

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E  
BIOCIÊNCIAS

---

Rafaela Pino Gomes

TRANSCRIÇÃO DE GENES *CITOCROMO P450* EM OSTRAS  
*Crassostrea gigas*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biociências do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Biociências.

Orientador: Prof. Dr. Afonso Celso Dias Bainy

FLORIANÓPOLIS

2013

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

Pino Gomes, Rafaela  
TRANSCRIÇÃO DE GENES CITOCROMO P450 EM OSTRAS  
*Crassostrea gigas* / Rafaela Pino Gomes ; orientador,  
Afonso Celso Dias Bainy - Florianópolis, SC, 2013.  
109 p.

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

Inclui referências

1. Biotecnologia e Biociências. 2. Genes Citocromo  
P450. 3. Ostra *Crassostrea gigas*. 4. Transcrição  
diferencial de genes CYP. 5. Esgoto Sanitário. I. Dias  
Bainy, Afonso Celso. II. Universidade Federal de Santa  
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e  
Biociências. III. Título.

# “Transcrição de genes citocromo P450 em ostra *crassostrea gigas*.”

por

**Rafaela Pino Gomes**

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (Port. 15/PPGBTC/2013) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências- UFSC, composta pelos Professores Doutores:

Banca Examinadora:

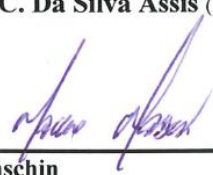
  
\_\_\_\_\_  
**Prof(a) Dr(a) Afonso Celso Dias Bairy (Orientador/BQA/CCB/UFSC)**

  
\_\_\_\_\_  
**Dr(a) Juliano Zanette (ICB/FURG)**

  
\_\_\_\_\_  
**Prof(a) Dr(a) Edmundo Carlos Grisard (MIP/CCB/UFSC)**

  
\_\_\_\_\_  
**Prof(a) Dr(a) Helena C. Da Silva Assis (Depto Farmacologia/UFPR)**

Coordenação:

  
\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Marcelo Maraschin**  
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências.

Florianópolis, 08 de julho de 2013.



## AGRADECIMENTOS

Á Deus, por sempre me ouvir, e de forma inexplicável segurar minha mão e me levar para o melhor caminho, não o mais fácil, mas o que me fez e me faz crescer pessoalmente e profissionalmente.

A toda minha família, que sempre esteve comigo, me apoiou e compreendeu meus momentos de ausência. Amo todos !!

Ao meu orientador Prof. Dr. Afonso Celso Dias Bainy, que me aceitou como orientanda, acreditou no meu potencial, me ajudou e me apoiou no desenvolvimento deste trabalho. Por ter aceitado mais esse desafio, e ter me dado a oportunidade de crescer cada vez mais, me instigando sempre a buscar o conhecimento e a enfrentar os obstáculos que surgiram durante estes dois anos. Deixo aqui meu MUITO OBRIGADA !!!

Para não correr o risco de esquecer alguém, agradeço de forma geral todos os amigos e colegas do LABCAI, que direta ou indiretamente estiveram envolvidos na elaboração e desenvolvimento deste trabalho. Por todo incentivo, ajudas preciosas, conselhos e direcionamentos importantíssimos. Agradeço a cada um pelos momentos vivenciados, e alegrias compartilhadas. Obrigada pessoal!

Agradeço a minha grande amiga Naissa, que foi uma pessoa fundamental para que hoje eu estivesse finalizando mais uma etapa da minha vida. Pelo companheirismo em todos os momentos, pelas risadas, piadas, conselhos, e acima de tudo pela amizade conquistada. Thank you!

Não poderia deixar de agradecer a três pessoas muito importantes: Primeiramente ao meu professor e orientador de graduação Glauber Wagner, que me ensinou o início de tudo, me fez aprender a gostar de pesquisa, me ajudou a crescer e a dar os primeiros passos acadêmicos. Ao Prof. Dr. Edmundo Carlos Grisard que abriu as portas do seu laboratório

para que eu pudesse vivenciar uma rotina de laboratório, por ter me dado uma base de como fazer pesquisa, uma noção de diferentes técnicas, por ter me apoiado e incentivado a sempre buscar mais, a enfrentar meus próprios medos e a pensar de uma forma mais madura. A Prof. Dra. Maria Risoleta Freire Marques que me deu a oportunidade de conhecer e a fazer parte do grupo LABCAI, me ajudou sempre, acreditou no meu trabalho e se tornou uma pessoa fundamental para o meu crescimento acadêmico e profissional. Sou muito grata por tudo que fizeram por mim.

Aos amigos de longa data que mesmo de longe sempre me enviaram palavras positivas e de incentivo. Que compreenderam meus momentos de estresse e irritabilidade. Amigos OBRIGADA!

A Universidade Federal de Santa Catarina, ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências, ao NEPAQ e ao LABCAI pelo apoio e estrutura nestes dois anos de mestrado.

Aos professores e colegas de Pós-Graduação pelos ensinamentos repassados, entusiasmo e alegrias divididas.

Ao CNPq- Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela bolsa concedida durante o período do mestrado e financiamento através do edital Universal (Processo 473898/2010-1) que viabilizou este projeto.

A toda equipe do Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM-CCA-UFSC), pelas ostras disponibilizadas para que esse estudo fosse possível.

A Margarete em nome de todos os integrantes da Escola do Mar, que desde o primeiro momento nos apoiou e nos auxiliou no experimento de campo realizado no Rio Bücheler. Por ter nos recebido de braços abertos todos os dias de coleta, pelas palavras de apoio e dicas importantes.

Ao Sr.Vilmo, pescador local por ter nos ajudado na implantação e coleta das amostras na fazenda de cultivo de moluscos na Praia do Forte durante todo o experimento, mesmo quando o tempo nos desafiava. Por sempre ter nos recebido com simplicidade e alegria.

A Rita de Cassia em nome de todos os integrantes da Fazenda Marinha Sul Floripa (Impório do Mar), que em todos os momentos esteve disponível para realizar o trabalho de campo, com um sorriso no rosto e um convite para saborear ostras, mariscos e iscas de peixe.

Ao Laboratório de Química Orgânica Marinha do IO-USP que realizou as análises de contaminantes orgânicos.

Aos membros da banca examinadora por aceitarem o convite e se disponibilizarem a participar da avaliação deste trabalho.

**A TODOS MUITOS OBRIGADA!**







*Dedico este trabalho a minha Família, como demonstração de amor, dedicação e valorização por tudo o que me proporcionaram.  
Amo muito tudo isso...*





## RESUMO

Diversas áreas costeiras no Estado de Santa Catarina estão associadas a zonas de cultivo de ostras, pesca e lazer, sendo que algumas destas estão contaminadas por esgoto sanitário. Tecnologias vêm sendo desenvolvidas na tentativa de monitorar a contaminação nestes ambientes, dentre as quais, podemos destacar os biomarcadores e a ostra *Crassostrea gigas* como organismo sentinela. Neste estudo encontramos diferença significativa na transcrição de genes de citocromo P450 (*CYP356A2*, *CYP2AU2*, *CYP30C1*, *CYP3071A1* e *CYP26F1*) em amostras de glândula digestiva de ostras expostas por diferentes períodos a um local contaminado por esgoto sanitário. Também avaliamos os níveis de transcrição dos genes *CYP356A2*, *CYP2AU2* e *CYP30C1*, em diferentes tecidos de ostras *C.gigas*, após um dia de exposição, sendo que os três genes responderam a presença de contaminantes. Essas informações permitem um avanço na caracterização da indução destes genes por contaminantes, bem como, através da execução deste projeto aprofundamos nossos conhecimentos relacionados aos níveis de transcrição de isoformas de genes de CYPs, uma vez que os genes *CYP307A1*, *CYP3071A1* e *CYP26F1* foram analisados pela primeira vez em diferentes tecidos de ostras *C. gigas* presentes em local contaminado por esgoto sanitário.

**Palavras-chave:** Citocromo P450, Marcadores Moleculares, *Crassostrea gigas*.

## ABSTRACT

Several coastal areas in the State of Santa Catarina are associated with oyster farming, fishing and leisure and some of these are contaminated by sanitary sewage. Technologies have been developed in an attempt to monitor contamination in these environments, among which we can highlight the biomarkers and the oyster *Crassostrea gigas* as sentinel organism. In this study we found significant differences in the transcription of cytochrome P450 genes (*CYP356A2*, *CYP2AU2*, *CYP30C1*, *CYP3071A1* and *CYP26F1*) in samples of digestive gland of oysters exposed for different periods of exposure to a sanitary sewage contaminated site. We also assessed the levels of transcription of genes *CYP356A2*, *CYP2AU2* and *CYP30C1* in different tissues of oyster exposed for one day at the contaminated site, and the three genes were responsive to the contaminants. This information allows an advance in characterization of these genes by inducing contaminants, and by performing this design deepened our knowledge related to levels of transcript isoform of CYP genes, once the genes *CYP307A1*, *CYP3071A1* and *CYP26F1* were analyzed for the first time in different tissues of oyster *C. gigas* present in sewage-contaminated site.

**Keywords:** Cytochrome P450, Molecular markers, *Crassostrea gigas*

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

- Figura 1:** Exemplos representativos do envolvimento do Citocromo P450 nos diferentes processos biológicos (STEGEMAN; LIVINGSTONE, 1998).....37
- Figura 2:** Estrutura utilizada para o transplante das ostras. (A) Colocação das balsas com barcos disponibilizados pelos pescadores locais. (B) Balsa identificada como: *Experimento ambiental e animais impróprios para consumo humano*.....42
- Figura 3:** Identificação dos locais de estudo nas baías da Ilha de Santa Catarina. Praia do Forte (Local.1) e Ribeirão da Ilha (Local.2), consideradas como áreas de referência para este estudo. Rio Bücheler (Contaminado) considerado um local contaminado por esgoto sanitário. (Fonte: *Google Maps e Google Earth*).....42
- Figura 4:** Fotografia indicando os tecidos coletados em ostras *Crassostrea gigas*.....44
- Figura 5:** Esquema representativo da composição dos *pools* das amostras utilizadas para a extração de RNA total e síntese de cDNA. **Grupo I:** Amostras de diferentes tecidos de ostra *Crassostrea gigas* após zero e 1 dia de exposição; **Grupo II:** Amostras de glândula digestiva de ostras *Crassostrea gigas* expostas por 14 dias a um local contaminado.....45
- Figura 6:** Índice de Condição (IC), em ostras *C.gigas*, expostas por 1, 2, 7 e 14 dias em diferentes locais.....59
- Figura 7:** Análise Filogenética por Máxima Parcimônia de genes CYP inferida a partir de 1000 replicatas (FELSENSTEIN, 1985). A porcentagem das replicatas das árvores nas quais os agrupamentos foram realizados está indicada nos pontos de ramificações. A árvore foi obtida usando o algoritmo *Subtree-Pruning-Regrafting (SPR)* (NEI; KUMAR, 2000).....61

**Figura 8:** Níveis de transcritos relativos de genes *CYP* em amostras de glândula digestiva de ostras expostas por diferentes tempos de exposição. (**Local 1** ■) Cultivo de moluscos na Praia do Forte; (**Local 2** ■) Cultivo de moluscos no Ribeirão da Ilha; (**Contaminado** ■) Rio Bücheler. Valores significativos quando  $p < 0,05$ . (—): **Induzido**; (---): **Reprimido**.....64

**Figura 9:** Transcrição relativa de *CYP356A2*, *CYP2AU2* e *CYP30C1*, em diferentes tecidos de ostra *Crassostrea gigas*, após um dia de exposição ao (**Local 1** ■) Cultivo de moluscos na Praia do Forte; (**Local 2** ■) Cultivo de moluscos no Ribeirão da Ilha; (**Contaminado** ■) Rio Bücheler. Valores significativos quando  $p < 0,05$ . (—): **Induzido**; (---): **Reprimido**.....67

**Figura 10:** Sequência de nucleotídeos dos amplicon dos genes *CYP* sequenciados. *CYP356A2*: 140pb; *CYP2AU2*: 130pb; *CYP30C1*: 102pb; *CYP3072A1*: 196pb; *CYP3071A1* 139pb; *CYP26F1*: 127pb.....67

**Figura 11:** Níveis de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) em  $\text{ng g}^{-1}$ , peso seco de amostras de sedimento coletado nos locais de estudo. **Bucheler:** Rio Bücheler (Local contaminado), **Forte:** Praia do Forte (Local 1); **Ribeirão:** Ribeirão da Ilha (Local 2).....70

**Figura 12:** Níveis de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) em  $\text{ng g}^{-1}$ , peso seco de amostras de ostras *Crassostrea gigas*, coletadas nos locais de estudo. **Bucheler:** Rio Bücheler (Local contaminado), **Forte:** Praia do Forte (Local 1); **Ribeirão:** Ribeirão da Ilha (Local 2).....70

**Figura 13:** Níveis de Alquilbenzeno Lineares (LABs) em amostras de sedimento. **Bucheler:** Rio Bücheler (Local contaminado), **Forte:** Praia do Forte (Local 1); **Ribeirão:** Ribeirão da Ilha (Local 2).....72

**Figura 14:** Níveis de Alquilbenzeno Lineares (LABs) em amostras de ostra *Crassostrea gigas*. **Bucheler:** Rio Bücheler (Local contaminado), **Forte:** Praia do Forte (Local 1); **Ribeirão:** Ribeirão da Ilha (Local 2)....72

## **Tabelas:**

**Tabela 1:** Sequências de genes *CYP* identificadas e anotadas conforme proposto por David Nelson (*CYP-Nomenclature*) comunicação pessoal..48

**Tabela 2:** Iniciadores desenhados para genes de *CYP* de ostras *Crassostrea gigas*. (EF) *Elongation factor*.....49

**Tabela 3:** Condições da reação de PCR.....55

**Tabela 4:** Dados físicos e ambientais coletados, nos locais de estudo. (A) **Local Contaminado:** Rio Bücheler; (B) **Referência 1:** Praia do Forte; (C) **Referência 2:** Ribeirão da Ilha. Os números **1, 2, 7 e 14** referem-se ao período em que as ostras ficaram expostas.....51

**Tabela 5:** Análise dos amplicons sequenciados dos genes *CYP* de ostras *C. gigas*.....69





## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% - Porcentagem.

µg - Micrograma.

µl - Microlitro.

µm - Micrometro.

Ache - Acetilcolinesterase.

AHs - Ácidos Húmicos.

AlCl<sub>3</sub> - Cloreto de Alumínio.

AR - Ácido Retinóico.

cDNA - Sequência nucleotídica complementar de DNA.

cm: centímetro.

CNPq - Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

Ct - Acrônimo do inglês *Threshold cycle*.

CYP - Citocromo P450.

DNA - Ácido Desoxirribonucleico.

DNTP - Desoxirribonucleotídeos Fosfatados.

ESTs - Acrônimo do inglês *expressed sequence tag*.

EUA - Estados Unidos da América.

FURG - Fundação Universidade de Rio Grande.

G - Gramas.

G6PDH - Glicose-6-fosfato desidrogenase.

GC-FID - Acrônimo do inglês *Gas Chromatograph(y) Flame Ionization Detector* (Cromatografia Gasosa acoplada a Detector de Ionização de chama).

GC-MS - Acrônimo do inglês *Gas chromatography–mass spectrometry* (Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa).

*GeneBank* - Banco de genes público que possui os dados produzidos pelo NCBI.

GERCO - Gerenciamento Costeiro.

GSH – Glutathiona reduzida.

GST - Glutathiona S- Transferase.

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> - Ácido Sulfúrico.

HF - Háfnio.

HPA - Hidrocarboneto Policíclico Aromático.

HPLC - Acrônimo do inglês *High-performance liquid chromatography* (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência).

IO-USP - Laboratório de Química Orgânica Marinha – Universidade de São Paulo.

IPCS - Acrônimo do inglês *International Programme on Chemical Safety* (programa internacional de segurança química).

IPTG - Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosideo.

K - Constante de Biodegradação.

*Knockout* - Organismo Geneticamente Modificado.

*Kow* - Acrônimo do inglês *Octanol-Water Partition Coefficient* (coeficiente de partição octanol-água).

L - Litro.

LAB - Acrônimo do inglês Linear Alkylbenzene (Alquilbenzeno Linear).

LAS - Acrônimo do inglês Linear Alkylbenzene *Sulfonate* (Alquilbenzeno Linear Sulfonado).

LB - Luria-Bertani (Meio de Cultura).

MgCl<sub>2</sub> - Magnésio.

Min - Minutos.

Mm - Milímetros.

N - Número.

Nm - Nanômetro.

°C - Graus Célsius.

pb - Pares da Bases.

PCA - Acrônimo do inglês Principal component analysis (análise de componente principal).

PCB - Acrônimo do inglês *Polychlorinated Biphenyls* (Bifenilos Policlorados).

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase.

pH - Potencial Hidrogeniônico.

PLANSAB - Plano Nacional de Saneamento Básico.

POPs - Poluentes Orgânicos Persistentes.

PXR - Acrônimo do inglês *Pregnane X Receptor* (Receptor X de Pregnano).

qPCR - Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real Quantitativo.

R<sup>2</sup> - Linearidade.

RARs - Acrônimo do inglês *Retinoic Acid Receptor* (Receptor Nuclear Controlado por Ácido Retinóico).

REST - Acrônimo do inglês *Relative expression software tool* (Ferramenta de Software para expressão relativa).

RNA - Ácido Ribonucleico.

RNAm - Ácido Ribonucleico mensageiro.

RPM - Rotação por minuto.

RT-PCR - Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real Quantitativo.

RXR - Acrônimo do inglês *Retinoid X receptor* (Receptor X de Retinóide).

Seg - Segundos.

SIM - Acrônimo do inglês Selected ion monitoring (Monitoramento Seletivo de Íons).

SO<sub>3</sub> - Óxido Sulfúrico.

SOD - Superóxido Dismutase.

t/ano - Toneladas por ano.

TBT - Tributilestanho.

TCDD - 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina.

TPT - Trifenilestanho.

v/v - Volume por volume.

## Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	21
1.1 POLUIÇÃO MARINHA E O ESGOTO SANITÁRIO .....	21
1.2 CONTAMINANTES ORGÂNICOS NO AMBIENTE .....	23
1.3 OSTRA <i>CRASSOSTREA GIGAS</i> .....	28
1.4 IMPORTÂNCIA DOS DIFERENTES TECIDOS PARA A OSTRA .....	29
1.5 BIOMARCADORES .....	32
1.6 BIOTRANSFORMAÇÃO E CITOCROMO P450.....	35
2. OBJETIVOS.....	40
2.1 OBJETIVO GERAL.....	40
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	40
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	41
3.2 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS.....	43
3.3 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL E SÍNTESE DE CDNA ....	44
3.4 IDENTIFICAÇÃO DE SEQUÊNCIAS DE CYP E DESENHO DOS INICIADORES PARA PCR EM TEMPO REAL (QPCR) .....	46
3.5 ANÁLISE FILOGENÉTICA DOS GENES <i>CYP</i> .....	47
3.6 PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL (qPCR) .....	47
3.7 SEQUENCIAMENTO DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS NA PCR .....	50
3.7.1 <i>Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)</i> .....	50
3.7.2 <i>Purificação, Clonagem e Sequenciamento dos fragmentos dos produtos de PCR para confirmação do gene</i> .....	51
3.8 ANOTAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS.....	52
3.9 ANÁLISE DE COMPONENTES ORGÂNICOS.....	53
3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	55
4. RESULTADOS .....	57
4.1 DADOS FISIOLÓGICOS E METEOROLÓGICOS DOS LOCAIS DE ESTUDO .....	57
4.2 DADOS BIOMÉTRICOS DOS ANIMAIS .....	57

4.3 ANÁLISE FILOGENÉTICA DOS GENES CYP .....	60
4.4 PADRONIZAÇÃO E EFICIÊNCIA DAS REAÇÕES DE PCR .....	61
4.5 NÍVEIS DE TRANSCRITOS DE ISOFORMAS DE CYP EM GLÂNDULA DIGESTIVA DE OSTRAS <i>CRASSOSTREA GIGAS</i> EXPOSTAS POR DIFERENTES TEMPOS NOS LOCAIS DE ESTUDO.....	62
4.6 TRANSCRIÇÃO RELATIVA DO CITOCROMO P450 EM DIFERENTES TECIDOS DE OSTRAS <i>CRASSOSTREA GIGAS</i> .....	66
4.7 SEQUENCIAMENTO .....	68
4.8 ANÁLISE DE COMPONENTES ORGÂNICOS EM SEDIMENTO E OSTRAS <i>CRASSOSTREA GIGAS</i> .....	69
4.8.1 Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos e Alifáticos (HPAs).....	69
4.8.2 Alquilbenzenos Lineares(LABs).....	71
4.8.3 Bifenilos Policlorados (PCBs).....	73
5. DISCUSSÃO .....	74
5.1 RESPOSTAS TRANSCRICIONAIS DE CYP DAS OSTRAS EXPOSTAS .....	74
5.2 NÍVEIS DE CONTAMINANTES DETECTADOS NOS LOCAIS DE ESTUDO E NOS ANIMAIS EXPOSTOS .....	85
6. CONCLUSÃO.....	88
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	89

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1 Poluição marinha e o esgoto sanitário**

O Brasil apresenta cerca de 8 mil km de litoral, com uma diversidade biológica que proporciona um grande número de oportunidades econômicas, sociais e de integração, tanto ao longo da costa como em alto mar, o que, em contrapartida, acarreta uma quantidade elevada de problemas ambientais (COMISSÃO NACIONAL INDEPENDENTE SOBRE OS OCEANOS, 1998).

A nível mundial o ambiente marinho sofre modificações devido a processos de degradação, seja ele por motivos naturais, ou pela crescente pressão sobre os recursos marinhos e continentais, através da introdução de nutrientes, alteração ou destruição de habitats, alterações na sedimentação, exploração de recursos pesqueiros, poluição industrial, o crescimento demográfico acelerado associado à falta de planejamento urbano, acarretando por fim em uma deficiência na capacidade desses ambientes suportarem esses impactos (CAJARAVILLE et al., 2000; VASCONCELOS et al., 2010).

Uma das principais causas de modificações ambientais no Brasil é o grande crescimento populacional na região costeira, que exige um aumento na demanda por insumos para suprir as necessidades da população. A junção de todos esses fatores afeta diretamente o ambiente da zona costeira brasileira, que já apresenta um estado de desequilíbrio

difícil de ser revertido na sua totalidade (GEO BRASIL, 2002; AMORIM, 2003).

Como a tendência é de que a população costeira só aumente (PROGRAMA DE LAS NACIONES UNIDAS PARA EL MEDIO AMBIENTE, 2012), é inevitável a associação com mais problemas relacionados à construção de casas e a falta de saneamento básico. A Associação Brasileira de Entidades do Meio Ambiente (Abema), ([www.abema.org.br](http://www.abema.org.br)) e o relatório apresentado na GEO Brasil (2002) apontam que 80% do esgoto gerado no país não recebe tratamento e é descartado diretamente no ambiente aquático.

O esgoto, tanto industrial como sanitário, apresenta uma grave ameaça ao ambiente marinho, e segundo o Gerenciamento Costeiro-MMA (GERCO), nosso litoral recebe mais de 3000 toneladas de poluentes líquidos por dia, sendo que os principais poluentes encontram-se predominantemente nos ambientes costeiros, como os estuários, lagoas e baías (GEO Brasil 2002).

Segundo o relatório publicado por Pateu e Davis (2010) e na GEO Brasil (2012) inúmeros tratados e acordos internacionais foram assinados desde 1972, sobre os desafios ambientais, porém, os que dizem respeito ao saneamento, ao ambiente marinho, e aos produtos químicos, muito pouco foram alcançados até a atualidade.

Apenas 6% de novas instalações sanitárias foram desenvolvidas entre 1990 e 2008, resultando em mais de 2.500 milhões de pessoas sem acesso a saneamento básico. Acredita-se que a meta de 75% da população mundial com este tipo de serviço não será alcançada até o ano de 2049 (ONU, 2011).



No Brasil a meta estipulada pelo Governo Federal, através do plano PLANSAB (Plano Nacional de Saneamento Básico), para que todos tenham acesso ao saneamento básico é para o ano de 2030, porém é uma aposta alta se levarmos em consideração o ritmo em que essas ações estão sendo realizadas (<http://www.tratabrasil.org.br/ranking-do-saneamento>).

Florianópolis (SC) encontra-se em 42º lugar no Ranking do saneamento publicado pela SNIS (2010), que avaliou as 100 maiores cidades do Brasil.

Segundo a CASAN, o esgoto tratado em suas instalações no município de Florianópolis é descartado em rios e no mar com 98% de pureza, porém apenas 51,6% da população de Florianópolis tem atendimento urbano de esgoto.

Como a tendência é que a população na região costeira só aumente, e devido à importância biológica dos recursos hídricos, é necessário o monitoramento do ambiente marinho e avaliação dos efeitos tóxicos causados pela presença dos contaminantes. Sendo assim, o presente estudo busca aprofundar os estudos de transcrição de isoformas de genes *CYP* em ostra *Crassostrea gigas*, contribuindo assim para a identificação e validação de indicadores que possam ser utilizados no biomonitoramento de ambientes costeiros, a fim de avaliar e prevenir o impacto da contaminação no ambiente aquático.

## **1.2 Contaminantes orgânicos no ambiente**

Está cada vez mais comum assistirmos em noticiários relatos de despejo de esgoto sanitário em ambiente aberto por falta de saneamento

básico e sem nenhum tratamento, empresas despejando seus resíduos clandestinamente ou por acidente em rios e mares, como por exemplo, o vazamento de 12 mil litros de óleo no Sul da Ilha de Florianópolis, SC em dezembro de 2012, prejudicando o cultivo de moluscos da região, não deixando de afetar diretamente a economia local.

Neste sentido, cada vez mais se valoriza e se reconhece a importância da realização de trabalhos relacionados ao ambiente aquático.

Dentre os principais poluentes encontrados no ambiente, destacam-se os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos e Alifáticos (HPA). Estes, são poluentes orgânicos de grande persistência no ambiente, podendo ser classificados como *petrogênicos* (presentes no petróleo e seus derivados), *pirogênicos* (formados durante os processos de combustão) e *biológicos* (sintetizados por organismos vivos) (MARTINS, 2005).

Em temperatura ambiente todos os HPAs apresentam característica sólida, alta temperatura de fusão e ebulição, baixa pressão de vapor e baixa solubilidade em água. Alguns são semivoláteis, podendo ser transportados por longas distâncias e adsorvidos em material particulado (GODOI et al., 2004; LIN et al., 2005). Predominantemente, HPAs com cinco ou mais anéis aromáticos são encontrados em material particulado e tendem a se acumular no tecido lipídico (CONDE et al., 2004; LIN et al., 2005).

A presença de hidrocarbonetos na coluna d'água depende de diversos fatores, como a solubilidade dos compostos, as características físico-químicas da água (Temperatura, pressão, salinidade e pH) a concentração e composição da matéria orgânica dissolvida e dos sólidos em suspensão, a taxa de sedimentação, o teor de matéria orgânica e os processos biológicos (WHITEHOUSE, 1984; NISHIGIMA, 2004).

Apesar de pouca solubilidade em água, esses contaminantes, podem ser transportados no meio aquático, adsorvidos em partículas em suspensão, e posteriormente depositados no sedimento (GODOI et al., 2004).

HPAs, bem como, uma variedade de compostos químicos, apresentam propriedades que os classificam como substâncias tóxicas (GRIMMER et al., 1983). Nos organismos marinhos sua toxicidade depende dos efeitos biológicos dos hidrocarbonetos, como a persistência e biodisponibilidade, habilidade de acumulação ou metabolização e capacidade dos contaminantes interferirem no metabolismo normal destes organismos (BICEGO, 1996).

Outra propriedade importante é o coeficiente de partição octanol-água (*k<sub>ow</sub>*) que pode ser usado para inferir a tendência do composto em se adsorver as substâncias húmicas de cada local, e quanto maior o seu valor, mais hidrofóbica é a substância (LOCATELLI, 2006).

A análise de HPAs em organismos vivos teve início em 1952, quando Zechmeister e Koe (1952) analisaram esses compostos em cracas. Ostras e mexilhões, por não apresentarem capacidade de biotransformar esses compostos, acabam acumulando em seu organismo, e assim passaram a ser utilizados também como organismos biomonitores de ambientes contaminados (PERFETTI et al., 1992).

Os LABs apresentam massa molecular variando entre 218 a 274g/mol<sup>-1</sup>, são líquidos sem coloração (TAKADA; EGANHOUSE, 1998). São obtidos pela reação de alquilação de Friedel-Crafts a partir do benzeno com olefinas lineares ou haletos de alquilas, utilizando catalisadores tais como HF, AlCl<sub>3</sub>, e óxidos metálicos (ZENG et al., 1997).

LABs são utilizados como matéria-prima para a produção de surfactantes como os tensoativos LAS (Alquilbenzeno Linear Sulfonado) pela reação de sulfonação, usando agentes sulfonantes, tais como  $H_2SO_4$  e  $SO_3$  gasoso (TAKADA et al., 2004). Devido à sulfonação incompleta, o LAS contém entre 1 a 3% de LAB, podendo entrar no ambiente aquático através da descarga de esgoto sanitário, sendo os detergentes sintéticos a principal fonte antropogênica (TAKADA; EGANHOUSE, 1998; PENTEADO, 2006).

Entre os fatores que afetam a biodegradação dos LABs está a sua estrutura. O tamanho da cadeia linear e a posição do grupo fenila na cadeia alquílica interfere na constante de biodegradação (k). Os isômeros internos possuem constante de biodegradação inferior aos isômeros externos. Entretanto, os demais componentes das formulações comerciais, como as enzimas (amilase, lipase, protease), os polímeros naturais modificados e sintéticos (carboximetil celulose e poli-acrilatos, respectivamente) e branqueadores ópticos, interferem na eficiência da remoção destes compostos no ambiente (STOLL; GIGER, 1997).

O acúmulo de LABs nos recursos hídricos aumenta sua taxa de toxicidade, acarretando na diminuição do oxigênio dissolvido, a diminuição da permeabilidade da luz, por manter as partículas presentes em suspensão, pode facilitar o aumento da concentração de outros xenobióticos, como PCBs e HPAs presentes no sedimento, dificultando sua degradação (HAIGH, 1996; WARNER; SCHIFKO, 1999).

No Brasil a produção de detergentes sintéticos tem crescido expressivamente, chegando a lançar no mercado cerca de 220 mil t/ano de LAB e 80 mil t/ano de LAS, sendo a Deten Química S.A, a maior fabricante de LAB no país. Essa produção representa cerca de 10% da

produção mundial e coloca o Brasil entre os principais produtores mundiais (PENTEADO et al., 2006).

Mas ser o principal produtor gera também um consumo excessivo destes produtos pela população, enfatizando ainda mais a importância de gerar novas formulações de detergentes que proporcionem menor impacto no meio ambiente, uma vez que estes estão cada vez mais presentes como componentes do esgoto sanitário (ISHIWATARI et al., 1983) , além de aprimorar as estações de tratamento de efluentes industriais e esgoto sanitário permitindo uma maior capacidade e melhor qualidade de tratamento (PENTEADO et al., 2006).

Em relação aos Bifenilos policlorados (PCBs) estes são um dos maiores grupos de poluentes orgânicos persistentes (POPs). Eles compreendem um total de 130 cloro-substituíveis no ambiente aquático (SAFE, 1990). São considerados resistentes a degradação biológica ou química e são persistentes no ambiente (IPCS, 1993).

Os PCBs são produzidos e utilizados como lubrificantes em transformadores e condensadores, estabilizadores em tintas, polímeros e como adesivos. Sua liberação no ambiente, pode ser por eliminação imprópria ou ilegal de resíduos industriais, vazamento de transformadores elétricos e de incineração de alguns resíduos químicos entre outros (KIMBROUGH; JENSEN, 1989). Estes compostos estão ligados a efeitos imunotóxicos, e carcinogênicos (FERNANDEZ et al., 2004). Mesmo tendo ocorrido uma diminuição nos níveis de PCBs no ambiente nas últimas décadas, ainda existe a preocupação com o impacto desse poluente em relação a função endócrina normal e reprodução em peixes e animais selvagens (OKUMURA et al, 2004; SAPOZHNIKOVA et al., 2004).

### 1.3 Ostra *Crassostrea gigas*

Ostras *Crassostrea gigas* apresentam características que as tornam animais interessantes, como sua preferência por zonas entre marés, apresentam vida sésstil, possui um tempo de vida longo, o que possibilita estudos de monitoramento a longo prazo, são animais de fácil coleta e se alimentam de plâncton por filtração e ingestão de pequenas partículas orgânicas permitindo a incorporação de contaminantes (CUNNINGHAM, 1979; LAPÈGUE; BOUDRY; GOULLETQUER, 2000; DONAGHY et al., 2012).

Este molusco é naturalmente distribuído pelo Noroeste do Pacífico, mas foi introduzido a nível mundial para produção comercial, e se tornou uma das espécies mais importantes e cultivada no mundo (MAO et al., 2006; GUO et al., 2012). Além disso, tem sido comumente utilizada em estudos como bioindicador de contaminantes antropogênicos, qualidade higiênico-sanitária, indicadores de presença microbiana, em estudos taxonômicos, ecológicos, evolutivos, paleontológicos, desenvolvimento biológico, imunológicos, bio-mineralização entre outros (GUNTHER et al., 1999; MOUNT et al., 2004; PEREIRA et al., 2006; HAUTMANN, 2006; MEDEIROS et al., 2008; RAMOS et al., 2010; DHEILLY et al., 2011; BUSTAMANTE et al., 2012). Recentemente teve seu genoma sequenciado, o que está auxiliando o desenvolvimento de novas pesquisas e enfatizando ainda mais o uso deste molusco como uma espécie bioindicadora em biomonitoramentos (SAAVEDRA; BACHÈRE, 2006; ZHAN et al., 2012).

No cenário nacional, o cultivo desta espécie é responsável pela maior produção de ostras cultivadas no país (90%), representada por uma

crescente produção no Estado de Santa Catarina (OLIVEIRA NETO, 2005), o que aponta para o potencial desta espécie não só para o monitoramento em locais possivelmente poluídos, como também em regiões de cultivo.

A produção total de moluscos comercializados em 2011 por Santa Catarina (mexilhões, ostras e vieiras), foi de 18.253,8 toneladas, representando um aumento de 16,75% em relação a 2010. A produção de ostras *C. gigas* especificamente apresentou um cultivo de 2.285 toneladas em 2011, representando 19,75% em relação a 2010, que foi de 1.908 toneladas (EPAGRI, 2012).

Tais características da ostra *C. gigas* apontam o uso deste molusco em programas de monitoramento, mesmo que muito ainda precise ser elucidado a respeito dos mecanismos bioquímicos e moleculares de respostas a contaminantes nestes invertebrados.

#### **1.4 Importância dos diferentes tecidos para a Ostra**

As ostras *C. gigas* apresentam uma estrutura física composta em sua maioria por um corpo macio, protegido por uma concha calcária (WHEATON, 2007).

Uma característica estrutural das ostras é o grande desenvolvimento das brânquias, que são responsáveis pela respiração e filtração do alimento. As partículas de detritos e os micro-organismos presentes na água do mar são capturados por filamentos branquiais e conduzidos, através de batimentos ciliares, até o palpo labial, aonde separa partículas de alimento das partículas minerais e transporta o

alimento para a boca (BARNABÉ, 1996). Em seguida o alimento é ingerido no estômago e absorvido pelo intestino. O material não aproveitado, conhecido por pseudofeces, é eliminado através da abertura inalante, quando as valvas se fecham e a água é forçada a sair levando esses detritos acumulados com ela (RUPER; FOX; BARNES, 2005).

Através de todo esse processo, elas obtêm seu alimento da coluna de água pela filtração, que chega a ser 5L/hora (ANANDRAJ et al., 2002), porém junto com o alimento podem estar presentes pequenas partículas materiais, como os contaminantes bióticos e abióticos (BEIRÃO, 2000). Os alimentos quando ingeridos pelas ostras, são enzimaticamente atacados quando chegam da glândula digestiva. Entretanto, é possível observar células vivas presentes no estômago em um intervalo de 6 a 16 horas (BARNABÉ, 1996). A microflora dos moluscos bivalves é bastante variada, podendo incluir: vírus (COELHO et al., 2003), rotavírus (KITIGUL et al., 2007), víbrios, (LEE et al., 2008) e bactérias (VIEIRA, 2004).

