes P450: A Unified View. **Accounts of Chemical Research**, v. 17, p. 9–16, 1984.
- GUENGERICH, F. P.; SHIMADA, T. Oxidation of toxic and carcinogenic chemicals by human cytochrome P-450 enzymes. **Chemical Research in Toxicology**, v. 4, n. 4, p. 391–407, 1991.
- GUENGERICH, F. P.; WATERMAN, M. R.; EGLI, M. Recent Structural Insights into Cytochrome P450 Function. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 37, n. 8, p. 625–640, 2016.
- GUO, W. et al. Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in water, suspended particulate matter and sediment from Daliao River watershed, China. **Chemosphere**, v. 68, n. 1, p. 93–104, 2007.
- GUO, R. et al. The detoxification responses, damage effects and bioaccumulation in the scallop *Chlamys farreri* exposed to single and mixtures of benzo[a]pyrene and chrysene. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part C**, v. 191, p. 36–51, 2017.
- HAHN, M. E. Aryl hydrocarbon receptors: diversity and evolution. **Chemico-Biological Interactions**, v. 141, n. 1–2, p. 131–60, 2002.
- HAHN, M. E.; KARCHNER, S. I.; MERSON, R. R. Diversity as opportunity: Insights from 600 million years of AHR evolution. **Current Opinion in Toxicology**, v. 2, p. 58–71, 2017.
- HALPERT, J.R. et al. Contemporary issues in toxicology. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 125, p. 163–175, 1994.
- HAMBERGER, B.; BAK, S. Plant P450s as versatile drivers for evolution of species-specific chemical diversity. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, v. 368, n. 1612, 2013.

HANNEMANN, F. et al. Cytochrome P450 systems-biological variations of electron transport chains. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1770, n. 3, p. 330–344, 2007.

HARITOS, V. S.; FRENCH, J. R. J.; AHOKAS, J. T. Cytochrome P450 monooxygenase and glutathione S-transferase activity of two Australian termites: *Mastotermes darwiniensis* and *Coptotermes acinaciformis*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 24, n. 9, p. 929–935, 1994.

HASEMANN, C. A. et al. Structure and function of cytochromes P450: a comparative analysis of three crystal structures. **Structure**, v. 3, n. 1, p. 41–62, 1995.

HEFFERNAN, L. M.; WINSTON, G. W. Spectral analysis and catalytic activities of the microsomal mixed-function oxidase system of the sea anemone (phylum: Cnidaria). **Comparative Biochemistry and Physiology - Part C**, v. 121, n. 1–3, p. 371–83, 1998.

HIGGINS, L. G.; HAYES, J. D. Mechanisms of induction of cytosolic and microsomal glutathione transferase (GST) genes by xenobiotics and pro-inflammatory agents. **Drug Metabolism Reviews**, v. 43, n. 2, p. 92–137, 2011.

HODSON, P.V. et al. Protocols for measuring mixed function oxigenases of fish liver. **Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences 1829**, 49p. 1991.

HU, K.; BUNCE, N. J. Metabolism of Polychlorinated Dibenzo-*p*-dioxins by Rat Liver Microsomes. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 13, n. 6, p. 307–315, 1999.

IKENAKA, Y. et al. Metabolism of pyrene by aquatic crustacean, *Daphnia magna*. **Aquatic Toxicology**, v. 80, n. 2, p. 158–165, 2006.

IKENAKA, Y. et al. Characterization of phase-II conjugation reaction of polycyclic aromatic hydrocarbons in fish species: Unique pyrene metabolism and species specificity observed in fish species.

Environmental Toxicology and Pharmacology, v. 36, n. 2, p. 567–578, 2013.

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

INUI, H. et al. Mammalian cytochrome P450-dependent metabolism of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and coplanar polychlorinated biphenyls. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 8, p. 14044–14057, 2014.

IRWIN, J. J.; SHOICHET, B. K. ZINC - A free database of commercially available compounds for virtual screening. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 45, p. 177–182, 2005.

ISIN, E. M.; GUENGERICH, F. P. Complex reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1770, p. 314– 329, 2007.

IWAMOTO, D. V et al. Induction of cytochrome P450 family 1 mRNAs and activities in a cell line from the frog *Xenopus laevis*. **Aquatic Toxicology**, v. 114–115, p. 165–72, 2012.

IYANAGI, T. Structure and function of NADPH-cytochrome P450 reductase and nitric oxide synthase reductase domain. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 338, p. 520–528, 2005.

IYANAGI, T. Molecular Mechanism of Phase I and Phase II Drug-Metabolizing Enzymes: Implications for Detoxification. **International Review of Cytology**, v. 260, n. 6, p. 35–112, 2007.

JARVIS, I. W. H. et al. Persistent activation of DNA damage signaling in response to complex mixtures of PAHs in air particulate matter. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 266, n. 3, p. 408–418, 2013.

JENNY, M. J. et al. Transcriptomic evaluation of the American oyster, *Crassostrea virginica*, deployed during the Deepwater Horizon oil spill:

Evidence of an active hydrocarbon response pathway. **Marine Environmental Research**, v. 120, p. 166–181, 2016.

JENSEN, M.H.; NIELSEN, T.G.; DAHLÖF, I. Effects of pyrene on grazing and reproduction of *Calanus finmarchicus* and *Calanus glacialis* from Disko Bay, West Greenland. **Aquatic Toxicology**, v. 87, p. 99–107, 2008.

JIN, M. S. et al. Crystal structure of the multidrug transporter P-glycoprotein from *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 490, n. 7421, p. 566–9, 2012.