Os bivalves filtradores podem acumular contaminantes nos seus tecidos em concentrações de 1.000 a 10.000 vezes superior às verificadas na fonte de exposição (UNEP, 2004), bem como, cada tecido pode bioacumular concentrações diferentes de contaminantes (DHEILLY et al., 2011).

As brânquias estão em contato direto com os contaminantes presentes no meio aquático, sendo a principal forma de incorporação destes elementos dissolvidos na água (VIARENGO, 1989). Este processo de incorporação é facilitado pelo muco presente na superfície do tecido, que concentra uma variedade de contaminantes facilitando a incorporação por gradiente de difusão. Ao incorporar os poluentes, estes são ligados a



proteínas e liberados para a hemolinfa e os hemócitos circulantes (MARIGOMEZ et al., 2002). Estas características fazem deste tecido um alvo para se avaliar, por exemplo, a bioconcentração relacionada à exposição recente (aguda) a poluentes (CHOI et al., 2007).

A glândula digestiva também pode ser utilizada para estimar o impacto ambiental. Enquanto as brânquias refletem exposições recentes (agudas), a glândula digestiva integra um tempo maior de exposição (crônica) (HAMZA-CHAFFAI et al., 2000). Este órgão está diretamente relacionado à eliminação de xenobióticos e funções endógenas de regulação do metabolismo (MARIGOMEZ; LEKUBE; CANCIO, 1999).

Também faz parte da estrutura corporal da ostra, o manto, uma camada de tecido que cobre a massa visceral, ou seja, as partes moles de ambos os lados do corpo, menos na região do músculo adutor. A superfície interior do manto é composta por colágeno, células ciliadas, e células secretoras de muco (mucócitos), que são dedicadas ao acúmulo e transporte dos rejeitos da cavidade do manto (COAN et al., 2000). Sua localização é abaixo da concha e contém células responsáveis pela deposição de carbonato de cálcio e formação da concha, bem como células com função sensorial (RUPPERT; FOX; BARNES, 2005). O muco secretado pela ostra participa na captação de alimento, sendo também uma via de incorporação de contaminantes neste tecido (MARIGOMEZ et al., 2002).

Outro tecido importante é o músculo, responsável pela união das valvas, e pelo fechamento da concha quando está contraído. Alguns estudos indicam este tecido como indicador de metais no ambiente (CUNNINGHAM, 1979), porém em menores proporções (BUSTAMANTE; MIRAMAND, 2005; NORUM; LAI; CULLEN,

2005). Este tecido ganha mais relevância em estudos toxicológicos, uma vez que o músculo é a parte comestível de moluscos bivalves como o *Nodipecten nodosus*, podendo ser um vetor de transferência de contaminantes para os humanos.

Em relação a doenças e defesas imunológicas em ostras, o palpo labial é considerado uma porta de entrada para alguns patógenos, como o protozoário *Marteilioides chungmuensis* (TUN et al., 2008) e patógenos virais como o norovírus e o poliovírus (MCLEOD et al., 2009). O palpo labial também apresenta uma grande quantidade de glicosamino-glicanas, sulfato de heparina, histamina e células similares a mastócitos, o que sugere uma importância deste órgão na defesa frente a infecções (ULRICH; BOON, 2001; SANTOS et al., 2002).

## **1.5 Biomarcadores**

O monitoramento da qualidade do ambiente, de um modo geral, tem como um de seus objetivos a prevenção dos danos causados por contaminantes oriundos de diferentes fontes presentes no ambiente, fazendo com que os níveis desta exposição sejam mantidos em valores que não apresentem um risco (CAJARAVILLE et al., 2000; <http://www.who.int/en>).

No ambiente aquático, para ser possível o monitoramento, torna-se necessária a identificação e quantificação destas ações, através do uso de diferentes tecnologias, no sentido de avaliar a presença de contaminantes no ambiente aquático, como por exemplo, o uso de biomarcadores que nos permite avaliar alterações moleculares, celulares e/ou fisiológicas que

expressam os efeitos tóxicos causados pelos diferentes tipos de contaminantes (WALKER et al., 2001; OLIVEIRA RIBEIRO et al., 2005; SOUZA et al., 2012)

Uma das principais vantagens dos biomarcadores moleculares e bioquímicos é o seu potencial de antecipar mudanças no ambiente, compreendendo toda substância, ou o produto da biotransformação, que geram alterações bioquímicas e/ou moleculares, que expressam a exposição e os efeitos tóxicos de poluentes, permitindo o estabelecimento de estratégias de remediação antes que danos irreversíveis aconteçam (CAJARAVILLE et al., 2000; WHO, 1996; ADAMS, 2002; WALKER et al., 1996).

Com a aplicação de técnicas moleculares, por exemplo, muitas bibliotecas de sequências expressas (ESTs - acrônimo do inglês *expressed sequence tag*) em certas espécies de moluscos bivalves têm sido identificadas, bem como, tem fornecido muitas informações extremamente úteis para a elucidação de mecanismos bioquímicos e moleculares (ZANETTE et al., 2010, LUCHMANN et al., 2012; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), assim como o sequenciamento genômico de uma variedade de moluscos como a ostra *Crassostrea gigas*, que permite elucidar algumas dúvidas relacionadas ao seu genoma e que podem vir a contribuir para o desenvolvimento de novas técnicas de biomonitoramento (ZHANG et al., 2012).

As medições de uma variedade de enzimas e proteínas envolvidas nos processos de biotransformação de xenobióticos, tanto de fase I como fase II também permitem avaliar o grau de contaminação e condições de estresse que um determinado ambiente pode ser e estar (MATTOS et al., 2009; LUCHMANN et al., 2011; TREVISAN et al., 2012).

Um estudo realizado em quatro locais de Florianópolis (SC) revelou que a enzima catalase diminui sua atividade após 14 dias de exposição a um local contaminado por esgoto sanitário, bem como, mostrou que as enzimas SOD e GST aumentaram sua atividade no local contaminado. Já a atividade de G6PDH apresentou alteração em todos os locais analisados, quando comparado com o início da exposição. Esses resultados evidenciam o estresse em que os animais estavam expostos sugerindo estas enzimas como biomarcadoras (SOUZA et al., 2012).

Pode-se utilizar também membros da família citocromo P450 importantes no metabolismo de uma grande variedade de xenobióticos, tais como, drogas, substâncias cancerígenas, aditivos alimentares, poluentes, pesticidas ou produtos químicos ambientais (WAXMAN; AZAROFF, 1992; SARKAR et al., 2006). Uma característica importante no metabolismo de citocromo P450 é sua expressão basal na ausência de substratos e uma rápida indução na presença de compostos indutores na qual é reversível após a remoção destes compostos, possibilitando avaliar quão responsivo é cada citocromo frente a diferentes contaminantes (HANDSCHIN; MEYER, 2003).

Outros biomarcadores de resposta a contaminantes são os biomarcadores genéticos, que identificam polimorfismos no organismo. Em ostras *C. gigas*, foi demonstrado que o gene da glutationa sintetase e da metalotioneína, que respondem a presença de metais no ambiente (AMIARD et al., 2006; THEODORAKIS, 2002), apresentam diferenças no genótipo e fenótipo quando animais são expostos a um local contaminado por metais (DAVID et al., 2012).

Relatamos aqui uma variedade de biomarcadores, mas ainda podemos citar os biomarcadores a nível celular, que representa um dos

primeiros sinais de estresse ambiental, juntamente com os relacionados aos efeitos moleculares (VAN DER et al., 2003; MONSERRAT et al., 2007). Edges e colaboradores (2012) observaram em ostras *Saccostrea glomerata*, desestabilização na membrana lisossomal, que é um indicador de saúde animal quando está íntegra, peroxidação lipídica, que indica lesão celular, e também observaram alterações na concentração de glutathiona (GSH), relacionada à capacidade antioxidante da célula, enfatizando a incorporação desses biomarcadores, em monitoramentos ambientais.

Danos no DNA, inibição da acetilcolinesterase (AChE) assim como a medição de metalotioneína, também respondem a uma variedade de contaminantes e que podem vir a ser bons biomarcadores (SARKAR et al., 2006).

Dentre todos os biomarcadores possíveis, nosso trabalho remete-se a avaliação das enzimas da fase I de biotransformação, os citocromos P450.

## **1.6 Biotransformação e Citocromo P450**

Biotransformação é a alteração bioquímica sofrida por diferentes contaminantes no organismo, a partir da ação de enzimas específicas ou inespecíficas. As reações de biotransformação ocorrem em duas fases distintas, fase I e fase II. As reações de fase I incluem reações de oxidação, redução e hidrólise, introduzindo ou expondo grupos funcionais nas moléculas de xenobióticos, alterando seus efeitos biológicos, convertendo-os em químicos mais hidrofílicos de modo que possam ser

facilmente excretados, e sua reabsorção dificultada ou adaptando as moléculas para sofrerem modificações na fase II. Durante a fase II ocorrem reações de conjugação de xenobióticos ou dos metabólitos gerados na fase I, tornando-os ainda mais hidrofílicos e assim, excretados do organismo (MEYER, 1996; PARKINSON, 2008).

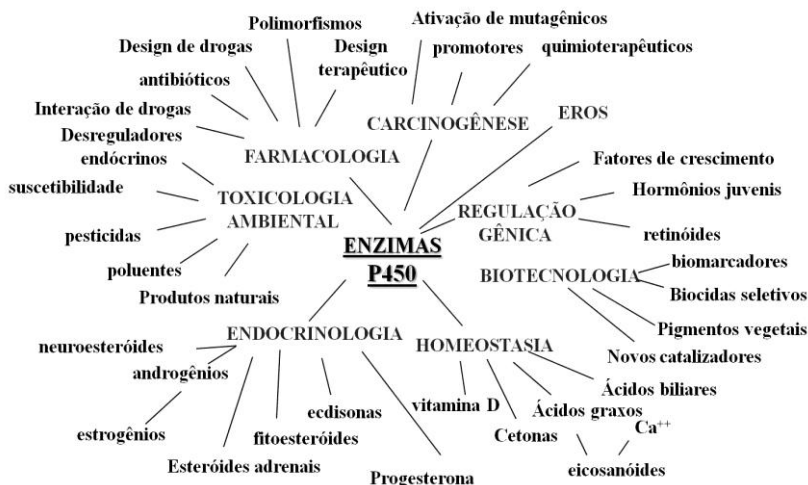
Porém, em alguns casos os metabólitos biotransformados apresentam sua atividade alterada, tornando-se mais reativos, com a possibilidade de se ligar covalentemente com moléculas de DNA, RNA ou proteínas que podem vir a interferir no funcionamento normal da célula. Essas alterações sofridas pelo xenobiótico na fase I e/ou fase II, podem transformar um composto químico inerte ou pouco tóxico, em metabólitos mais tóxicos que a molécula parental, contribuindo para os efeitos danosos dos compostos, como o aumento do risco de câncer, defeitos no desenvolvimento embrionário, entre outros (GUENGERICH, 2008; NEBERT; KARP, 2008).

As enzimas pertencentes ao processo de biotransformação constituem o sistema de monooxigenases que incluem o sistema enzimático citocromo P450 que biotransforma uma grande variedade de xenobióticos (OSHIMA; FRANCO, 2003).

O citocromo P450 pode ser encontrado em uma grande diversidade de organismos vivos, bem como, em quase todos os tecidos. A sua presença estendem-se desde os procariotas ancestrais, e a todo o reino animal e vegetal (NEBERT; FEYEREISEN, 1993; DURST, et al., 1993; GUENGERICH, 2006; PARKINSON, 2008).

Após o sequenciamento de diferentes organismos, identificou-se uma grande variedade de genes e pseudogenes da família citocromo P450 (INGELMAN, 2004; GUENGERICH, 2008; NELSON, 2009; ZHANG et

al., 2012), envolvidos no metabolismo (síntese, ativação ou degradação) de uma grande variedade de compostos orgânicos, poluentes ambientais, assim como moléculas endógenas (Figura 1) (STEGEMAN; LIVINGSTONE, 1998). Sendo assim, uma forma de CYP pode metabolizar mais de um substrato e um substrato pode ser metabolizado por mais de um CYP (GUENGERICH, 2006; PARKINSON, 2008).



**Figura 1.** Exemplos representativos do envolvimento do Citocromo P450 nos diferentes processos biológicos (STEGEMAN; LIVINGSTONE, 1998).

Desta forma, os CYPs são agrupados de acordo com as classes de substratos que metabolizam e na sequência de aminoácidos. Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (HPAs), estão entre os substratos de CYPs da família 1, em mamíferos e em peixes (NEBERT; RUSSEL, 2002). Outros CYPs pertencentes às famílias *CYP2* e *CYP3* estão relacionados não apenas à biotransformação de contaminantes, mas também relacionados com o metabolismo de compostos endógenos. Um

estudo anterior realizado por nosso grupo de pesquisa clonou uma nova isoforma de *CYP* (*CYP356A1*) que foi identificado em uma biblioteca subtrativa de ostras expostas ao esgoto sanitário (TOLEDO-SILVA et al., 2008).

Desde 1993 sequências de aminoácidos de várias isoformas de *CYP* vem sendo determinadas (NELSON et al., 1993). Os termos para a nomenclatura de *CYP* determina que sequências devem apresentar mais de 40% de similaridade para serem agrupadas na mesma família, e mais de 55% para serem agrupadas na mesma subfamília (NEBERT et al., 1991). Entretanto, Nelson e colaboradores (1996), sugerem avaliar não apenas a porcentagem de similaridade, mas também levar em consideração a disposição destas sequências na árvore filogenética.

Aproximadamente 208 subfamílias de genes *CYP*, englobando tanto animais, plantas, fungos, algas, protozoários e bactérias estão relacionadas na literatura de 2003 a 2013 (NELSON, 2009).

Mudanças no ambiente e estratégias de sobrevivência podem ter contribuído para a diversidade funcional de genes *CYP* frente a uma variedade de xenobióticos (REWITZ et al., 2006).

Com o avanço tecnológico um grande número de novas sequências, estão sendo depositadas em banco de dados, como relatado anteriormente, entretanto, análises destas sequências nos mostram que ainda existe uma lacuna a ser esclarecida relacionada ao sistema P450 em espécies marinhas (CHEN et al., 2002; PETRYK et al., 2003; BOUTET; TANGUY; MORAGA, 2004; REWITZ et al., 2006). Neste sentido novas técnicas de transcriptômica, genômica e proteômica vêm auxiliando no aumento da diversidade de genes *CYP*, uma vez que a caracterização de diferentes isoformas destes genes em moluscos marinhos ainda é restrita



(TOLEDO-SILVA et al., 2008; ZANETTE et al., 2010; WHALEN et al., 2010; PAN et al., 2011; ZHANG et al., 2012). Percebe-se que ainda existe uma dificuldade de anotação dos novos genes identificados, uma vez que alguns autores tem classificado genes *CYP* sem obedecer critérios do comitê de nomenclatura de *CYP*, dificultando a anotação destas sequências.

Com este projeto, pretende-se aprofundar os estudos de transcrição de isoformas de genes de *CYPs* em ostras *C. gigas*, e assim, contribuir na identificação e validação de indicadores que possam ser utilizados no biomonitoramento de ambientes costeiros, a fim de avaliar e prevenir o impacto da poluição no ambiente aquático.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Identificar transcritos gênicos da superfamília do citocromo P450 em ostras *C. gigas*, que sejam responsivos a contaminantes presentes no esgoto sanitário.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Analisar transcritos gênicos de citocromo P450 (*CYP356A2*, *CYP2AU2*, *CYP30C1*, *CYP3072A1*, *CYP3071A1* e *CYP26F1*), em glândula digestiva de ostras *C. gigas* expostas por diferentes tempos a diferentes locais das Baías Norte e Sul da Ilha de Santa Catarina.

- Quantificar os níveis de transcritos dos genes *CYP356A2*, *CYP2AU2* e *CYP30C1* em diferentes tecidos de ostra *C. gigas* expostas por 24 h em diferentes locais das Baías Norte e Sul da Ilha de Santa Catarina.

- Avaliação dos níveis de contaminação orgânica em sedimento e ostras *C. gigas*, mantidas por 14 dias em diferentes locais de exposição.

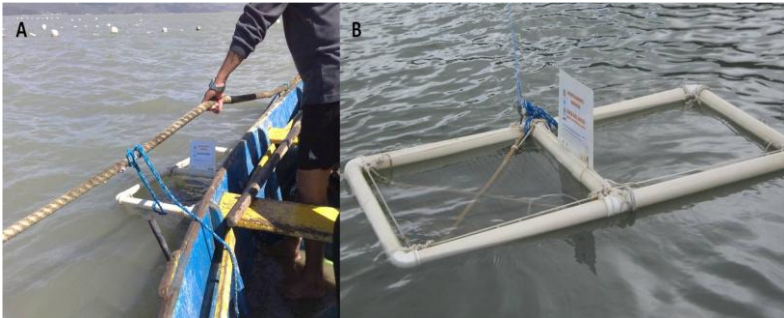
### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Delineamento experimental

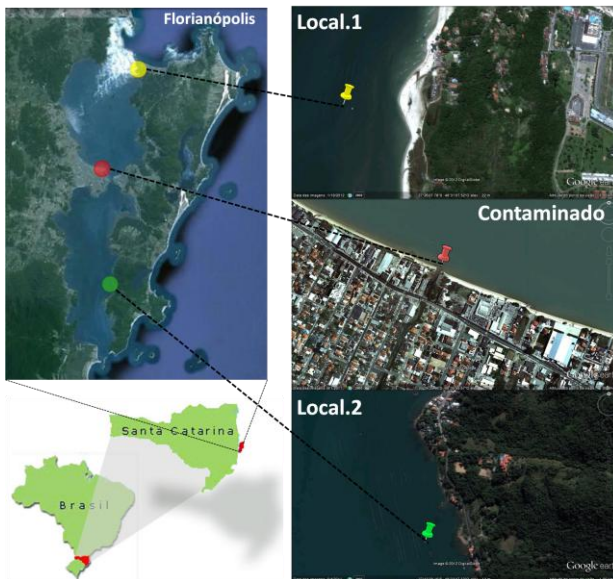
Ostras da espécie *C. gigas* (5-8 cm), foram obtidas no Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM), do Departamento de Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina (CCA-UFSC), localizado na estação de cultivo na praia de Sambaqui (Florianópolis/SC), e transportadas para os locais de exposição.

As ostras foram mantidas em mini-balsas, com gaiolas flutuantes (Figura 2) por um período de: 1, 2, 7 e 14 dias nos seguintes locais: Ribeirão da Ilha e Praia do Forte no município de Florianópolis como locais de referência, por serem locais de cultivo de moluscos, e um terceiro grupo foi exposto na região da foz do Rio Bücheler que faz a divisa entre os municípios de Florianópolis e São José (Figura 3), uma vez que alguns trabalhos anteriores (NUNES et al., 2008; MEDEIROS et al., 2008; TOLEDO-SILVA et al., 2009; ZANETTE et al., 2010), demonstraram que este local é contaminado por esgoto sanitário.

A exposição foi realizada no período de 17 a 30 de novembro 2011. Em cada período de coleta foram registradas a temperatura do ar e da água com o auxílio de um termômetro. O nível de maré foi obtido a partir das informações do site da Marinha do Brasil (<http://www.mar.mil.br>). Os dados de velocidade e direção vento, bem como a precipitação pluviométrica foram obtidos junto à EPAGRI-CIRAM, SC (<http://ciram.epagri.sc.gov.br/index.php>).



**Figura 2** - Estrutura utilizada para o transplante das ostras. (A) Colocação das balsas com barcos disponibilizados pelos pescadores locais. (B) Balsa identificada como: *Experimento ambiental e animais impróprios para consumo humano*.



**Figura 3** – Identificação dos locais de estudo nas baías da Ilha de Santa Catarina. Praia do Forte (Local.1) e Ribeirão da Ilha (Local.2), consideradas como áreas de referência para este estudo. Rio Bücheler (Contaminado) considerado um local contaminado por esgoto sanitário. (Fonte: Google Maps e Google Earth).

### 3.2 Processamento das amostras

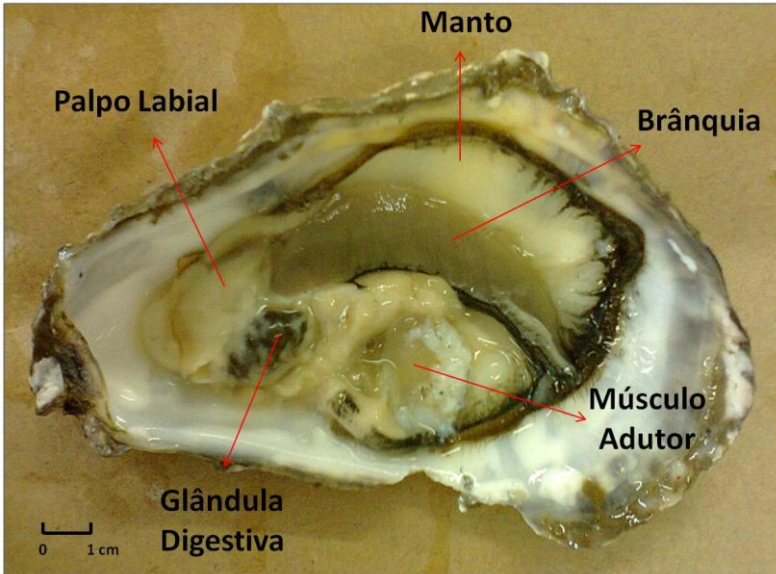
No momento da exposição 15 animais foram transportados ao Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica (LABCAI), para dissecação de cinco tecidos: brânquia, glândula digestiva, músculo adutor, palpo labial e manto (Figura 4), para representar o tempo de zero dias, antes do início da exposição. Os demais permaneceram expostos nestes locais durante 1, 2, 7 e 14 dias.

Após 1 dia de exposição, 15 animais de cada local, foram transportados para o LABCAI, para retirada dos cinco tecidos. Após 2, 7 e 14 dias de exposição, dez animais de cada local foram utilizados para a retirada somente da glândula digestiva.

As amostras de tecido dos animais de cada coleta, foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Em todas as coletas foi realizada a biometria de cada ostra, e os valores de peso total e o peso da concha foram utilizados para calcular o índice de condição obtido pela razão entre o peso da carne e o peso da concha multiplicados por 100 (BOOTH, 1983). O valor de  $P_{\text{carne}}/P_{\text{concha}}*100$ , dos animais de cada local estudado foi comparado através de análise de variância (ANOVA,  $p \leq 0,05$ ) para identificar uma possível interação entre tempo e local.

A diferença no número de amostras coletadas nos diferentes tempos justifica-se pelo fato de termos dois objetivos principais, sendo um deles a análise em glândula digestiva, que integra um tempo maior de exposição aonde o (n) é de dez animais e, o outro por serem diferentes

tecidos em apenas um dia de exposição, optamos por usar um (n) de 15 animais.

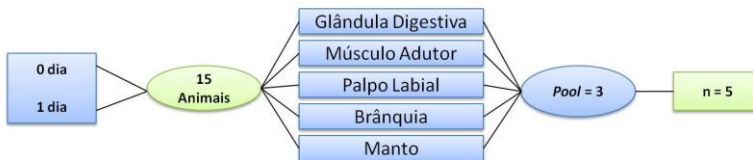


**Figura 4** – Fotografia indicando os tecidos coletados em ostras *Crassostrea gigas*.

### 3.3 Extração de RNA total e síntese de cDNA

A extração de RNA total foi dividida em dois grupos: **Grupo I** faz parte 15 amostras de cada tecido, agrupadas em *pools* de três animais, tornado assim o grupo de extração com um  $n=5$  para cada local. O **Grupo II** são 10 amostras de glândula digestiva, coletadas nos diferentes tempos, agrupadas em *pool* de duas glândulas para cada tempo (0, 1, 2, 7 e 14 dias), tendo por fim um  $n=5$  para extração de RNA total (Figura 5).

**Grupo I:** Amostra de diferentes tecidos de ostra *Crassostrea gigas*.



**Grupo II:** Amostra de glândula digestiva de ostra *Crassostrea gigas*.



**Figura 5:** Esquema representativo da composição dos *pools* das amostras utilizadas para a extração de RNA total e síntese de cDNA. **Grupo I:** Amostras de diferentes tecidos de ostra *Crassostrea gigas* após zero e 1 dia de exposição; **Grupo II:** Amostras de glândula digestiva de ostras *Crassostrea gigas* expostas por 14 dias a um local contaminado.

O RNA total foi extraído utilizando o reagente TRIzol (Invitrogen, Estados Unidos), seguindo as instruções do fabricante. A quantificação do material extraído foi realizada em espectrofotômetro (NanoDrop, Thermo Scientific) a partir das leituras a 260nm e 280nm. As amostras foram armazenadas então a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

A partir de  $1\mu\text{g}$  de RNA total foi realizada a síntese de cDNA com o kit Quantitect Reverse Transcription (Qiagen, Reino Unido), seguindo as instruções do fabricante. Em seguida as amostras foram armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 3.4 Identificação de sequências de CYPs e desenho dos iniciadores para PCR em Tempo Real (qPCR)

Sequências de nucleotídeos que codificam isoformas de genes *CYP* de ostra *C. gigas*, foram obtidas a partir de uma biblioteca de ESTs publicada por Fleury e colaboradores (2009) e depositada no Centro Nacional de Informações Biotecnológicas dos Estados Unidos (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

A tradução deduzida das sequências de nucleotídeos para aminoácidos foi realizada através do programa Translate a DNA Sequence (<http://www.vivo.colostate.edu>), e as mesmas foram utilizadas pelo programa de bioinformática BLAST – Protein blast, disponível do NCBI, para identificação das isoformas de *CYP*. Inicialmente as diferentes isoformas foram escolhidas por sua similaridade aos genes pertencentes às sub-famílias *CYP1*, *CYP2*, *CYP3*, *CYP10*, *CYP17* e *CYP26*. Após a recente publicação do primeiro draft do genoma de *Crassostrea gigas* (ZHANG et al., 2012) foi realizada uma nova anotação destes genes. No entanto, foram detectados vários problemas na nomenclatura dos diferentes *CYP* depositados. Desta forma, a sequência dos 6 genes estudados neste trabalho foram enviadas para o Dr. David Nelson (Coordenador do Comitê de Nomeclatura de CYP) e Dr. Jarred Goldstone para realizarem uma análise e definição da nomenclatura adequada que está sendo utilizada neste trabalho (Tabela 1).

A partir das sequências de nucleotídeos (FLEURY et al., 2009) foram desenhados iniciadores utilizando o software Primer3 (Tabela 2) disponibilizado na ferramenta Primer Quest do site da empresa Integrated



DNA Technologies (<http://www.idt.com>) e *FASTPCR*, analisando os resultados de *hairpin* e a formação de dímeros.

Para normalizar os dados de qPCR, foram utilizados iniciadores para o gene constitutivo *elongation factor 1a* (TOLEDO-SILVA, 2009).

### 3.5 Análise Filogenética

A análise filogenética foi realizada a partir de sequências de aminoácidos dos genes deste trabalho, bem como sequências de aminoácidos depositadas no Genbank.

As sequências de aminoácidos foram alinhadas, e a árvore filogenética foi construída no *Software* MEGA, versão 5 (TAMURA et al., 2011). Este software realiza uma série de análises evolutivas baseadas em alinhamentos múltiplos de sequências. Neste trabalho foi realizada uma análise de Máxima Parcimônia, buscando o menor número de eventos de mutação entre as sequências. A árvore de consenso foi inferida a partir de 1000 replicatas para representar a história evolutiva dos taxa analisados (FELSENSTEIN, 1985). A árvore de Máxima Parcimônia foi obtida usando o algoritmo *Subtree-Pruning-Regrafting* (SPR) (NEI; KUMAR, 2000).

### 3.6 PCR Quantitativo em Tempo Real (qPCR)

Para as reações de q-PCR, o cDNA sintetizado foi diluído em uma concentração de 100ng/μl e foram utilizados 2μl por reação.

A curva padrão das reações de qPCR foi padronizada para cada um dos tecidos a serem analisados (brânquia, glândula digestiva, músculo adutor, palpo labial e manto) a partir de um *pool* contendo uma amostra de cada local de exposição e uma amostra do tempo de zero dia. A partir do *pool* de cDNA foi realizado uma diluição seriada em 2, 10, 100 e 500 vezes.

**Tabela 1.** Sequências de genes *CYP* identificadas e anotadas conforme proposto por David Nelson (*CYP-Nomenclature*) comunicação pessoal.

Anotação do gene	E - value	Identidade	Cod. NCBI
<i>CYP356A2 C. gigas</i>	0	99%	EKC22296.1
<i>CYP2AU2 C. gigas</i>	7e- 144	72%	EKC26764.1
<i>CYP30C1 C. gigas</i>	2e- 63	100%	EKC28276.1
<i>CYP3072A1 C. gigas</i>	5e- 118	97%	EKC25019.1
<i>CYP3071A1 C. gigas</i>	1e- 116	99%	EKC42568.1
<i>CYP26F1 C. gigas</i>	3e-89	99%	EKC33614.1

**Tabela 2.** Iniciadores para genes *CYP* de ostras *Crassostrea gigas*. (EF) *Elongation factor 1a*.

<b><i>CYP356A2</i></b>	Forward	ATAGTCCGGCTGTCTGTTGGTCC
	Reverse	CCTCCTTCCGTAAACACATCACCTG
<b><i>CYP2AU2</i></b>	Forward	GCCACTTCTAGTCCATCTTCACCTGC
	Reverse	GCTCTTCGATTACTTCATTTGCGAACCC
<b><i>CYP30C1</i></b>	Forward	TCTAAAGCCGGACTCTTGAAGCCAGA
	Reverse	TTTCGCCTTTCAGGTGCGTGGTTC
<b><i>CYP3072AI</i></b>	Forward	AGAACTGGCTGGTGGTCTCT
	Reverse	CGCATCATTTGGTTGTTGGCAGG
<b><i>CYP307IAI</i></b>	Forward	ACCGTGTGTGTTTAGGCTCG
	Reverse	CTGTTTGTAGTCCTGCGTTCGG
<b><i>CYP26F1</i></b>	Forward	TGTGTCGGGAAGGAGTATGCGA
	Reverse	CCTCTGCTCTTGGAACGGGAATGT
<b><i>EF</i></b>	Forward	TTCTGTGCAGCCTTGGTGACTTTG
	Reverse	TATGGTCCTCATGGTTCAGCAA

A reação em cadeia da polimerase foi realizada utilizando o kit Rotor Gene SYBR Green RT-PCR kit (Qiagen, Reino Unido), de acordo com as instruções do fabricante em um termociclador Rotor-Gene-Q (Qiagen, Reino Unido) em duplicata para cada amostra, com rotor de 72 poços seguindo os parâmetros padronizados para cada gene estudado, garantindo o mínimo de variações de temperatura entre os tubos e a alta precisão na quantificação de qPCR.

Para a amplificação dos produtos da reação de qPCR, foram utilizados 25µM de cada iniciador e 100ng de amostra. As condições da reação de qPCR foram: 95°C por cinco minutos, 35 ciclos de cinco segundos a 95°C e 10 segundos a 60°C, fase onde ocorreu a aquisição da fluorescência. Todas as amostras foram analisadas em duplicatas e através

da curva de dissociação (*Melting*) foi possível confirmar a amplificação de um único produto.

As análises das reações foram realizadas pelo programa Qiagen Rotor-Gene 6000 Application Software. Para as análises das amostras o software encontrou o valor da fluorescência onde cada uma das reações atingiu uma amplificação exponencial superando as taxas basais de fluorescência (*threshold*) e o ciclo no qual ele ocorre (*Ct – threshold cycle*). Para análise da eficiência da curva, o software correlacionou a quantidade de cDNA estimado na reação com o *Ct* da amostra. A partir dos dados gerados foi realizada a regressão linear e a eficiência da curva foi analisada através dos dados da equação como linearidade ( $R^2$ ) e coeficiente angular (*M*).

### **3.7 Sequenciamento dos produtos amplificados na qPCR**

#### **3.7.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)**

Após as análises de transcrição relativa dos diferentes genes *CYP*, por qPCR, realizamos a amplificação pela reação em cadeia da polimerase (PCR) a fim de confirmar a especificidade das sequências amplificadas de cada gene por sequenciamento.

As amplificações foram realizadas com as seguintes condições: 1 $\mu$ l de cDNA (*pool* de amostras de brânquia coletadas após um dia de exposição, na concentração de 1 $\mu$ g/ $\mu$ l); 2,5 $\mu$ l de 10x Advantage 2 AS PCR Buffer (Clontech); DNTP Mixture Solution 25mM (AMRESCO); MgCl<sub>2</sub> 25mM (Fermentas); iniciadores forward e reverse para cada gene

(*CYP356A2*, *CYP2AU2*, *CYP30C1*, *CYP3072A1*, *CYP3071A1* e *CYP26F1*) na concentração de 0,5 $\mu$ M; 0,2 $\mu$ l de 50x Advantage 2 DNA Polymerase Mix (Clontech) e 18,9 $\mu$ l de água para biologia molecular, totalizando um volume final de 25 $\mu$ l por reação.

O programa utilizado para as amplificações realizou uma etapa inicial de desnaturação a 94°C por 4 minutos, seguidos por 30 ciclos nas condições descritas na Tabela 3 e por fim 72°C por 4min para desativação da enzima Polymerase. Foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1% para verificação do produto de PCR.

**Tabela 3:** Condições da reação de PCR.

<b>Etapa</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>
<b>Desnaturação</b>	94°C	10 seg
<b>Ligação dos iniciadores</b>	57,5°C ( <i>CYP356A2</i> ; <i>CYP2AU2</i> ) 58,8°C ( <i>CYP30C1</i> ; <i>CYP3072A1</i> ; <i>CYP3071A1</i> ; <i>CYP26F1</i> )	15 seg
<b>Alongamento</b>	72°C	30seg

### **3.7.2 Purificação, Clonagem e Sequenciamento dos fragmentos dos produtos de PCR para confirmação do genes.**

Após analisar os resultados da eletroforese, os produtos da reação com tamanho esperado foram purificados utilizando o kit ExoStar, Enzymatic PCR and Sequencing Clean-up Kit® (GE Healthcare), de acordo com as instruções do fabricante. Foram utilizados 2 $\mu$ l para

quantificação do cDNA em 260nm e 280 nm no espectrofotômetro NanoDrop (*Thermo Scientific*) e o restante, utilizado para a clonagem.

Após a purificação, o inserto foi ligado ao vetor pGEM-T<sup>®</sup> Easy (Promega, EUA) com posterior transformação em bactérias cálcio competentes DH5 $\alpha$  através de choque térmico a 42°C. As bactérias transformadas foram incubadas em placa de ágar 35g/L (LB Agar- Sigma) com ampicilina (100mM) , IPTG (0,5mM) e X-GAL (50mM) durante 18 horas a 37° C para o crescimento das colônias. Em função do método de seleção colorimétrico, as colônias que apresentaram cor branca foram transferidas para placa *deepwell* de 96 poços para crescimento, contendo 1ml de cultura líquido 20g/L (LB Broth - Sigma) contendo 100mM de ampicilina, e mantidas durante 18 horas a 37° C em agitação constante (140rpm).

A purificação do DNA plasmidial foi realizada pelo método de lise alcalina, modificado de Sambrook (1989) e 2 $\mu$ l do material purificado foi quantificado por espectrofotometria no NanoDrop.

Os produtos foram sequenciados no sequenciador ABI 3130 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems<sup>®</sup>) para 4 capilares, utilizando o *Kit ET Dye Terminator DYEnamic<sup>®</sup>* com os iniciadores M13F ou M13R.

### **3.8 Anotação das sequências**

As sequências obtidas foram primeiramente submetidas a uma avaliação de qualidade pelo programa Phred ( $Phred \geq 15$ ), do pacote Phred/Phrap/Consed (EWING;GREEN, 1998; EWING et al., 1998), e posteriormente analisadas pelo programa SeqMan Pro DNASTAR

Software for life scientists Version 10.1.2, e comparadas com o banco de dados do *GeneBank*, utilizando os algoritmos Blastx e Blastp.

### 3.9 Análise de componentes orgânicos

Em cada local de exposição, no décimo quarto dia de experimento, foram coletadas amostras de sedimento e de ostras *C. gigas*, para a realização de análises quali-quantitativas de compostos orgânicos.