JOHANSSON, K. et al. Multiple roles of microsomal glutathione transferase 1 in cellular protection: A mechanistic study. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 49, n. 11, p. 1638–1645, 2010.

JÖNSSON, M. E. et al. New CYP1 genes in the frog *Xenopus (Silurana) tropicalis*: Induction patterns and effects of AHR agonists during development. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 250, n. 2, p. 170–183, 2011a.

JÖNSSON, M. E. et al. Cytochrome P450 1 genes in birds: Evolutionary relationships and transcription profiles in chicken and Japanese quail embryos. **PLoS ONE**, v. 6, 2011b.

JRC-EC, JOINT RESEARCH CENTRE - EUROPEAN COMMISSION. **Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) Factsheet, JRC 66955- 2011**. JRC Technical Notes. European Union, 2011.

KANDEL, S. E.; LAMPE, J. N. Role of protein –protein interactions in cytochrome P450-mediated drug metabolism and toxicity. **Chemical Research in Toxicology**, v. 27, p. 1474–1486, 2014.

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

KEITH, L. H. The Source of U.S. EPA's Sixteen PAH Priority Pollutants. **Polycyclic Aromatic Compounds**, v. 35, n. 2–4, p. 147–160, 2014.

KERR, J. M. et al. Polycyclic hydrocarbon content in crude oils around the world. **SPE/EPA Exploration and Production Environmental Conference**, p. 10, 1999.

KIM, K. et al. Glutathione S-transferase omega 1 activity is sufficient to suppress neurodegeneration in a *Drosophila* model of Parkinson disease. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 9, p. 6628–6641, 2012.

KING-JONES, K. et al. The DHR96 nuclear receptor regulates xenobiotic responses in *Drosophila*. **Cell Metabolism**, v. 4, n. 1, p. 37–48, 2006.

KLINGENBERG, M. Pigments of rat liver microsomes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 75, n. 2, p. 376–386, 1958.

KOLEY, A. P. et al. Differential mechanisms of cytochrome P450 inhibition and activation by alpha-naphthoflavone. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 6, p. 3149–52, 1997.

KRIEGER, E.; KORAIMANN, G.; VRIEND, G. Increasing the precision of comparative models with YASARA NOVA - A self-parameterizing force field. **Proteins: Structure, Function and Genetics**, v. 47, n. 3, p. 393–402, 2002.

KRISHNA, R.; MAYER, L. D. Multidrug resistance (MDR) in cancer mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 11, n. 4, p. 265–283, 2000.

LAMB, D. C. et al. The First Virally Encoded Cytochrome P450. **Journal of Virology**, v. 83, n. 16, p. 8266–8269, 2009.

LASKOWSKI, R. A.; SWINDELLS, M. B. LigPlot + : Multiple Ligand À Protein Interaction Diagrams for Drug Discovery. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 51, p. 2778–2786, 2011.

LATIMER, J.S.; ZHENG, J. The Sources, Transport, and Fate of PAHs in the Marine Environment. In: DOUBEN, P.E.T. (Ed). **PAH: An Ecotoxicological Perspective**. Chichester: Wiley, 2003. 407p.

LAZOSKI, C. **Sistemática molecular e genética populacional de ostras brasileiras (*Crassostrea* spp.)**. 2004. Tese (Doutorado em Genética) - Curso de Pós-Graduação em Genética, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

LEE, A. J. et al. Characterization of the oxidative metabolites of 17 β -estradiol and estrone formed by 15 selectively expressed human cytochrome P450 isoforms. **Endocrinology**, v. 144, n. 8, p. 3382–3398, 2003.

LEMAIRE, P.; LIVINGSTONE, D.R. Effects of the inhibitor ellipticine on cytochrome P450-reductase and cytochrome P450 (1A) function in hepatic microsomes of flounder (*Platichthys flesus*). **Marine Environmental Research**, v. 39, p. 73–77, 1995.

LEÓN, V. M. et al. Interspecific comparison of polycyclic aromatic hydrocarbons and persistent organochlorines bioaccumulation in bivalves from a Mediterranean coastal lagoon. **Science of the Total Environment**, v. 463–464, p. 975–987, 2013.

LEVINE, S.L.; ORIS, J.T. Noncompetitive mixed-type inhibition of rainbow trout CYP1A catalytic activity by clotrimazole. **Comparative Biochemistry and Physiology – Part C**, v. 122, p. 205–210, 1999.

LEVINE, S.L.; CZOSNYKA, H.; ORIS, J.T. Effect of the fungicide clotrimazole on the bioconcentration of benzo[a]pyrene in gizzard shad (*Dorosoma cepedianum*): *in vivo* and *in vitro* inhibition of cytochrome p4501a activity. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 16, p. 306–311, 1997.

LEWIS, B. C.; MACKENZIE, P. I.; MINERS, J. O. Comparative homology modeling of human cytochrome P4501A1 (CYP1A1) and confirmation of residues involved in 7-ethoxyresorufin O -deethylation by site-directed mutagenesis and enzyme kinetic analysis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 468, p. 58–69, 2007.

LIBRANDO, V.; SARPIETRO, M. G.; CASTELLI, F. Role of lipophilic medium in the absorption of polycyclic aromatic compounds by biomembranes. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 14, n. 1–2, p. 25–32, 2003.

LIM, H. et al. Thermal stress induces a distinct transcriptome profile in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part D**, v. 19, p. 62–70, 2016.