As amostras de sedimento foram liofilizadas durante 72 horas em liofilizador Thermo Savant – ModulyoD. Em seguida, as amostras foram maceradas e homogeneizadas em almofariz com pistilo e armazenadas em frascos de vidro previamente limpos com solvente. As ostras *C.gigas* foram secas com sulfato de sódio em almofariz com pistilo imediatamente antes da extração.

Uma alíquota de 20 gramas de sedimento e 5 gramas do tecido mole da ostra foi extraída em sistema Soxhlet para análise dos bifenilos policlorados (PCBs), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e alquilbenzeno lineares (LABs) com n-hexano/diclorometano 50% (v/v) segundo método descrito em UNEP (1992), Matos (2002) e MacLeod et al. (1986) com algumas modificações. Antes da extração foram adicionados os padrões surrogate PCB-103, PCB-198 naftaleno-d<sub>8</sub>, acenafteno-d<sub>10</sub>, fenantreno-d<sub>10</sub>, criseno-d<sub>12</sub> e perileno-d<sub>12</sub>, dodecil alquilbenzeno (1C<sub>12</sub>LAB), hexadeceno e eicoseno em todas as amostras, brancos e materiais de referência certificados (SRM). O SRM 1944 e 2978 utilizado para sedimento e as ostras, respectivamente, foram provenientes da National Institute of Standards and Technology (NIST) dos EUA.

O extrato do sedimento foi dividido em duas alíquotas para serem submetidas à cromatografia por adsorção em coluna. Uma parte foi eluída em coluna contendo 3,2 g de alumina 5% desativada para análise de organoclorados. A outra fração foi eluída em coluna com alumina sobre sílica, também 5% desativadas, onde o extrato foi purificado e separado para análise de LABs (F1) e HPAs (F2). O extrato evaporado dos organismos foi submetido a uma coluna cromatográfica contendo 8 gramas de sílica gel sobre 16 gramas de alumina (ambas da Merck), 5% desativadas com água pré-extraída 5 vezes com n-hexano, e 1 grama de sulfato de sódio da J. T. Baker no topo. A eluição foi realizada com 80 mL de uma mistura de n-hexano e diclorometano (50%). Para purificação complementar, o eluato foi concentrado a 0,5 mL e injetado no cromatógrafo líquido de alto desempenho (HPLC) da Perkin Elmer equipado com duas colunas de exclusão (permeação em gel). A fase móvel utilizada foi o diclorometano.

Os compostos HPAs, PCBs e LABs foram analisados no cromatógrafo a gás equipado com espectrômetro de massas (GC-MS) 6890/5973N da Agilent Technologies. A aquisição dos dados foi feita em SIM (monitoramento seletivo de íons).

As temperaturas do GC-MS foram de 280°C no injetor, 280°C na interface e 300°C na fonte de íons. A coluna cromatográfica utilizada foi da J&W Scientific com 30 metros de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme de 5% fenilmetilsiloxana. A rampa de temperatura para PCBs foi: início a 75°C durante 3 minutos, aumento a uma taxa de 15 °C até 150 °C e a 2 °C até 260 °C e a 20 °C até 300 °C permanecendo constante durante 1 minuto. A rampa para os AHs (no GC-FID), HPAs e LABs teve início em 40°C com aumento a taxa de



20°C até 60°C e a 5°C min<sup>-1</sup> até 290°C onde permaneceu por 5 minutos e aumento a 10°C até 300°C onde permaneceu constante durante 10 minutos. Para os esteróides, a rampa de temperatura foi programada de 40 a 240 °C a 10 °C min<sup>-1</sup>, subindo até 245 °C a 0,25 °C min<sup>-1</sup> (isotérmico por 5 min), e até 300 °C a 10 °C min<sup>-1</sup> (constante por 5 min).

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

### 3.10 Análise Estatística

Os resultados de transcritos gênicos, obtidos a partir das análises de qPCR foram calculados e analisados estatisticamente por dois programas similares: (1) *Software REST* - Relative Expression Software Tool. Este programa é uma ferramenta destinada a análises de biologia molecular, utilizada para estimar a regulação da transcrição gênica a partir dos dados de *Ct* gerados nas reações de PCR em tempo real. O *software* analisa a quantificação da transcrição relativa de um gene referência para normalizar os níveis de transcrição dos genes de interesse em diferentes amostras usando um modelo matemático baseado na eficiência da PCR e o desvio padrão entre a amostra e o controle. A significância é testada por

randomização e método de bootstrapping (PFAFFL; HORGAN; DEMPFLER, 2002). (2) GraphPad *Software* versão 5.01. É um programa que apresenta uma variedade de ferramentas estatísticas, que atendem praticamente todas as necessidades de tratamento de dados, principalmente na área biológica. Os dados gerados neste trabalho foram submetidos ao teste Kruskal-Wallis e Dunns, testes não paramétricos (One-Way ANOVA), que comparam três os mais grupos distintos (dados não mostrados). Sendo que o teste de Kruskal-Wallis depende muito do tamanho amostral.

A significância ou intervalo de confiança de ambos os testes foi de 95% onde o valor de  $p < 0,05$ .

Baseando-se nestas informações, nossos resultados apresentam os gráficos gerados no GraphPad, porém o valor estatístico utilizado foi gerado pelo REST.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Dados físicos e meteorológicos dos locais de estudo

A Tabela 4 apresenta os resultados de temperatura do ar, da água, nível de maré, nível de precipitação pluviométrica, e intensidade dos ventos nos dias de coleta durante o experimento de campo nos três locais de estudo. Durante todo o período experimental, a temperatura do ar variou de 20 a 25,5°C e a da água de 20 a 22,4°C. Nos dias de coleta, a maré variou nos diferentes locais de 0,3 a 1,0m. A velocidade dos ventos variou de 1,2 a 5,5ms. No primeiro e segundo dia do experimento não foi verificada uma precipitação pluviométrica. No sétimo dia variou de 2,6 a 2,8 mm nos diferentes locais e no décimo quarto dia variou de 1,4 mm no local contaminado e 0,7 mm nos locais referência.

### 4.2. Dados biométricos dos animais

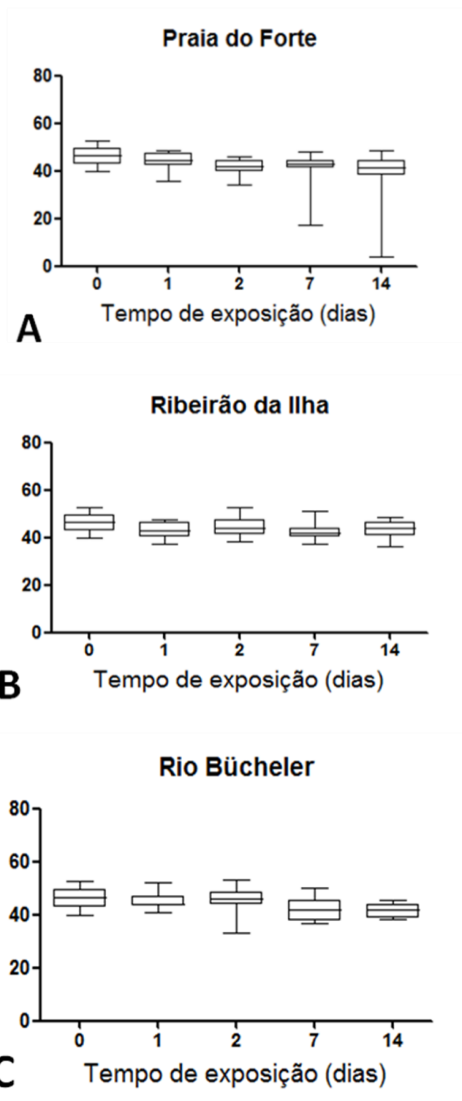
Após a exposição foi realizada a biometria de cada animal e os valores de peso total e o peso da concha foram utilizados para calcular o índice de condição.

Como é possível observar na Figura 6, houve uma diferença significativa no IC, nas amostras do Rio Bücheler ( $P= 0,0064$ , Figura6C) quando comparado o tempo de zero dias e 14 dias. O IC destas amostras foi menor ao longo do tempo, possivelmente relacionado ao estágio reprodutivo, não analisado neste estudo, bem como, o estresse sofrido pelos animais.

A largura média dos animais nos locais de estudo variou entre 6,36 e 7,24, e o comprimento entre 7,29 e 7,79, evidenciando que houve uma padronização nos tamanhos das amostras.

**Tabela 4:** Dados físicos e ambientais coletados, nos locais de estudo. **(Büch) Local Contaminado:** Rio Bücheler; **(Forte) Referência 1:** Praia do Forte; **(Rib) Referência 2:** Ribeirão da Ilha. Os números **1, 2, 7 e 14** referem-se ao período em que as ostras ficaram expostas.

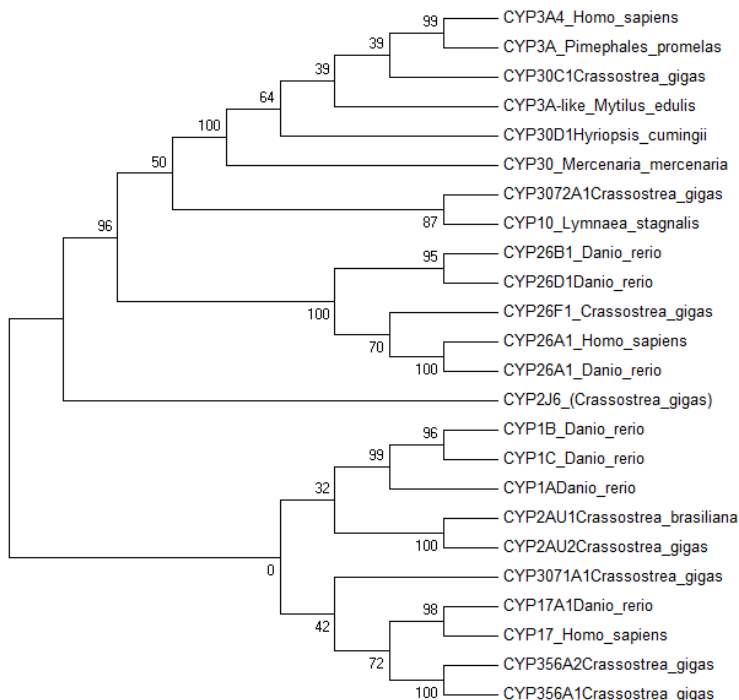
Local	Temperatura Ar (°C)	Temperatura água (°C)	Maré (m)	Velocidade vento (ms)	Precipitação chuva (mm)
Büch 1	24	22	0,8	1,8	0
Büch 2	20	22,4	0,8	1,2	0
Büch 7	22,3	22	0,3	4,2	2,8
Büch 14	24	22,2	0,4	2,1	1,4
Forte 1	22	20	0,8	3	0
Forte 2	22	21,8	0,8	3	0
Forte 7	23,8	21,5	0,3	4	2,6
Forte 14	25,5	21	0,4	5,5	0,7
Ribe 1	24	21,6	0,9	3	0
Ribe 2	25	21,6	0,9	3	0
Rib 7	23,8	21,5	1,1	4	2,6
Rib 14	25,5	21,6	1	5,5	0,7



**Figura 6:** Índice de Condição (IC), em ostras *C. gigas*, expostas por 1, 2, 7 e 14 dias em diferentes locais.

### 4.3 Análise filogenética dos genes *CYP*

O gene que codifica *CYP30C1* foi agrupado no grupo de outros *CYP30* de bivalves, que eram mais próximos a membros das subfamílias *CYP3A* de diferentes espécies. O gene *CYP3072A1* permaneceu mais próximo do gene *CYP10* que pertence ao Clan de *CYP* mitocondrial. O gene *CYP26F1* ficou classificado dentro do grupo de outros *CYP26* de *H. sapiens* e *D. rerio*. O gene *CYP2AU2* de *C. gigas* foi agrupado juntamente com *CYP1A*, *CYP11B* e *CYP1C* de *D. rerio* e *CYP2AU1* de *C. brasiliensis*, enquanto que o gene da *CYP356A2* foi agrupado com *CYP356A1* de ostra *C. gigas*. Também permaneceu neste grande grupo o gene que codifica *CYP3071A1* de *C. gigas*, que ficou agrupado com *CYP17* de *H. sapiens* e *CYP17A1* de *D. rerio* (Figura 7).



**Figura 7:** Análise Filogenética por Máxima Parcimônia de genes CYP inferida a partir de 1000 replicatas (FELSENSTEIN, 1985). A porcentagem das replicatas das árvores nas quais os agrupamentos foram realizados está indicada nos pontos de ramificações. A árvore foi obtida usando o algoritmo *Subtree-Pruning-Regrafting* (SPR) (NEI; KUMAR, 2000).

#### 4.4 Padronização e eficiência das reações de qPCR

A padronização das reações de qPCR de cada gene *CYP*, obedeceram alguns critérios, tais como a presença de um único produto amplificado para cada gene especificamente, sem a presença de dímeros ou de contaminação da amostra. Somente foram consideradas as reações que apresentaram coeficiente de correlação ( $R^2$ ) com 98% ou maior de

eficiência, inclinação da reta (M) 98% ou maior, e a eficiência da reação 100% quando o valor foi igual a 1(dados não mostrados).

#### **4.5 Níveis de transcritos de isoformas de CYP em glândula digestiva de ostras *Crassostrea gigas* expostas por diferentes tempos nos locais de estudo**

Processos de biotransformação são conhecidos por apresentarem uma resposta a exposição por diferentes contaminantes nos organismos, sendo sugeridos como biomarcadores de contaminação no ambiente. Estas respostas podem ser quantificadas a nível bioquímico e/ou molecular, como atividade catalítica de enzimas, expressão de proteínas, ou transcrição gênica (KAMMANN et al., 2008).

Nesta etapa do trabalho foram analisados os níveis de transcritos de diferentes isoformas de *CYP* por qPCR em amostras de glândula digestiva de ostras *C. gigas* mantidas em três locais nas Baías Norte e Sul da Ilha de Santa Catarina.

Para realizar a comparação relativa dos transcritos de diferentes *CYP* nas amostras das ostras de todos os locais, optou-se por normalizar os resultados pelos dados apresentados pelos animais mantidos no local. 1 (Praia do Forte) em todos os períodos de exposição, por estes terem apresentado os menores níveis de contaminação por compostos orgânicos quantificados ao final da exposição (vide resultados adiante).

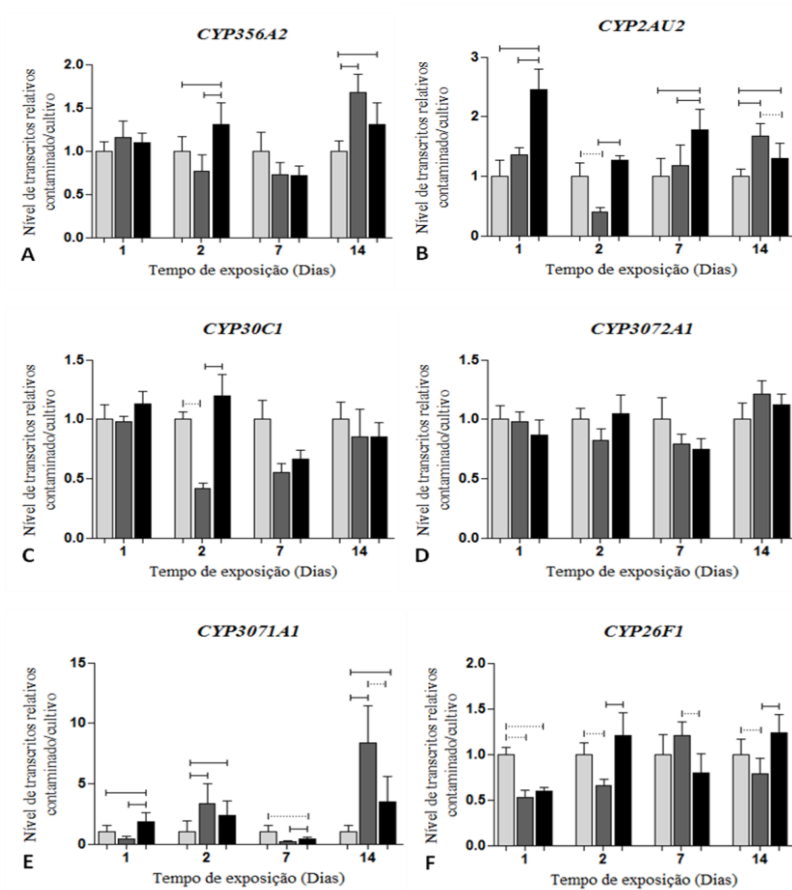
A Figura 8 mostra os níveis de transcritos relativos de genes *CYP* (*CYP356A2*, *CYP2AU2*, *CYP30C1*, *CYP3072A1*, *CYP3071A1* e *CYP26F1*), observados nos animais mantidos durante 1, 2, 7 e 14 dias nos



locais de cultivo (Local 1 e 2) e no local contaminado por esgoto sanitário.

Os animais mantidos no local contaminado durante 2 dias apresentaram níveis de transcrição do gene *CYP356A2*, 1,3 e 1,8 vezes maiores, respectivamente, do que os animais que permaneceram nos locais de cultivo (Local 1 e Local 2). Após 14 dias de exposição os animais do local contaminado e local 2 apresentaram uma maior transcrição deste gene em relação aos animais que permaneceram no local 1 (Figura 8A).

Os níveis de transcritos de *CYP2AU2* foram 2,7 e 1,8 vezes maiores nos animais mantidos no local contaminado por 1 dia, em relação aos animais mantidos respectivamente nos locais 1 e 2 (Figura 8B). Estes níveis permaneceram superiores mesmo após 2 e 7 dias de exposição em relação ao local 2. Após 14 dias de exposição os níveis de *CYP2AU2* estavam aumentados nos animais do local 2 e do local contaminado, em relação aqueles animais mantidos no local 1.



**Figura 8:** Níveis de transcritos relativos de genes *CYP* em amostras de glândula digestiva de ostras expostas por diferentes tempos de exposição. (**Local 1** ) Cultivo de moluscos na Praia do Forte; (**Local 2** ) Cultivo de moluscos no Ribeirão da Ilha; (**Contaminado** ) Rio Bücheler. Valores significativos quando  $p < 0,05$ . (—): **Induzido**; (---): **Reprimido**.