LIMA, A.L.C.; FARRINGTON, J.W. REDDY, C.M. Combustion-Derived Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Environment—A Review. **Environmental Forensics**, v.6, p.109-131, 2005

LINDBLOM, T. H.; PIERCE, G. J.; SLUDER, A. E. A *C. elegans* orphan nuclear receptor contributes to xenobiotic resistance. **Current Biology**, v. 11, n. 11, p. 864–868, 2001.

LINGWOOD, D.; SIMONS, K. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. **Science**, v. 327, n. 5961, p. 46–50, 2010.

LIU, J. et al. The effect of reciprocal active site mutations in human cytochromes P450 1A1 and 1A2 on alkoxyresorufin metabolism. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.424, p. 33–43, 2004.

LIU, Y.; YAO, Z.-X.; PAPAPOULOS, V. Cytochrome P450 17 α hydroxylase/17,20 lyase (CYP17) function in cholesterol biosynthesis: identification of squalene monooxygenase (epoxidase) activity associated with CYP17 in Leydig cells. **Molecular Endocrinology**, v. 19, n. 7, p. 1918–31, 2005.

LIVINGSTONE, D. R. The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: Quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. **Comparative Biochemistry and Physiology – Part A**, v. 120, n. 1, p. 43–49, 1998.

LOPES, G.R. **Crescimento da ostra-do-mangue *Crassostrea brasiliiana* (Lamarck, 1819) cultivada em dois ambientes no estado de Santa Catarina**. 2008. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Curso de Pós-

Graduação em Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

LORBK, G.; LEWINSKA, M.; ROZMAN, D. Cytochrome P450s in the synthesis of cholesterol and bile acids - From mouse models to human diseases. **FEBS Journal**, v. 279, p. 1516–1533, 2012.

LOTUFO, G.R.; FLEEGER, J.W. Toxicity of sediment-associated pyrene and phenanthrene to *Limnodrilus hoffmeisteri* (oligochaeta: Tubificidae). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 15, p. 1508–1516, 1996.

LU, G. H.; WANG, C.; ZHU, Z. The dose-response relationships for EROD and GST induced by polyaromatic hydrocarbons in *Carassius auratus*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 82, n. 2, p. 194–199, 2009.

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

LÜCHMANN, K. H. et al. A light in the darkness: New biotransformation genes, antioxidant parameters and tissue-specific responses in oysters exposed to phenanthrene. **Aquatic Toxicology**, v. 152, p. 324–334, 2014.

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

LUPO, P. J. et al. Maternal occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: Effects on gastroschisis among offspring in the national birth defects prevention study. **Environmental Health Perspectives**, v. 120, n. 6, p. 910–915, 2012.

LUU-THE, V. Assessment of steroidogenesis and steroidogenic enzyme functions. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 137, p. 176–182, 2013.

MACLEOD, W.D. et al. Standard Analytical Procedures of the NOAA National Analytical Facility, 1985-1986. **Extractable Toxic Organic Components**. 2. ed., U. S. Department of Commerce, NOAA/NMFS. NOAA Tech. Memo. NMFS F/NWC-92, p. 121, 1986.

MARANHO, L. A. et al. The application of biochemical responses to assess environmental quality of tropical estuaries: field surveys. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 14, n. 10, p. 2608, 2012.

MARTÍNEZ-GÓMEZ, C. et al. Biomarkers of general stress in mussels as common indicators for marine biomonitoring programmes in Europe: The ICON experience. **Marine Environmental Research**, v. 124, p. 70–80, 2015.

MATTOS, J. J. et al. Differential gene expression in *Poecilia vivipara* exposed to diesel oil water accommodated fraction. **Marine Environmental Research**, v. 69, n. SUPPL. 1, p. S31–S33, 2010.

MAY, W.E.; WASIK, S.O.; FREEMAN, D.H. Determination of the solubility behavior of some polycyclic aromatic hydrocarbons in water. **Analytical Chemistry**, v. 50, p. 997-1000, 1978.

MCMANUS, M. E. et al. Metabolism of 2-Acetylaminofluorene and Benzo (*a*) pyrene and Activation of Food- derived Heterocyclic Amine Mutagens by Human Cytochromes P-450. **Cancer Research**, v. 50, p. 3367-3376, 1990.

MCNUTT, M. K. et al. Applications of science and engineering to quantify and control the Deepwater Horizon oil spill. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 50, p. 20222–8, 2012.

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

- MEDEIROS, I. D. et al. Induced gene expression in oyster *Crassostrea gigas* exposed to sewage. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 26, n. 3, p. 362–365, 2008b.
- MELLO, D. F. et al. Cellular and transcriptional responses of *Crassostrea gigas* hemocytes exposed in vitro to brevetoxin (PbTx-2). **Marine Drugs**, v. 10, n. 3, p. 583–597, 2012.
- MENON, D.; BOARD, P.G. A Role for Glutathione Transferase Omega 1 (GSTO1-1) in the Glutathionylation Cycle. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n.36, p. 25769–25779, 2013.
- MEUNIER, B.; DE VISSER, S. P.; SHAIK, S. Mechanism of oxidation reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes. **Chemical Reviews**, v. 104, n. 9, p. 3947–3980, 2004.
- MEYER, U. A. Overview of enzymes of drug metabolism. **Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics**, v. 24, n. 5, p. 449–459, 1996.
- MILLER, M. M. et al. Relationships Between Octanol-Water Partition Coefficients and Aqueous Solubility. **Environmental Science & Technology**, v. 19, p.522-529, 1985.
- MIRANDA, C. L. et al. Evaluation of Chemicals as Inhibitors of Trout Cytochrome P450s 1 Evaluation of Chemicals as Inhibitors of Trout Cytochrome. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 244, p. 237–244, 1998.
- MITCHELMORE, C. L.; CHIPMAN, J. K. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 399, n. 2, p. 135–147, 1998.
- MONARI, M. et al. Investigation of EROD, CYP1A immunopositive proteins and SOD in haemocytes of *Chamelea gallina* and their role in response to B[a]P. **Comparative Biochemistry and Physiology – Part C**, v. 149, n. 3, p. 382–392, 2009.

MORGA, B. et al. Cellular and molecular responses of haemocytes from *Ostrea edulis* during in vitro infection by the parasite *Bonamia ostreae*. **International Journal for Parasitology**, v. 41, n. 7, p. 755–764, 2011.

MORGENSTERN, R. GUTHENBERG, C.; DEPIERRE J.W. Microsomal Glutathione S-Transferase. Purification, Initial Characterization and Demonstration That It Is Not Identical to the Cytosolic Glutathione S-Transferases A, B and C. **European Journal of Biochemistry**, v. 128, p. 243-248, 1982.

MOSIALOU, E. et al. Evidence that rat liver microsomal glutathione transferase is responsible for glutathione-dependent protection against lipid peroxidation. **Biochemical Pharmacology**, v. 45, p. 1645-1651, 1993.

MOSIALOU, E.; MORGENSTERN, R. Activity of rat liver microsomal glutathione transferase toward products of lipid peroxidation and studies of the effect of inhibitors on glutathione-dependent protection against lipid peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 275, n. 1, p. 289–294, 1989.

MURRAY, I.A.; PATTERSON, A.D.; PERDEW, G.H. Aryl hydrocarbon receptor ligands in cancer: friend and foe. **Nature Reviews Cancer**, v. 14, n. 12, p. 801–814, 2014.

NAHRGANG, J. et al. Biomarker responses in polar cod (*Boreogadus saida*) exposed to the water soluble fraction of crude oil. **Aquatic Toxicology**, v. 97, n. 3, p. 234–242, 2010.

NASCIMENTO, I.A. *Crassostrea rhizophorae* (Guilding) and *Crassostrea brasiliiana* (Lamarck) in South and America Central. In: Menzel, W. (ed) **Estuarine and marine bivalve mollusk culture**. CRC Press, Boca Raton, 1991, p. 125-134.

NELBERT, D.W.; TIMOTHY, P.D. The role of cytochrome P450 enzymes in endogenous signalling pathways and environmental carcinogenesis. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, p. 947-960, 2006.

NEBERT, D. W.; RUSSELL, D. W. Clinical importance of the cytochromes P450. **The Lancet**, v. 360, n. 9340, p. 1155–1162, 2002.

NELSON, D.R. Metazoan cytochrome P450 evolution. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part C**, v. 121, p. 15–22, 1998.

NELSON, D.R. Cytochrome P450 Nomenclature. In: PHILLIPS, I.R.; SHEPHARD, E.A. (Ed.). **Cytochrome P450 Protocols**. 2. ed. New Jersey: Humana Press Inc, 2006. p. 1-10.

NELSON, D. R. The cytochrome P450 homepage. **Human Genomics**, v. 4, n. 1, p. 59–65, 2009.

NELSON, D. R. Progress in tracing the evolutionary paths of cytochrome P450. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1814, n. 1, p. 14–18, 2011.

NELSON, D. R. et al. The cytochrome P450 genesis locus : the origin and evolution of animal cytochrome P450s. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 368, 2013.

NIEHOFF, N. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons and postmenopausal breast cancer: An evaluation of effect measure modification by body mass index and weight change. **Environmental Research**, v. 152, n. August 2016, p. 17–25, 2017.

NILSEN, B.M., BERG, K., GOKSØYR, A. **Induction of cytochrome P4501A (CYP1A) in fish: a biomarker for environmental pollution**. In: Philips, I.R. and Shephard, E.A. (Eds), *Methods in Molecular Biology (Cytochrome P450 protocols)*. Humana press Inc., Totowa, p. 423-438, 1998.

NOGUEIRA, L. et al. Biochemical biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) after short-term exposure to diesel oil, pure biodiesel and biodiesel blends. **Chemosphere**, v. 85, n. 1, p. 97–105, 2011.

NRC, NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Oil in the Sea III: Inputs, Fates and Effects**. Washington: The National Academies Press, 2003. 265p.

OKAY, O.S. Effects of pyrene on mussels in different experimental conditions. *Environment International*, v.32, p. 538– 544, 2006.

OKEY, A. B. An aryl hydrocarbon receptor odyssey to the shores of toxicology: The Deichmann Lecture, International Congress of Toxicology-XI. **Toxicological Sciences**, v. 98, n. 1, p. 5–38, 2007.

OLIVEIRA, M. et al. Single and combined effects of microplastics and pyrene on juveniles (0+ group) of the common goby *Pomatoschistus microps* (Teleostei, Gobiidae). **Ecological Indicators**, v. 34, p. 641–647, 2013.

OLIVEIRA, M.; GRAVATO, C.; GUILHERMINO, L. Acute toxic effects of pyrene on *Pomatoschistus microps* (Teleostei, Gobiidae): Mortality, biomarkers and swimming performance. **Ecological Indicators**, v. 19, p. 206–214, 2012.

OMIECINSKI, C. J. et al. Xenobiotic metabolism, disposition, and regulation by receptors: From biochemical phenomenon to predictors of major toxicities. **Toxicological Sciences**, v. 120, n. Suppl.1, S49-S75, 2011.