Maiores níveis de transcritos do gene *CYP30C1* foram observados nos animais expostos por dois dias no local contaminado (2,8 vezes) e nos animais mantidos no local 1 (1,6 vezes), quando comparados aos animais mantidos no local 2 (Figura 8C).

Nenhuma diferença significativa foi observada nos níveis de transcritos de *CYP3072A1* na glândula digestiva dos animais que permaneceram nos diferentes locais e nos diferentes períodos de exposição (Figura 8D).

Os níveis de transcritos de *CYP3071A1* nos animais mantidos no local contaminado por 1, 2 e 14 dias foram significativamente maiores do que os animais do local 1 (Figura 8E). No período de 7 dias foi observada uma diminuição na transcrição deste gene nos animais mantidos no local contaminado. Interessante observar que se comparamos os níveis de transcritos de *CYP3071A1* entre os animais dos dois locais de cultivo, não houve um padrão de resposta consistente, uma vez que nos tempo 2 e 14 dias foi observado um aumento na transcrição deste gene, mas nos períodos de 1 e 7 dias de exposição não foram verificadas alterações neste gene (Figura 8E).

Após 1 dia de exposição, os animais mantidos no local 2 e contaminado apresentaram uma diminuição nos níveis de transcritos de *CYP26F1*. Após 2 dias de exposição foi observado um aumento no nível dos transcritos deste gene nos animais mantidos no local contaminado, em relação aos animais do local 2 (Figura 8F).

Os níveis de transcritos gênicos de *CYP3072A1* da glândula digestiva das ostras não apresentaram diferença significativa em nenhum dos tempos de exposição ( $p < 0,05$ ) (Figura 9D).

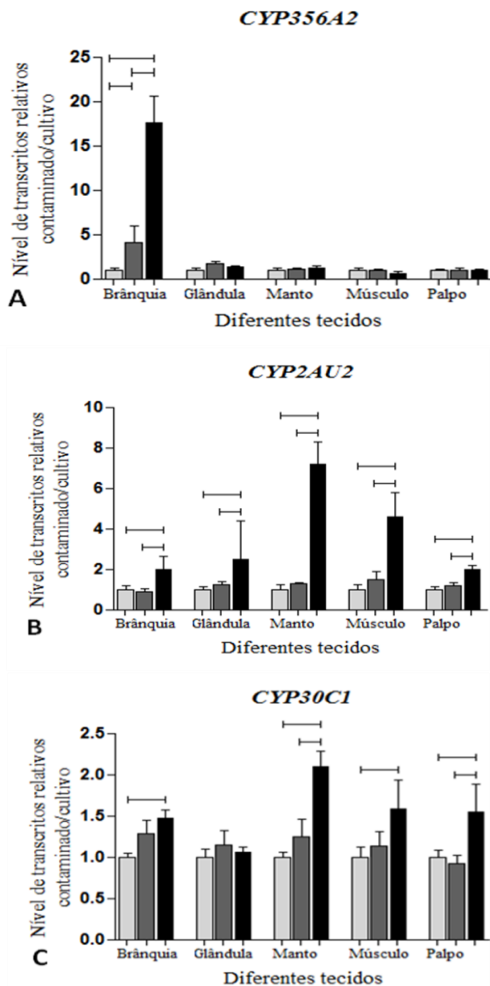
#### **4.6 Transcrição relativa do citocromo P450 em diferentes tecidos de ostras *Crassostrea gigas***

A transcrição relativa dos genes *CYP356A2*, *CYP2AU2*, e *CYP30C1* foi analisada em amostras de diferentes tecidos de ostra *C. gigas* expostas por 1 dia nos diferentes locais de estudos. A Figura 10 mostra os resultados obtidos para cada gene.

As amostras de brânquias apresentaram um aumento na transcrição de *CYP356A2* de cerca de 17 e 4 vezes nos animais mantidos no local contaminado e no local 2, respectivamente, em relação aos animais do local 1 (Figura 9A). Os demais tecidos dos animais expostos não apresentaram alteração na transcrição deste gene após 1 dia de exposição (Figura 9A).

A transcrição de *CYP2AU2* foi significativamente maior em todos os tecidos dos animais mantidos no local contaminado, em relação aos animais mantidos em ambos locais de referência, tendo sido mais marcante esta diferença nas amostras do manto (Figura 9B).

A transcrição de *CYP30C1* foi significativamente maior na brânquia, manto, músculo adutor e palpo labial dos animais expostos por 1 dia no local contaminado, em relação aos animais do local 1 (Figura 9C). Nenhuma alteração foi observada nas amostras da glândula digestiva.



**Figura 9.** Transcrição relativa de *CYP356A2*, *CYP2AU2* e *CYP30C1*, em diferentes tecidos de ostra *Crassostrea gigas*, após um dia de exposição ao (Local 1 ) Cultivo de moluscos na Praia do Forte; (Local 2 ) Cultivo de moluscos no Ribeirão da Ilha; (Contaminado ) Rio Bücheler. Valores significativos quando  $p < 0,05$ . (—): Induzido; (---): Reprimido.

## 4.7 Sequenciamento

Para confirmação dos genes amplificados pelos iniciadores desenhados e utilizados nas reações de qPCR, os fragmentos de tamanho esperado de cada gene obtidos nestas reações foram purificados, clonados e sequenciados.

Todos os genes amplificados neste trabalho tiveram sua sequência confirmada, como demonstrado na Figura 10 e na Tabela 5 encontra-se a anotação destas, a partir de análise através de BLASTp.

### ➤ *CYP356A2*

ATAGTCCGGTGTCTGTGGTCCCCAAACCTGGGTGTTCTTAATGACATCAACTCTGT  
GCTGGAAAGCAATGGTAACGAAAAAGACCGATTTTCTGGAAGACCCACAGATTACATC  
AGGTGATGTGTTTACGGAAGGAGG

### ➤ *CYP2AU4*

GCCACTTCTAGTCCATCTTCACCTGCGGTATTTTTCTATTCTTCGTCATTTACCGATC  
TCAAGAGTTGACACGGTGCAAAACGTATTTGCTGAGATCGATGGGTTCGCAAATGAA  
GTAATCGAAGAGC

### ➤ *CYP30C1*

TCTAAAGCCGGACTCTTGAAGCCAGAAAATGGTGTTAAGCTGCTCTTAGAACCACGC  
ACCTGAAAGGCGAAA

### ➤ *CYP3072A1*

AGAACTGGCTGGTGGTCTCTCGAATCCGCTGTTTTGAGAACAGCTGCTGAGGGACG  
CGGACAAATACCCTGCTCGACCCACTGTCGGAATTTGGACGCTTACTACAAAAGAA  
AGAACTCTCTCCAGGATTATCATCACTGCAAGGTGAACAATGGGCCAATCTTAGAAA  
ACCTGCCAACAAACCAATGATGCG

### ➤ *CYP3071A1*

ACCGTGTGTGTTTAGGCTCGAACATTGCCAAAATGCTGTGTTTTCTCGTTCTGTGCCACT  
CTGATCAAAAACATAAAATTAAGTGTCCCGGACGGCTCCCCTTGGCCAGACATGAAAC  
CGAACGCAGGACTAACAAACAG

### ➤ *CYP26F1*

TGTGTCGGGAAGGAGTATGCGAACTTATAATTAGGATATTTCTGATTGAACTAGCTCG  
AAAATGTGACTGGAAGTTGCAAACTCTTATCCTAAATTTGTACATTCCTCGTTCCAAGA  
GCAGAGG

**Figura 10.** Sequência de nucleotídeos dos amplicon dos genes *CYP* sequenciados. *CYP356A2*: 140pb; *CYP2AU2*: 130pb; *CYP30C1*: 102pb; *CYP3072A1*: 196pb; *CYP3071A1* 139pb; *CYP26F1*: 127pb.

**Tabela 5:** Análise dos amplicons sequenciados dos genes *CYP* de ostras *C. gigas*.

Descrição	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Acesso
<i>CYP356A2</i>	87.0	87.0	100%	5e-20	79%	EKC22296.1
<i>CYP2AU2</i>	84.0	84.0	100%	4e-18	93%	EKC26764.1
<i>CYP30CI</i>	63.4	63.4	86%	2e-10	100%	EKC28276.1
<i>CYP3072AI</i>	135	135	100%	4e-36	95%	EKC25019.1
<i>CYP3071AI</i>	100	100	100%	1e-23	98%	EKC42568.1
<i>CYP26F1</i>	60.1	60.1	61%	2e-09	100%	EKC33614.1

#### 4.8 Análise de Componentes Orgânicos em sedimento e ostra *Crassostrea gigas*.

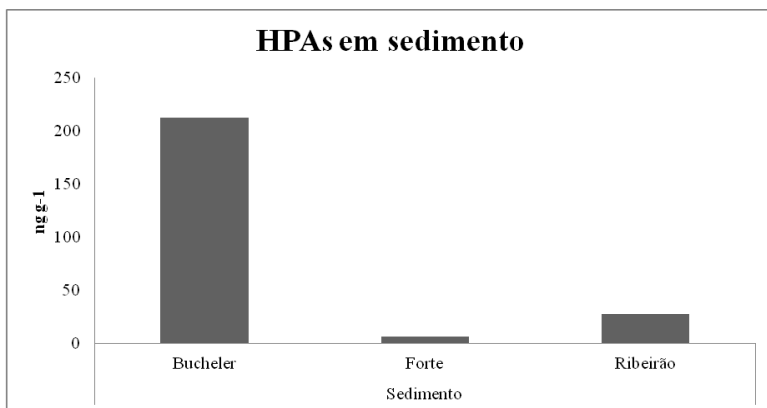
##### 4.8.1 Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos e Alifáticos

No presente estudo foram analisados os níveis de HPAs no sedimento dos locais de cultivo e do local contaminado por esgoto sanitário, bem como, em ostra *C. gigas* expostas nestes locais por 14 dias.

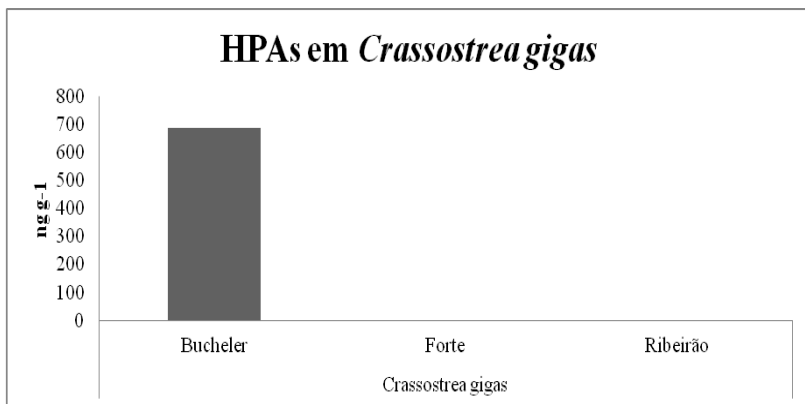
As amostras de sedimento do Rio Bücheler (contaminado) apresentaram níveis de HPAs totais de 213 ng.g<sup>-1</sup>, com 26,9% de perileno, indicando uma importante contribuição pirogênica. Amostras provenientes da Praia do Forte (Local 1) apresentaram apenas o composto dimetilnaftaleno na concentração de 6,20 ng g<sup>-1</sup>, e amostras de sedimento do Ribeirão da Ilha (Local 2) apresentaram níveis de HPAs totais de 27.5 ng g<sup>-1</sup> (Figura 11).

As concentrações de hidrocarbonetos alifáticos nas amostras de ostras *C. gigas*, foram observadas apenas nas amostras expostas ao local contaminado com um total de 688 ng g<sup>-1</sup>, (Figura 12). Os animais dos

locais 1 e 2 não apresentaram concentrações acima do limite de detecção do teste.



**Figura 11.** Níveis de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) em ng g<sup>-1</sup>, peso seco de amostras de sedimento coletado nos locais de estudo. **Bucheler:** Rio Bücheler (Local contaminado), **Forte:** Praia do Forte (Local 1); **Ribeirão:** Ribeirão da Ilha (Local 2).



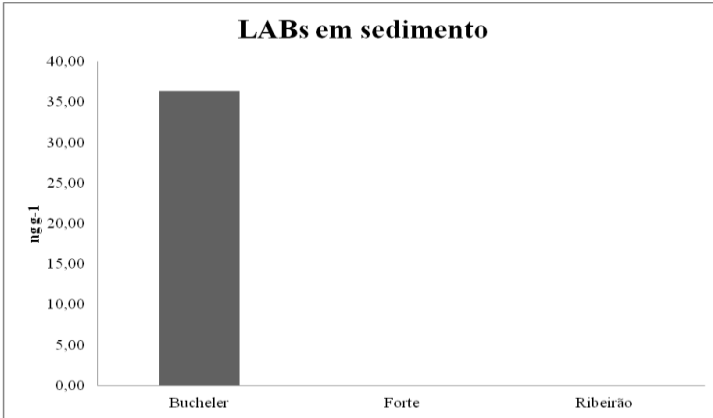
**Figura 12.** Níveis de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) em ng g<sup>-1</sup>, peso seco de amostras de ostras *Crassostrea gigas*, coletadas nos locais de estudo. **Bucheler:** Rio Bücheler (Local contaminado), **Forte:** Praia do Forte (Local 1); **Ribeirão:** Ribeirão da Ilha (Local 2).



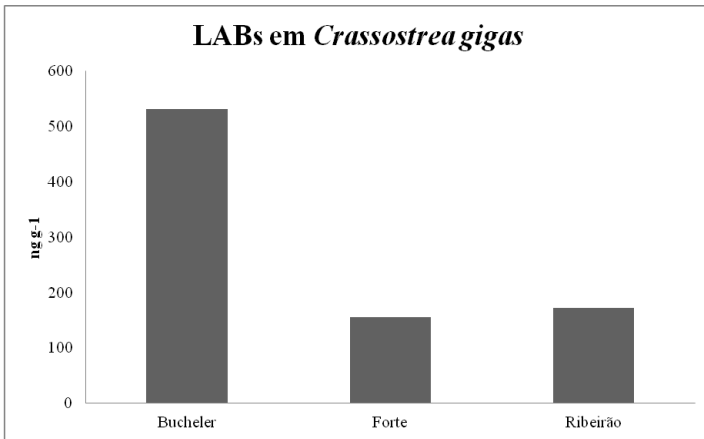
#### 4.8.2 Alquilbenzenos Lineares (LABs)

Os níveis de LABs foram quantificados em amostras de sedimento e de ostra *C. gigas* dos diferentes locais de estudo. Concentrações de LABs significativas foram encontradas apenas no sedimento coletado no local contaminado, com um total de 36,39 ng g<sup>-1</sup>, variando entre 1,01 e 5,96 ng g<sup>-1</sup> (Figura 13). Nos locais 1 e 2 não foram detectadas níveis de LABs.

Nas amostras de ostras *C. gigas* foi detectado a presença destes contaminantes em todos os locais de estudo. Entretanto, o local mais contaminado com uma concentração total de 531 ng g<sup>-1</sup>, foi o Rio Bücheler (Figura 14). Importante destacar que os níveis de LABs observados nas ostras dos locais 1 e 2 (cerca de 150 ng.g<sup>-1</sup>) refletem possivelmente os valores iniciais da exposição dos animais coletados na Praia do Sambaqui pois estes foram transplantados deste local para as demais áreas de estudo. Assim, após 14 dias de exposição, os animais do Rio Bücheler bioacumularam mais de 520 ng.g-1 de LABs, o que indica uma taxa de bioacumulação diária de cerca de 25 ng.g-1, evidenciando uma alta exposição a estes compostos e comprovando a contaminação por esgoto sanitário no Rio Bücheler.



**Figura 13:** Níveis de Alquilbenzeno Lineares (LABs) em amostras de sedimento. **Bucheler:** Rio Bücheler (Local contaminado), **Forte:** Praia do Forte (Local 1); **Ribeirão:** Ribeirão da Ilha (Local 2).



**Figura 14.** Níveis de Alquilbenzeno Lineares (LABs) em amostras de ostra *Crassostrea gigas*. **Bucheler:** Rio Bücheler (Local contaminado), **Forte:** Praia do Forte (Local 1); **Ribeirão:** Ribeirão da Ilha (Local 2).

### **4.8.3 Bifenilos Policlorados**

Os locais de estudo não apresentaram concentrações significativas de PCB em amostras de sedimento e de ostras *C. gigas*. Todos foram abaixo do limite de detecção do método.

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 Respostas transcricionais de *CYP* das ostras expostas

No período de 17 a 30 de novembro de 2011, foram realizadas quatro coletas de ostras *C. gigas* expostas a um local contaminado por esgoto sanitário (Rio Bücheler) e dois locais de cultivo (Local 1: Praia do Forte; Local 2: Ribeirão da Ilha).

Através de análise por qPCR foram observadas respostas diferenciadas entre os níveis de transcritos gênicos de diferentes isoformas de *CYP* em amostras de glândula digestiva após 1, 2, 7 e 14 dias de exposição.

Após 2 e 14 dias de exposição o gene *CYP356A2* apresentou um aumento significativo nos níveis de transcritos gênicos em relação ao local 1, mas nos períodos de 1 e 7 dias não foi observada esta alteração (Figura 8A). Por outro lado, os animais mantidos por 1 dia no local contaminado apresentaram um aumento significativo de cerca de 17 vezes na transcrição de *CYP356A2* nas brânquias, em relação aos animais mantidos ambos locais referência (Figura 9A). Assim como na glândula digestiva, não foram verificadas alterações na transcrição deste gene no manto, no músculo e nos palpos labiais das ostras expostas por 1 dia nos diferentes locais (Figura 9A). Resultados similares foram observados por Toledo-Silva (2008) que não observou alterações na transcrição do gene *CYP356A1* na glândula digestiva de ostras *C. gigas* expostas por 1, 2, 7 e 14 dias na Foz do Rio Bucheler. Hamza-Chaffai e colaboradores (2000) sugerem que a glândula digestiva apresente uma resposta transcricional

tardia, comparada a outros tecidos, uma vez que neste órgão especificamente os efeitos oriundos de diferentes fontes de poluição, desencadeiam respostas a longo prazo (crônico).