OMURA, T.; SATO, R. A New Cytochrome in Liver Microsomes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 237, p. 1375–1376, 1962.

OMURA, T.; SATO, R. The Carbon Monoxide-binding pigment of Liver Microsomes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 239, n. 7, p. 2370–2378, 1964.

ORTIZ DE MONTELLANO, P.R. Hydrocarbon Hydroxylation by Cytochrome P450 Enzymes. **Chemical Reviews**, v. 110, n. 2, p. 932-948, 2010.

OTYEPKA, M. et al. What common structural features and variations of mammalian P450s are known to date? **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1770, n. 3, p. 376–389, 2007.

PÉREZ-CADAHÍA, B. et al. Evaluation of PAH bioaccumulation and DNA damage in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) exposed to spilled

Prestige crude oil. **Comparative Biochemistry and Physiology –Part C**, v. 138, n. 4, p. 453–460, 2004.

PESONEN, M.; GOKSOYR, A.; ANDERSSON, T. Expression of P4501A1 in a primary culture of rainbow trout hepatocytes exposed to β -naphthoflavone or 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 292, n. 1, p. 228–233, 1992.

PESSATI, T.B. et al. Upregulation of biotransformation genes in gills of oyster *Crassostrea brasiliiana* exposed in situ to urban effluents, Florianópolis Bay, Southern Brazil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 131, p. 172-180, 2016.

PETTERSEN, E. F. et al. UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1605–1612, 2004.

PIAZZA, R. S. et al. Exposure to phenanthrene and depuration: Changes on gene transcription, enzymatic activity and lipid peroxidation in gill of scallops *Nodipecten nodosus*. **Aquatic Toxicology**, v. 177, p. 146–155, 2016.

POULOS, T.L., JOHNSON, E.R. Structures of Cytochrome P450 Enzymes. In: ORTIZ DE MONTELLANO, P.R. (Ed.). **Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry**, 3. ed. Nova Iorque: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2005. p. 87-114.

POULOS, T. L.; JOHNSON, E. R. Structures of Cytochrome P450 Enzymes. In: ORTIZ DE MONTELLANO, P.R. (Ed.). **Cytochrome P450. Structure, Mechanism and Biochemistry**. 4. ed. Londres: Springer, 2015. p. 3-32.

RAVINDRA, K.; SOKHI, R.; VAN GRIEKEN, R. Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: Source attribution, emission factors and regulation. **Atmospheric Environment**, v. 42, n. 13, p. 2895–2921, 2008.

RENDIC, S. P.; GUENGERICH, F. P. Survey of Human Oxidoreductases and Cytochrome P450 Enzymes Involved in the Metabolism of Chemicals. **Chemical Research in Toxicology**, v. 28, p 38-42, 2015.

REQUEJO, A. G.; BOEHM, P. D. Characterization of hydrocarbons in a subsurface oil-rich layer in the Sargasso Sea. **Marine Environmental Research**, v. 17, n. 1, p. 45–64, 1985.

REWITZ, K. F. et al. Marine invertebrate cytochrome P450: Emerging insights from vertebrate and insect analogies. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part C**, v. 143, n. 4, p. 363–381, 2006.

REYNAUD, S.; DESCHAUX, P. The effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on the immune system of fish: A review. **Aquatic Toxicology**, v. 77, n. 2, p. 229–238, 2006.

REYNAUD, S.; RAVETON, M.; RAVANEL, P. Interactions between immune and biotransformation systems in fish: A review. **Aquatic Toxicology**, v. 87, n. 3, p. 139–145, 2008.

REY-SALGUEIRO, L. et al Determination of kinetic bioconcentration in mussels after shortterm exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. **Heliyon**, v.3, e00231, 2017.

RIVERA, S. P.; SAARIKOSKI, S. T.; HANKINSON, O. Identification of a novel dioxin-inducible cytochrome P450. **Molecular Pharmacology**, v. 61, n. 2, p. 255–259, 2002.

ROCHA MONTEIRO, P. R.; REIS-HENRIQUES, M. A.; COIMBRA, J. Polycyclic aromatic hydrocarbons inhibit *in vitro* ovarian steroidogenesis in the flounder (*Platichthys flesus* L.). **Aquatic Toxicology**, v. 48, n. 4, p. 549–559, 2000.

RODRIGUES-SILVA, C. et al. Expression and immunohistochemical localization of the cytochrome P450 isoform 356A1 (CYP356A1) in oyster *Crassostrea gigas*. **Aquatic Toxicology**, v. 159, p. 267–275, 2015.

ROTCHHELL, J. M.; STEVENTON, G. B.; BIRD, D. J. Catalytic properties of CYP1A isoforms in the liver of an agnathan (*Lampetra fluviatilis*) and

two species of teleost (*Pleuronectes flesus*, *Anguilla anguilla*).

Comparative Biochemistry and Physiology – Part C, v. 125, n. 2, p. 203–14, 2000.

ROWLAND, A.; MINERS, J. O.; MACKENZIE, P. I. The UDP-glucuronosyltransferases: Their role in drug metabolism and detoxification. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 45, n. 6, p. 1121–1132, 2013.

RUST, A. J. et al. Relationship between metabolism and bioaccumulation of benzo[a]pyrene in benthic invertebrates. **Environmental Toxicology and Chemistry / SETAC**, v. 23, n. 11, p. 2587–93, 2004.

SALVI, D.; MACALI, A.; MARIOTTINI, P. Molecular phylogenetics and systematics of the bivalve family Ostreidae based on rRNA sequence-structure models and multilocus species tree. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, p. 19–21, 2014.

SANSEN, S. et al. Adaptations for the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons exhibited by the structure of human P450 1A2. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, p. 14348–14355, 2007.

SCHLENK D.; BUHLER D.R. Xenobiotic biotransformation in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). **Comparative Biochemistry and Physiology - Part C**, v. 94, p. 469-475, 1989.

SCHLEZINGER, J. J.; STEGEMAN, J. J. Induction and suppression of cytochrome P450 1A by 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl and its relationship to oxidative stress in the marine fish scup (*Stenotomus chrysops*). **Aquatic Toxicology**, v. 52, p. 101–115, 2001.

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

SCHÖNE, B. R.; KRAUSE, R. A. Retrospective environmental biomonitoring – Mussel Watch expanded. **Global and Planetary Change**, v. 144, p.228-251, 2016.

SEABRA-PEREIRA, C. D. et al. Integrated biomarker responses as environmental status descriptors of a coastal zone (São Paulo, Brazil). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 5, p. 1257–1264, 2011.

SEABRA-PEREIRA, C. D. et al. Ecological relevance of Sentinels' biomarker responses: a multi-level approach. **Marine Environmental Research**, v. 96, p. 118–26, 2014.

SEGEL, I. H. **Enzyme kinetics: behavior and analysis of rapid equilibrium and steady state enzyme systems**. Nova Iorque: Wiley, 1993. 957p.

SERRANO, M. A. S. et al. Differential gene transcription, biochemical responses, and cytotoxicity assessment in Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to ibuprofen. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 22, p. 17375–17385, 2015.

SESARDIC, D. et al. Furafylline is a potent and selective inhibitor of cytochrome P4501A2 in man. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 29, p. 651–663, 1990.

SHIMADA, T. et al. Activation of Chemically Diverse Procarcinogens by Human Cytochrome P-450 1B1. **Cancer Research**, v. 56, p. 2979–2984, 1996.

SHIMADA, T. et al. Oxidation of xenobiotics by recombinant human cytochrome P450 1B1. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 25, n. 5, p. 617–622, 1997.

SHIMADA, T. Xenobiotic-metabolizing enzymes involved in activation and detoxification of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. **Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 21, n. 4, p. 257–276, 2006.

SHIRDEL, I. et al. The response of thyroid hormones, biochemical and enzymological biomarkers to pyrene exposure in common carp (*Cyprinus carpio*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 130, p. 207–221, 2016.

- SHOFER, S.L.; TJEERDEMA, R.S. Comparative Disposition and Biotransformation of Pentachlorophenol in the Oyster (*Crassostrea gigas*) and Abalone (*Haliotis fulgens*). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 46, p. 85-95, 1993.
- SIEBERT, M.N. et al. Characterization of ethoxyresorufin O-deethylase activity (EROD) in oyster *Crassostrea brasilina*. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part B**, v. 203, p. 115–121, 2017a.
- SIEBERT, M.N. et al. Candidate cytochrome P450 genes for ethoxyresorufin O-deethylase activity in oyster *Crassostrea gigas*. **Aquatic Toxicology**, v. 189, p.142-149, 2017b.
- SIEVERS, F. et al. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. **Molecular Systems Biology**, v. 7, n. 1, p. 539, 2011.
- SIKKEMA, J.; DE BONT, J. A. M.; POOLMAN, B. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 11, p. 8022–8028, 1994.
- SIKKEMA, J.; DE BONT, J. A.; POOLMAN, B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. **Microbiological Reviews**, v. 59, n. 2, p. 201–222, 1995.
- SILVA, C. et al. Benthic community structure and biomarker responses of the clam *Scrobicularia plana* in a shallow tidal creek affected by fish farm effluents (Rio San Pedro, SW Spain). **Environment International**, v. 47, p. 86–98, 2012.
- SINAEI, M. Effect of 16 pure hydrocarbons on the stabilization and lysis of fish (mudskipper: *Boleophthalmus dussumieri*) erythrocytes. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 98, p. 257–265, 2013.
- SIRITANTIKORN, A. et al. Protection of cells from oxidative stress by microsomal glutathione transferase 1. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 355, n. 2, p. 592–596, 2007.

- SKUPIŃSKA, K.; MISIEWICZ, I.; KASPRZYCKA-GUTTMAN, T. Polycyclic aromatic hydrocarbons: Physicochemical properties, environmental appearance and impact on living organisms. **Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research**, v.1, p.233-240, 2004.
- SOKAL, R. R.; ROHLF, F.J. **Biometry: The Principles and Practices of Statistics in Biological Research**. 4. ed. Nova Iorque: W.H. Freeman and Company, 2012. 915p.
- SOLÉ, M.; LIVINGSTONE, D. R. Components of the cytochrome P450-dependent monooxygenase system and "NADPH-independent benzo[a]pyrene hydroxylase" activity in a wide range of marine invertebrate species. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part C**, v. 141, n. 1, p. 20–31, 2005.
- SORIANO, J. A. et al. Spatial and temporal trends of petroleum hydrocarbons in wild mussels from the Galician coast (NW Spain) affected by the Prestige oil spill. **Science of the Total Environment**, v. 370, n. 1, p. 80–90, 2006.
- SPARKS, C.; ODENDAAL, J.; SNYMAN, R. An analysis of historical Mussel Watch Programme data from the west coast of the Cape Peninsula, Cape Town. **Marine Pollution Bulletin**, v. 87, n. 1, p. 374–380, 2014.
- STEGEMAN, J. J. et al. Functional characterization of zebrafish cytochrome P450 1 family proteins expressed in yeast. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1850, n. 11, p. 2340–2352, 2015.
- STROLIN BENEDETTI, M. FAD-dependent enzymes involved in the metabolic oxidation of xenobiotics. **Annales Pharmaceutiques Françaises**, v. 69, n. 1, p. 45–52, 2011.
- SUN, Y. et al. Hydroxyl radical generation and oxidative stress in *Carassius auratus* liver, exposed to pyrene. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 71, n. 2, p. 446–453, 2008.
- SUREDA, A. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbon levels and measures of oxidative stress in the Mediterranean endemic bivalve *Pinna nobilis*

exposed to the Don Pedro oil spill. **Marine Pollution Bulletin**, v. 71, p. 69–73, 2013.