Neste estudo, a resposta de *CYP356A2* em glândula digestiva foi observada apenas após 2 dias de exposição, possivelmente associada ao maior tempo de exposição aos xenobióticos (Figuras 11 a 14) (HAMZA-CHAFFAI et al., 2000; KRUSEKOP et al., 2003). Possivelmente a maior transcrição observada nas brânquias dos animais expostos por 1 dia esteja relacionada ao fato deste tecido estar em contato direto com os contaminantes presentes na água induzindo uma resposta imediata.

Considerando que *CYP356A2* é próximo à sub-famílias *CYP1B* e *CYP1C* de vertebrados, era de se esperar de fato um aumento de sua transcrição pela exposição a HPAs, uma vez que estas sub-famílias, juntamente com *CYP1A* tem sido mostradas como genes classicamente induzidos por diferentes contaminantes ambientais, particularmente HPAs (PAYNE et al., 1976; BUCHELLI; FENT, 1995; BAINY et al., 1999; LAMBERT et al., 2006; JÖNSSON et al., 2010). Também foi observada a indução de *CYP1A* em cultura celular de fibroblasto, derivado do fígado de truta arco-íris, coletadas no Rio Tietê em São Paulo, um local extremamente contaminado por esgoto sanitário (ROCHA et al., 2010), enfatizando a ação responsiva deste gene a contaminantes presentes em esgoto. Mais recentemente, Dorrington e colaboradores (2012) observaram um aumento nos níveis transcricionais de *CYP1A*, *CYP1B* e *CYP1C* em peixes *Poecilia vivipara* mantidos em um manguezal contaminado por esgoto sanitário.

A grande maioria dos trabalhos relacionados a biotransformação de xenobióticos em organismos aquáticos pelo *CYP1* são realizados em

peixes. Em moluscos, principalmente em ostra *Crassostrea gigas*, a relação xenobiótico/*CYP1* ainda necessita de estudos mais específicos para se compreender seu mecanismo de ação, regulação e efeitos de ativadores e repressores.

Um transcriptoma realizado em amostras de tecidos de ostras do mangue da espécie *Crassostrea brasiliiana* expostas a fenantreno, esgoto doméstico e fração acomodada em óleo diesel identificou 41 seqüências relacionadas ao *CYP*, dentre eles destaca-se genes relacionados à sub-família *CYP1* (LÜCHMANN, 2012).

Em humanos, *CYP1A1* é uma importante enzima de biotransformação de xenobióticos, principalmente no rim e no fígado, sendo induzidos na presença de nefrotoxinas, produtos químicos, agentes microbianos utilizados em produtos de higiene pessoal, que causam dano celular em função do estresse oxidativo, bem como podem interagir com células cancerígenas (SIDDARTH et al., 2013 ; TARNOW et al., 2013).

Neste estudo, o gene *CYP2AU2* foi o mais responsivo nos animais mantidos no local contaminado (Figura 8B). Comparado aos animais mantidos no local referência 1 (Praia do Forte), os níveis de *CYP2AU2* foram significativamente maiores nas amostras obtidas nos dias 1, 7 e 14 dias, sendo que a maior diferença foi observada após 1 dia de exposição. Interessante observar que após 2 dias de exposição, os níveis de *CYP2AU2* foram menores nos animais do local referência 2 (Ribeirão da Ilha) e após 14 dias de exposição estes níveis estavam bem elevados, em relação aos animais mantidos no local 1. Não está claro que fator seria responsável pelo aumento observado nos níveis de *CYP2AU2* na glândula digestiva das ostras do local referência 2 após 14 dias de exposição, uma vez que não foram verificados níveis detectáveis de HPAs nas ostras

mantidas nestes locais, apesar de terem sido detectados níveis de HPAs totais no sedimento no local 1 de  $6,20\text{ng g}^{-1}$ , e no local 2 de  $27,5\text{ng g}^{-1}$ . As ostras de ambos os locais referência apresentaram níveis semelhantes de LABs em torno de  $150\text{ ng g}^{-1}$ , provavelmente refletindo os níveis previamente bioacumulados no local original de cultivo na Praia do Sambaqui. Quando os animais foram transplantados para o local contaminado, estes níveis foram aumentados para cerca de  $520\text{ ng g}^{-1}$  evidenciando que os animais foram expostos a efluentes contendo esgoto sanitário.

Interessante ressaltar que os níveis de transcrição de *CYP2AU2* foram significativamente maiores em todos os tecidos de *C. gigas* expostas por 1 dia no local contaminado, comparados aos dos animais mantidos em ambos locais referência (Figura 9B). Particularmente o manto foi o tecido que apresentou o maior aumento de transcrição nestes animais (cerca de 7 vezes), o que sugere um envolvimento desta isoforma com alterações relacionadas ao metabolismo de esteróides. Se isto for correto, pode-se hipotetizar que a exposição aos contaminantes presentes no esgoto ou outro fator não quantificado neste estudo, induzam uma resposta transcricional mais significativa a curto prazo neste gene causando distúrbios metabólicos nos animais. Neste estudo não foram avaliados os níveis transcricionais deste gene em outros tecidos, além da glândula digestiva, em períodos de exposições mais prolongados. Pelo perfil observado neste tecido (Figura 8B), observa-se que a longo prazo, esta resposta não é tão marcante, indicando ou a presença de estratégias adaptativas dos animais a esta condição estressante, ou que possivelmente estava ocorrendo a síntese da proteína em níveis adequados para atender a demanda celular em períodos maiores de exposição dos animais.

Um estudo realizado por Dheilly e colaboradores (2011) identificou que os tecidos de ostras *C. gigas* apresentam níveis diferenciais de transcrição gênica, e propõe que esta resposta possa estar associada ao fato de que cada tecido bioacumula quantidade de contaminantes diferentes (brânquia 47%, manto 26%, músculo adutor 5%, glândula digestiva 6% e palpo labial 16%) (BUSTAMANTE et al., 2012).

Estudos realizados com peixes *Gobiocypris rarus* identificaram a presença de membros da família *CYP2* como sendo responsivos a presença de benzo-a-pireno após 12 dias de exposição, sugerindo que este gene pode estar relacionando com a desintoxicação, tornando-se um biomarcador em potencial (YUAN et al., 2013).

Genes pertencentes a família *CYP2* foram recentemente relatados por Zanette e colaboradores (2010) como estarem envolvidos na defesa contra poluentes tóxicos em moluscos bivalves. Lüchmann e colaboradores (2012) encontraram uma alta indução de transcritos gênicos de *CYP2AU1* em *Crassostrea brasiliana* a partir da exposição desses animais a esgoto sanitário e a diesel. Estes resultados colaboram com o encontrado por Kubota e colaboradores (2011) e o relatado no presente estudo, sugerindo que este gene também atua possivelmente na biotransformação de xenobióticos.

Diferentemente do *CYP2AU2*, o gene *CYP30C1*, que está classificado evolutivamente próximo à subfamília *CYP3*, apresentou diferença na glândula digestiva somente após dois dias de exposição entre os animais mantidos no local contaminado e o local Referência 2 (Ribeirão da Ilha) (Figura 8C). No entanto, analisando os níveis de transcritos deste gene nos diferentes tecidos dos animais mantidos por 1 dia nos diferentes locais, observamos que justamente a glândula digestiva



foi o único tecido que não apresentou alterações em sua transcrição (Figura 9C). Novamente, a maior resposta de indução na transcrição de *CYP30C1* foi observada no manto dos animais mantidos no local contaminado, em relação aos animais mantidos nos locais referência (Figura 9C), sugerindo também um possível envolvimento deste gene no metabolismo de esteróides. Genes *CYP3* estão envolvidos na oxidação do maior leque de substratos, e apresentam um papel importante no metabolismo de xenobióticos (NELSON, 2009). São as principais enzimas envolvidas no metabolismo e biotransformação de drogas, em que cerca de 75% dos medicamentos são metabolizados pelo *CYP3* (GUENGERICH, 2008).

Recentemente foi relatado que *CYP3A4*, *CYP3A5*, *CYP3A7* e *CYP3A43* estão envolvidos no metabolismo de eicosanóides, esteróides sexuais, 60% ou mais no metabolismo de medicamentos utilizados clinicamente, e produtos químicos, em humanos (NEBERT; WIKVALL; MILLER, 2013). Isoformas de *CYP3* fornecem uma ampla defesa bioquímica contra poluentes e bioacumulação de compostos lipofílicos por modificações químicas ou degradação (MCARTHUN et al, 2003). Neste trabalho não foram realizadas análises da presença de fármacos nas ostras e no sedimento, porém sabe-se que no esgoto sanitário podem ser detectados uma variedade de compostos farmacêuticos, colaborando com essa indução, bem como a presença de HPAs e LABs encontrados em quantidades significativas em ostras *C. gigas* (Figuras 12 e 14).

Mexilhões *Mytilus galloprovincialis* expostos a sedimento contaminado por uma complexa mistura de HPAs e metais traço, apresentaram um aumento na transcrição de 4,7 vezes do gene *CYP3A1* (GIULIANI et al., 2013). A maioria dos trabalhos citados na literatura é

referente aos efeitos de *CYP3* frente a drogas e xenobióticos em humanos, peixes e crustáceos, deixando um leque de informações sobre moluscos bivalves a serem interpretadas (LEWIS et al., 2003; DAVID et al., 2012; MORIYA et al., 2012; ROUIMI et al., 2012; JOHNSON et al., 2013).

A transcrição do gene *CYP3071A1* na glândula digestiva das ostras *C. gigas* não apresentou um padrão de resposta temporal que pudesse ser relacionada com o grau de contaminação dos locais de exposição (Figura 8E). Após 1, 2 e 14 dias de exposição foi observado um aumento nos níveis de *CYP3071A1* na glândula digestiva dos animais mantidos no local contaminado em relação aos animais do local referência 1. No entanto, os animais expostos por 2 e 14 dias no local referência 2 também apresentaram níveis elevados de transcrição deste gene. Já no período de 7 dias, que coincidiu com a data em que houve maior incidência de precipitação pluviométrica, foi observada uma diminuição na transcrição deste gene nos animais do local referência 2 e local contaminado (Tabela 4). Assim, é possível que fatores, tais como o sexo, estágio de maturação gonadal, entre outros, não identificados neste estudo estejam relacionados com as respostas observadas na transcrição deste gene.

O gene *CYP3071A1* está agrupado com genes pertencentes à subfamília *CYP17* e também próximo a família *CYP1* (Figura 7). Em humanos *CYP17* é responsável pela biossíntese de hormônios esteróides e andrógenos (NAKAJINS et al., 1981; TOWNSLEY; BRODIE, 1986; KATAGIR et al., 1986; LEEROBICHAUD, 1997; FERNANDES; PORTE, 2013).

Genes da família *CYP17* estão relacionados também com a metabolização de endobióticos e desreguladores endócrinos (HALM et al., 2003; PURNAPATRE et al., 2008). Alguns efeitos, tais como

diminuição na eclosão de ovos de pássaros, peixes e tartarugas; feminização de peixes machos; problemas no sistema reprodutivo em peixes, répteis, pássaros e mamíferos e, alterações no sistema imunológico de mamíferos marinhos, estão associadas à exposição aos desreguladores endócrinos (BILAD; DEZOTI, 2007; DODDS; LAWSON, 1938; DODDS; LAWSON, 1936).

Novos trabalhos relacionados a este gene serão fundamentais para elucidar sua ação nos diferentes organismos, bem como na presença de contaminantes, uma vez que apenas poucos membros da família de *CYP17* foram encontrado em peixes (ZHOU et al., 2007), e invertebrados (NELSON, 2009; GOLDSTONE et al., 2006). Recentemente foi identificado também em Vieiras (*Chlamys farreri*) (GUO et al., 2013).

Peixes *Cyprinus carpio* expostos a naftaleno, fenantreno, pireno e criseno não apresentaram alterações na transcrição de *CYP17* em ovários (FERNANDES; PORTES, 2013). Fernandes e colaboradores (2007) observaram a inibição na transcrição do gene *CYP17* em carpas expostas a metabólitos de HPA, como 9-hidroxifenantreno. Este metabólito, apresentou uma ação inibitória de *CYP17* em carpa, maior do que as dos medicamentos anti-depressivos, fluoxetina, fluvoxamine (FERNANDES; SCHNELL; PORTE, 2011), galaxolide tonalide (SCHNELL et al., 2009), e fungicidas, (ANKLEY et al, 2005; HINFRAY et al., 2006). A presença de surfactantes industriais mesmo que em baixas concentrações (DU et al., 2013), almiscares sintéticos utilizados em cosméticos, detergentes e sabões (SCHNELL et al., 2009) também inibiram a transcrição de *CYP17* em peixes.

Assim como os demais genes de *CYP*, muitos estão sendo realizados para a caracterização da regulação do *CYP17* em peixes (HARVEY;

EVERETT, 2003; ZHANG et al., 2008; BIALES et al., 2011; DIOTEL et al., 2011; DU et al., 2013; FERNANDES; PORTE, 2013), enfatizando ainda mais a importância de se buscar entender os mecanismos de regulação do gene *CYP3071A1* em moluscos bivalves.

A família do gene *CYP26* desempenha um importante papel na degradação de ácido retinóico (AR) (SAKAI et al., 2001). A sinalização pelo AR e seus derivados, é responsável pelo controle de várias funções, por exemplo: crescimento e diferenciação celular, formação da retina, desenvolvimento cardíaco e também relacionado a várias patologias (MCGRANE, 2007). O AR está envolvido com a sinalização celular associada a transcrição de outros genes e portanto, sua concentração é controlada por enzimas envolvidas na sua síntese e degradação, pelas enzimas aldeído desidrogenase ALDH e CYP26, respectivamente (MCGRANE, 2007; ZIOUZENKOUA; PLUTZKY, 2008).

O mecanismo de sinalização celular por AR envolve receptores nucleares, tais como o RARs (receptor do ácido retinóico) que estão envolvidos com o controle da transcrição gênica (CAÑESTRO et al., 2006). O RAR forma um heterodímero com RXR, agindo como fatores de transcrição de diferentes genes (PARK et al., 1999; ALTUCCI et al., 2001; LAI et al., 2003; BLOMHOFF; BLOMHOFF, 2006).

O AR é degradado a metabólitos parcialmente ativos ou inativos, pelas enzimas CYP26A, B e C, e são essenciais para a produção de 4-hidróxi-ácido retinóico e 4-oxo-ácido retinóico, produtos de degradação inativos do AR (PERLMANN et al., 1993).

O AR exerce um efeito regulador sobre a expressão do gene *CYP26*. A redução da disponibilidade de AR reduz significativamente a

expressão do *CYP26*, enquanto o excesso induz o aumento da expressão (SWINDELL et al., 1999; RAY et al., 1997; REIJNTJES et al., 2004).

AR é obtido a partir da vitamina A nos organismos vivos e auxilia na proteção das células contra um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio e na prevenção do estabelecimento de danos celulares (GUERR; EVANS; MAXWELL 2004; MCGRANE, 2007).

A transcrição do gene *CYP26F1* na glândula digestiva das ostras mantidas nos diferentes locais não apresentou um padrão de resposta temporal homogêneo (Figura 8F). Após 1 dia de exposição foi observada uma diminuição na transcrição deste gene nos animais mantidos no local contaminado e no local referência 2 (Figura 8F). Estes últimos também apresentaram uma baixa transcrição de *CYP26F1* após 2 e 14 dias de exposição. Já o grupo que permaneceu 7 dias neste local apresentou uma maior transcrição deste gene. Os animais mantidos no local contaminado apresentaram uma transcrição de *CYP26F1* maior apenas nos animais mantidos por 2 e 14 dias no local contaminado, quando comparados aos animais do local referência 2 (Figura 8F). De que maneira estas alterações estão refletindo em modificações dos níveis de AR nestes animais não está claro. Na verdade, para poder elucidar questões relacionadas com o metabolismo do AR nas ostras é necessário fazer a expressão heteróloga desta proteína, purificá-la e realizar testes para confirmar a função desta isoforma nesta espécie. Contudo o que pode-se perceber é que não houve uma relação clara entre um aumento na transcrição deste gene na glândula digestiva das ostras com o tempo de exposição ao local contaminado. Muitas perguntas relacionadas ao *CYP26F1* de modo geral, e sua função em bivalves permanecem para serem esclarecidas.

Nenhuma alteração nos níveis transcricionais de *CYP3072A1* foram observadas na glândula digestiva das ostras expostas nos locais referência e contaminados nos diferentes períodos de exposição (Figura 8D). Filogeneticamente o gene *CYP3072A1* está agrupado com a sub-família *CYP10* de outros invertebrados e segundo Dr. David Nelson está classificado dentro do *CYP* Clan Mito (comunicação pessoal), sendo portanto uma isoforma possivelmente expressa nas mitocôndrias. Teunissen e colaboradores (1992) identificaram o primeiro gene *CYP10* no molusco *Lymnaea stagnalis*, e observaram que sua transcrição era concentrada abundantemente nos corpos dorsais produtores de hormônio gonadotrópico feminino. porém até o presente momento, não se tem bem caracterizada a função do *CYP3072A1*, sendo este, o primeiro trabalho que relaciona este gene em moluscos bivalves, e sua possível resposta a xenobióticos apresentando apenas níveis basais de transcritos gênicos.

Este é o segundo trabalho realizado com análise de diferentes genes de CYP em diferentes tecidos de bivalves (ZANETE et al., 2013). Com estes resultados podemos sugerir que múltiplos genes são responsivos a exposição ao esgoto sanitário em proporções diferentes e que o tempo de exposição pode influenciar a resposta na indução da expressão gênica, assim como a reação do tecido alvo.

## **5.2 Níveis de contaminantes detectados nos locais de estudo e nos animais expostos**

Amostras coletadas no local contaminado por esgoto sanitário, apresentaram concentrações de 213 ng g<sup>-1</sup> e 688 ng g<sup>-1</sup> de HPA total em sedimento e ostras, respectivamente.

Concentrações de HPAs totais com valores superiores a 500 ng g<sup>-1</sup> são sugeridos como indicador de local contaminado, enquanto um sedimento moderadamente poluído apresenta concentrações entre 250 ng g<sup>-1</sup> e 500 ng g<sup>-1</sup> (NOTAR et al., 2001). Como esperado, o local contaminado apresentou maior concentração de poluentes, porém abaixo dos níveis de risco como os encontrados por Li e colaboradores (2010) na China, onde os valores variaram de 203,7 ng g<sup>-1</sup> a 1590,5 ng g<sup>-1</sup> com um valor médio de 670,0ng g<sup>-1</sup> é considerado altamente contaminado. Resultado similar foi encontrado por Ramdine e colaboradores (2012) com uma variação de 49-1065ng g<sup>-1</sup> em amostras de sedimento.