SYED, K.; MASHELE, S. S. Comparative analysis of P450 signature motifs EXXR and CXG in the large and diverse Kingdom of Fungi: Identification of evolutionarily conserved amino acid patterns characteristic of P450 family. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, 2014.

TASSANEEYAKUL, W. et al. Specificity of Substrate and Inhibitor Probes for Human Cytochromes P450 1A1 and 1A2. J. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 265, p. 401-407, 1993.

THEBAULT, H; BAENA, A. M.R. Mediterranean Mussel Watch: a Regional Program for Detecting Radionuclides, Trace- and Emerging-Contaminants. **Commission Internationale pour l'Exploration Scientifique de la Méditerranée**. v. 38, p. 41, 2007.

THOMAS, P.; WOFFORD, H.W.; NEFF, J.M. Biochemical stress responses of striped mullet (*Mugil cephalus* L.) to fluorene analogs. **Aquatic Toxicology**, v. 1, p. 329-342, 1981.

TIAN, S. et al. Environmentally relevant concentrations of benzo[a]pyrene affect steroid levels and affect gonad of male scallop *Chlamys farreri*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 114, p. 150–156, 2015.

TIAN, S.; PAN, L.; SUN, X. An investigation of endocrine disrupting effects and toxic mechanisms modulated by benzo[a]pyrene in female scallop *Chlamys farreri*. **Aquatic Toxicology**, v. 144–145, p. 162–171, 2013.

TIAN, S.; PAN, L.; ZHANG, H. Identification of a CYP3A-like gene and CYPs mRNA expression modulation following exposure to benzo[a]pyrene in the bivalve mollusk *Chlamys farreri*. **Marine Environmental Research**, v. 94, p. 7–15, 2014.

TIJET, N. et al. The aryl hydrocarbon receptor regulates distinct dioxin-dependent and dioxin-independent gene batteries. **Molecular Pharmacology**, v. 69, p. 140-153, 2006.

- TILLER, G. E. et al. Hydrogenation of Triton X-100 Eliminates Its Fluorescence and Ultraviolet Light Absorption while Preserving Its Detergent Properties. **Analytical Biochemistry**, v. 266, p. 262–266, 1984.
- TOLEDO-SILVA, G. DE et al. Cloning a new cytochrome P450 isoform (CYP356A1) from oyster *Crassostrea gigas*. **Marine Environmental Research**, v. 66, n. 1, p. 15–18, 2008.
- TOMINGAS, R. et al. A Modified Method for the Assay Hydroxylase. **Analytical Biochemistry**, v. 53, p. 373–383, 1973.
- TORRES, R. J. et al. Bioaccumulation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Mercury in Oysters (*Crassostrea rhizophorae*) from Two Brazilian Estuarine Zones. **International Journal of Oceanography**, v. 2012, p. 1–8, 2012.
- TU, Y. et al. Application of molecular modeling for prediction of substrate specificity in cytochrome P450 1A2 mutants. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 36, p. 2371–2380, 2008.
- UEDA, H. et al. Phase-II conjugation ability for PAH metabolism in amphibians: Characteristics and inter-species differences. **Aquatic Toxicology**, v. 105, n. 3–4, p. 337–343, 2011.
- UNO, S. et al. Oral exposure to benzo[a]pyrene in the mouse: detoxication by inducible cytochrome P450 is more important than metabolic activation. **Molecular Pharmacology**, v. 65, n. 5, p. 1225–1237, 2004.
- UNO, Y. et al. Macaque cytochromes P450: nomenclature , transcript , gene , genomic structure , and function. **Drug Metabolism Reviews**, v. 43, p. 346–361, 2011.
- VALAVANIDIS, A. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons in surface seawater and in indigenous mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from coastal areas of the Saronikos Gulf (Greece). **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 79, n. 4, p. 733–739, 2008.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N.P.E. Fish Bioaccumulation and Biomarkers in Environmental Risk Assessment: A Review.

Environmental Toxicology and Pharmacology, v. 13, p. 57149, 2003.

VIARENGO, A. et al. The use of biomarkers in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. **Comparative Biochemistry and Physiology – Part C**, v. 146, n. 3, p. 281–300, 2007.

VOGELER, S. et al. The nuclear receptor gene family in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, contains a novel subfamily group. **BMC Genomics**, v. 15, n. 1, p. 369, 2014.

WALKER, C.H. et al. Biomarkers. In: WALKER et al. **Principles of Ecotoxicology**. 4. ed. Boca Raton: CRC Press, 2012. p. 172-188.

WALLIN, H.; MORGENSTERN, F. Activation of Microsomal Glutathione Transferase Activity by Reactive Intermediates Formed During the Metabolism of Phenol. **Chemico-Biological Interactions**, v. 75, p. 185-199, 1990.

WALSH, A. A.; SZKLARZ, G. D.; SCOTT, E. E. Human cytochrome P450 1A1 structure and utility in understanding drug and xenobiotic metabolism. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, p. 12932–12943, 2013.

WAN, Q. et al. Novel omega glutathione S-transferases in disk abalone: Characterization and protective roles against environmental stress. **Comparative Biochemistry and Physiology – Part C**, v. 150, n. 4, p. 558–568, 2009.

WANG, A. et al. Structural characterization of the complex between alpha-naphthoflavone and human cytochrome P450 1B1. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, p. 5736–5743, 2011.

WANWIMOLRUK, S., WANWIMOLRUK, P. Characterization of CYP1A enzyme in Adélie penguin liver. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part C**, v. 144, p. 148–154, 2006.

WATERHOUSE, A.M. et al. Jalview Version 2-a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. **Bioinformatics**, v.25, p. 1189-1191, 2009.

WATERS, E. R. Molecular adaptation and the origin of land plants. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 29, n. 3, p. 456–463, 2003.

WERCK-REICHHART, D.; FEYEREISEN, R. Protein family review Cytochromes P450 : a success story. **Genome Biology**, v. 1, n. 6, 2000.

WESSEL, N. et al. Investigating the relationship between embryotoxic and genotoxic effects of benzo[a]pyrene, 17 α -ethinylestradiol and endosulfan on *Crassostrea gigas* embryos. **Aquatic Toxicology**, v. 85, n. 2, p. 133–142, 2007.

WHYTE, J. J. et al. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 30, n. 4, p. 347–570, 2000.

WILLIAMS, J. A. et al. Drug-drug interactions for UDP-glucuronosyltransferase substrates: a pharmacokinetic explanation for typically observed low exposure (auc/uc) ratios. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 32, n. 11, p. 1201–1208, 2004.

WILLS, L.P. et al. Comparative chronic liver toxicity of benzo[a]pyrene in two populations of the atlantic killifish (*Fundulus heteroclitus*) with different exposure histories. **Environmental Health Perspectives**, v. 118, p. 1376-1381, 2010.

XIE, J. et al. Effects of pyrene exposure on immune response and oxidative stress in the pearl oyster, *Pinctada martensii*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 63, p.237-244, 2017.

XIU, M. et al. Gender differences in detoxification metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbon (chrysene) in scallop *Chlamys farreri* during the reproduction period. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part C**, v. 170, p. 50–59, 2015.

XU, J. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the surface sediments from Yellow River, China. **Chemosphere**, v. 67, n. 7, p. 1408–1414, 2007.

YADAV, R. et al. Structural insights into the function of steroidogenic cytochrome P450 17A1. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 441, p. 68–75, 2016.

YEATS, T. H.; ROSE, J. K. C. The formation and function of plant cuticles. **Plant Physiology**, v. 163, p. 5–20, 2013.

YUN, C. H.; SHIMADA, T.; GUENGERICH, F. P. Roles of human liver cytochrome P4502C and 3A enzymes in the 3- hydroxylation of benzo(a)pyrene. **Cancer Research**, v. 52, n. 7, p. 1868–74., 1992.

ZACCHI, F.L. Respostas moleculares e de enzimas de biotransformação em ostras *Crassostrea brasiliiana* (Lamarck, 1819) expostas a Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos e diferentes salinidades. 2017. Tese (Doutorado em Aquicultura) - Curso de Pós-Graduação em Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

ZAMARATSKAIA, G.; ZLABEK, V. EROD and MROD as Markers of Cytochrome P450 1A Activities in Hepatic Microsomes from Entire and Castrated Male Pigs. **Sensors**, v. 9, n. 3, p. 2134–2147, 2009.

ZAMEK-GLISZCZYNSKI, M. J. et al. Integration of hepatic drug transporters and phase II metabolizing enzymes: Mechanisms of hepatic excretion of sulfate, glucuronide, and glutathione metabolites. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 27, n. 5, p. 447–486, 2006.

ZANETTE, J. et al. Comparison of the antioxidant defense system in *Crassostrea rhizophorae* and *Crassostrea gigas* exposed to domestic sewage discharges. **Marine Environmental Research**, v. 66, n. 1, p. 196–198, 2008.

ZANETTE, J. et al. Identification of CYP genes in *Mytilus* (mussel) and *Crassostrea* (oyster) species : First approach to the full complement of

cytochrome P450 genes in bivalves. **Marine Environmental Research**, v. 69, p. S1–S3, 2010.

ZANETTE, J. et al. Identification and expression of multiple CYP1-like and CYP3-like genes in the bivalve mollusk *Mytilus edulis*. **Aquatic Toxicology**, v. 128–129, p. 101–112, 2013.

ZHANG, Y. et al. Biomarker responses in the bivalve (*Chlamys farreri*) to exposure of the environmentally relevant concentrations of lead, mercury, copper. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 30, n. 1, p. 19–25, 2010.

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

ZHANG, J. et al. Estimating population exposure to ambient polycyclic aromatic hydrocarbon in the United States - Part II: Source apportionment and cancer risk assessment. **Environment International**, v. 97, p. 163–170, 2016a.

ZHANG, Y. et al. Biological impact of environmental polycyclic aromatic hydrocarbons (ePAHs) as endocrine disruptors. **Environmental Pollution**, v. 213, p. 809–824, 2016b.

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.

ZOU, Y. et al. Expression profile of eight glutathione S-transferase genes in *Crassostrea ariakensis* after exposure to DSP toxins producing dinoflagellate *Prorocentrum lima*. **Toxicol**, v. 105, p. 45–55, 2015.