Mesmo os valores de contaminantes terem sido mais baixos do que em outros trabalhos, o sedimento pode ser uma fonte difusa de contaminantes na coluna d'água, uma vez que estes contaminantes podem ser disponibilizados sob algumas condições ambientais (BURTON, 1991).

Durante os dias de exposição deste estudo, foi observado a presença de ventos forte e chuva no sétimo dia. Estes fatores ambientais podem estar colaborando para a indução de alguns genes no décimo quarto dia, uma vez que observado na Figura9 a indução de alguns genes no primeiro dia, uma estabilização desses transcritos no sétimo e uma indução no décimo quarto, sugerindo a movimentação do sedimento, a

redistribuição de contaminantes na coluna de água, bem como, uma possível diluição destes.

Já as concentrações de hidrocarbonetos nas amostras de ostras *C.gigas*, foram detectadas apenas nas amostras expostas no Rio Bücheler com um total de 688 ng g<sup>-1</sup>. Este valor foi superior aos valores encontrados por Nunes (2008) e Zanette (2009), que realizaram análise neste mesmo local e encontraram 249 ng g<sup>-1</sup> e 382 ng g<sup>-1</sup> respectivamente em amostras de ostras. Importante destacar que estes níveis detectados foram bioacumulados somente durante os 14 dias de exposição, uma vez que os animais referência não apresentaram níveis detectados. Este resultado é de certa forma alarmante, uma vez que se considerarmos um período de exposição prolongado, estes níveis poderão ser muito superiores e impróprios para consumo humano.

Concentrações de 66 ng g<sup>-1</sup> a 96 ng g<sup>-1</sup>, também foram encontradas em ostras coletadas na ilha de Guadalupe, enfatizando que mesmo em concentrações pequenas, esses contaminantes causam estresse em organismos marinhos (RAMDINE et al., 2012).

A alta biocumulação de HPA nas ostras *C.gigas*, suportam os resultados encontrado via q-PCR, sugerindo que estes contaminantes, afetam direta e/ou indiretamente a transcrição gênica.

As concentrações de LABs foram encontradas apenas no sedimento coletado no Rio Bücheler, com um total de 36,39 ng g<sup>-1</sup>. Nosso estudo apresentou valores semelhantes ao encontrado em regiões costeiras de mar aberto (MACIAS-ZONARA; RAMIREZ, 2004), porém muito menor que os relatados anos antes, com um total de 352,3 ng g<sup>-1</sup> (NUNES, 2008).



A pequena concentração de LAB encontrada em sedimento, pode ser explicada pelo período de chuvas e ventos fortes. Os LAB são adsorvidos por partículas de baixa densidade, e podem ser transportados por grandes distâncias (TAKADA et al., 1992), tornando sua sedimentação menor.

Entretanto, foram detectados níveis de LABs nas amostras de ostras de todos os locais de estudo. O local mais contaminado com uma concentração total de  $531 \text{ ng g}^{-1}$ , foi o Rio Bücheler, o que já se esperava, sendo este valor, maior que o encontrado por Zanette (2009) ( $383 \text{ ng g}^{-1}$ ), e Nunes (2008) ( $354 \text{ ng g}^{-1}$ ), neste mesmo local.

Todas as amostras coletadas no local contaminado e de cultivo não apresentaram quantidades significativas de PCBs, diferentemente do relatado por Nunes (2008), que detectou níveis de  $38,60 \text{ ng g}^{-1}$ . Zanette (2009) também relatou a presença de PCBs em amostras coletadas no Rio Bücheler, porém com uma concentração bem inferior  $3,6 \text{ ng g}^{-1}$ .

## 6 CONCLUSÕES

- Um aumento significativo dos níveis de HPAs e LABs foi observado nos tecidos de ostras *C. gigas* expostas *in situ*, durante 14 dias, em um local contaminado por efluentes sanitários.

- Níveis mais elevados de transcrição do gene *CYP356A2* foram observados nas brânquias das ostras mantidas por 1 dia no local contaminado, enquanto que na glândula digestiva esta resposta ocorreu somente após 2 dias.

- Entre os seis genes *CYP* analisados nos animais expostos no local contaminado, *CYP2AU2* e *CYP30C1* foram os que apresentaram os resultados mais consistentes se tornam fortes candidatos como biomarcadores de exposição das ostras para avaliar ambientes contaminados por esgoto sanitário.

- Os genes *CYP3072A1*, *CYP3071A1* e *CYP26F1* não apresentaram um padrão de resposta temporal relacionado com o grau de contaminação do ambiente, apesar de terem sido observadas eventuais diferenças em suas transcrições, dependendo do gene, tempo de exposição e do local onde os animais foram expostos.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, M, Biological Indicators of Aquatic Ecosystem stress, **Maryland: Americam Fisheries Society Bethesda, USA. 2002.**

ALTUCCI, L *et al.*, Retinoic acid-induced apoptosis in leukemia cells is mediated by paracrine action of tumor-selective death ligand TRAIL, **Nature Medicine**, v. 7, n. 6, p. 680-686, 2001.

AMIARD, J C *et al*, Metallothioneins in aquatic invertebrates their role in metal detoxification and their use as biomarkers, **Aquatic Toxicology**, v. 76, n. 2, p. 160–202, 2006.

AMORIM, L C A, Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação de exposição aos genes químicos ambientais. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 6, n. 2, p. 1-13, 2003.

ANANDRAJ, A *et al*, Metal accumulation, filtration and O<sub>2</sub> uptake rates in the mussel *Perna perna* (Mollusca: Bivalvia) exposed to Hg<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup>, **Comparative Biochemistry Physiology Part C**, v. 132, n. 3, p. 355-363, 2002.

ANKLEY, G T *et al*, Effects of two fungicides with multiple modes of action on reproductive endocrine function in the fathead minnow (*Pimephales promelas*), **Toxicological Sciences** , v. 86, n. 2, p. 300-308, 2005.

BARNABÉ, G, **Bases biológicas y ecológicas de la Acuicultura**, Edotirial Acribia, Zaragoza, 519 f. 1996.

BAINY, A C D *et al*, Elevated levels of multiple cytochrome P450 forms in tilápia from Billing Reservoir –São Paulo, Brazil, **Aquatic Toxicology**, v. 44, n.4, p. 289-305, 1999.

BEIRÃO, H; TEIXEIRA, E; MEINERT, E. M, *Processamento e industrialização de moluscos. In: Seminário e workshop de tecnologias para aproveitamento integral do pescado. Campinas. Anais Campinas: ITAL, p. 38-84, 2000.*

BIALES, A D *et al*, Proteomic analysis of zebrafish brain tissue following exposure to the pesticide prochloraz, **Aquatic Toxicology**, v. 105, n.3-4, p.618-628, 2011.

BÍCEGO, M C, *Alguns aspectos sobre a degradação fotoquímica e a deterioração de hidrocarbonetos de petróleo no ambiente marinho*. Tese (Doutorado) – Instituto de Química da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.

BILAD, M; DEZOTI, M, Desreguladores endócrinos no meio ambiente, efeitos e consequências, **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 651–666, 2007.

BLOMHOFF, R; BLOMHOFF, H K, Overview of retinoid metabolism and function, **Journal of Neurobiology**, v. 66, n.7, p. 606-630, 2006.

BOUTET, I; TANGUY, A; MORAGA, D, Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hydrocarbon contamination under experimental conditions, **Gene**, v. 329, n. 21, p. 147-157, 2004.

BOOTH, J D, Studies on twelve common bivalve larvae and bivalve spawning seasons, **New Zealand Journal of Marine Freshwater Research**, v. 17, p. 231-265, 1983.

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

BURTON, G A, Assessing the toxicity of fresh water sediments, **Environmental Toxicology Chemistry**, v. 10, n. 12, p. 1585 – 1627, 1991.

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

BUSTAMANTE, P; MIRAMAND, P, Evaluation of the variegated scallop *Chlamys varia* as a biomonitor of temporal trends of Cd, Cu, and Zn in the field, **Environment Pollution**, v. 138, n. 1, p. 109-120, 2005.

CAJARAVILLE, M P *et al*, The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: A practical approach, **Science of the Total Environment**, v. 247, n. 2-3, p. 295-311, 2000.

CAÑESTRO, C J H *et al*, Is retinoic acid genetic machinery a chordate innovation? **Evolution & Development**. v. 8, n. 5, p. 394–406, 2006.

CHEN, J S; BERENBAUM, M R; SCHULER, M A, Amino acids in SRS1 and SRS6 are critical for furanocoumarin metabolism by CYP6B1v1, a cytochrome P450 monooxygenase, **Insect Molecular Biology**, v.11, n. 2, p. 175-186, 2002.

CHOI, H J *et al*, Cadmium bioaccumulation and detoxification in the gill and digestive gland of the Antarctic bivalve *Laternula elliptica*, **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 145, n. 2, p. 227–235, 2007.

COAN, E V *et al*, Bivalve Seashells of Western North America - Marine Bivalve Mollusks from Arctic Alaska to Baja California, **Santa Barbara Museum of Natural History**, v. 2, p. 9-40, 2000.

COELHO, C *et al*. Hepatitis A virus detection in oysters *Crassostrea gigas* in Santa Catarina, Brazil, by RT-PCR, **Journal of Food Protection**, v. 66, n. 3, p. 507-511, 2003.

COMISSÃO NACIONAL INDEPENDENTE SOBRE OS OCEANOS, **O Brasil e o Mar no Século XXI: Relatório aos Tomadores de Decisões do País**, Rio de Janeiro, 1998.

CONDE, F J *et al*, Optimization of a sampling method to determine polycyclic aromatic hydrocarbons in smoke from incomplet biomass combustion, **Analytica Chimica Acta**, v. 524, pg. 872–294, 2004.

CUNNINGHAM, P A, The use of bivalve mollusks in heavy metal pollution research. In: VERNBERG, W C; CALABRESE, A *et al* (ed.) Marine pollution: functional responses, **Academic Press Inc**, p. 183-221, 1979.

DAVID, E *et al*, Responses of Pacific oyster *Crassostrea gigas* populations to abiotic stress in environmentally contrasted estuaries along the Atlantic coast of France, **Aquatic Toxicology**, v. 109, p. 70-79, 2012.

DHEILLY, N M *et al*, Development of a Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) 31,918-feature microarray: Identification of reference genes and tissue-enriched expression patterns, **BMC Genomics**, v. 12, n. 468, p. 1-16, 2011.

DIOTEL, N *et al*, The brain of teleost fish, a source, and a target of sexual steroids, **Frontiers in Neuroscience**, n. 5, n. 137, p. 1-12, 2011.

DODDS, E C; LAWSON, W, Proceedings of the Royal Society of London, Series B, **Biological Sciences**, v. 125, p. 222-232, 1938.

DODDS, E C; LAWSON, W, Synthetic strogenic Agents without the Phenanthrene Nucleus, **Nature**, v. 137, p. 996-996, 1936.

DONAGHY, L *et al*, Reactive Oxygen Species in Unstimulated Hemocytes of the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*: A Mitochondrial Involvement, **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, p. 1-6, 2012.

DORRINGTON *et al*, Basal and 3-methylcholanthrene-induced expression of cytochrome P450 1A, 1B and 1C genes in the Brazilian guppy, *Poecilia vivipara*, **Aquatic Toxicology**, v. 124-125, p. 106-113, 2012.

DU, G *et al*, Perfluorooctane sulfonate (PFOS) affects hormone receptor activity, steroidogenesis, and expression of endocrine-related genes in vitro and in vivo, **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 32, n. 2, p. 353-360, 2013.

DURST, F *et al*, Function and diversity of plant cytochrome P450, **John Libbey Eurotext**, p. 23-30, 1993.

EDGES, K T S *et al*, Indicators of environmental stress cellular biomarkers and reproductive responses in the Sydney rock oyster (*Saccostrea glomerata*), **Ecotoxicology**, v. 21, n. 5, p. 1415-1425, 2012.

EPAGRI – Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina S.A. Síntese Informativa da Marinha, p. 1-9, 2012.

EWING, B; GREEN, P, Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities, **Genome Research**, v.8, n.3, p.186-94. 1998.

EWING, B *et al*, Base-calling of automated sequencer traces using phred I. Accuracy assessment, **Genome Research**, v.8, n.3, p.175-85. 1998.

FELSENSTEIN, J, Confidence limits on phylogenies: Na approach using the bootstrap, **Evolution**, v. 39, n. 4, p. 783-791, 1985.

FERNANDES, D, SCHNELL, S, PORTE, C, Can pharmaceuticals interfere with the synthesis of active androgens in male fish? An in vitro study, **Marine Pollution Bulletin** , v. 62, n. 10, p. 2250-2253, 2011.

FERNANDES, D; BEBIANNO, M J; PORTES, C, Mitochondrial metabolismo f 17 $\alpha$ -hydroxy progesterone in male sea bass (*Dicentrarchus labrax*): a potential target for endrocrine disruptors, **Aquatic Toxicology**, v. 85, n. 4, p. 258-266, 2007.

FERNANDES, D; PORTE, C, Hydroxylated PAHs alter the synthesis of androgens and estrogens in subcellular fractions of carp gonads, **Science of the Total Environment**, v. 447, p. 152-159, 2013.

FERNANDEZ, M P *et al*, Spatial variation in hepatic levels and patterns of PCBs and PCDD/Fs among Young – of-the- year and adult Athantic Tomcod River Estuary, **Environmental Science Technology**, v. 38, n. 4, p. 976–983, 2004.

GEO BRASIL, O estado do meio ambiente no Brasil, **Panorama Ambiental Global. PNNMA** , p. 118–131, 2002.

GEO BRASIL, Resumo para Formadores de Políticas Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente, **Panorama Ambiental Global. PNNMA**, p. 6–18, 2012.

GIULIANI, M E *et al*, Transcriptional and catalytic responses of antioxidant and biotransformation pathways in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to chemical mixtures, **Aquatic Toxicology**, v. 134–135, n. 0, p. 120-127, 2013.

GODOI, A F *et al*, Fast chromatographic determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in aerosol samples from sugar cane burning, **Journal of Chromatography A**, v. 1027, n. 1-2, p. 49–53, 2004.

GOLDSTONE, J V *et al*, The chemical defensome: Environmental sensing and response genes in the Strongy *locentrotus purpuratus* genome, **Developmental Biology**, v. 300, n. 1, p. 366-384, 2006.

GRIMMER, G, Environmental carcinogens polycyclic aromatic hydrocarbons: chemistry occurrence, biochemistry, carcinogenicity, **CRC Press**, 1983.

GUENGERICH, F D, Cytochrome P450 and chemical toxicology, **Chemical Research Toxicology**, v. 21, n. 1, p. 7–83, 2008.

GUENGERICH, F P, Cytochrome P450 and other enzymes in drug metabolism and toxicity, **The AAPS Journal**, v. 8, n. 1, p. 101–111, 2006.

GUERRA, M M P; EVANS, G; MAXWELL, W M C, Papel de oxidantes e antioxidantes na anã drologia: Revisão de literatura, **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.28, p.187-195, 2004.

GUNTHER, A J *et al*, Long-term bioaccumulation monitoring with transplanted bivalves in the San Francisco Estuary, **Marine Pollution Bulletin**, v. 38, n. 3, p. 170-181, 1999.

GUO, H *et al*, Identification of Cytochrome P450 (CYP) genes in Zhikong scallop (*Chlamys farreri*), **Journal of Ocean University of China**, v. 12, n. 1, p. 97-102, 2013.

HAIGH, S D, A, Review of the interaction of surfactants with organic contaminants in soil, **Science of the Total Environment**, v. 185, n. 1-3, p. 161–170, 1996.

HALM, A *et al*, Cloning and gene expression of P450 17 $\alpha$ -hydroxylase, 17, 20-lyase cDNA in the gonads and brain of the fished minnow *Pimephats promelas*, **General and Comparative Endocrinology**, v. 130, n. 3, p. 256–266, 2003.



HAMZA-CHAFFAI, A *et al*, The potential use of metallothionein in the clam *Ruditapes decussatus* as a biomarker of in situ metal exposure, **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 127, n. 2, p. 185-97, 2000.

HANDSCHIN C; MEYER, U A, Induction of Drug Metabolism: The Role of Nuclear Receptor. **Pharmacological Reviews**, v. 55, n.4, p. 649-673, 2003.

HARVEY,P; EVERETT, D, The adrenal cortex and steroidogenesis as cellular and molecular targets for toxicity: Critical omissions from regulatory endocrine disrupter screening strategies for human health?, **Journal of Applied Toxicology**, v. 23, n.2, p.81-87, 2003.

HAUTMANN, M, Shell morphology and phylogenetic origino f oyster, **Palaeo Geogr Palaeoclimate**, v. 240, p. 668–671, 2006.

HINFRAY, N; PORCHER, J M; BRION, F, Inhibition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) P450 aromatase activities in brain and ovarian microsomes by various environmental substances, **Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology: CBP**, v. 144, n. 3, p. 252-262, 2006.

INGELMAN, M S, Pharmacogenetics of cytochrome P450 and its applications in drug therapy: the past, present and future, **Trends in Pharmacological Sciences**, v.25, n. 4, p. 193–200, 2004.

IPCS – (International Programe on Chemical Safety). **Environmental Health Criteria 140, Polychorinated Biphenyls and Terphenyls**, second Edition, World Health Organization, 1993.

ISHIWATARI, R *et al*, Alkylbenzene polution of Tokyo Bay sediments. **Nature**. v. 301, p. 599–600, 1983.

JOHNSON, C H *et al*, Cytochrome P450 Regulation by  $\alpha$ -Tocopherol in Pxr-Null and PXR-Humanized Mice, **Drug Metabolism and Disposition**, v. 41 , n. 2 , p. 406-413, 2013.

JÖNSSON, M E *et al*, Induction aptterns of new CYP1 genes in environmentally exposed rainbow trout, **Aquatic Toxicology**, v. 98, n. 4, p. 311-321, 2010.

KAMMANN, U *et al*, Biological effect monitoring in dab (*Limanda limanda*) using gene transcript of CYP1A1 or EROD, A comparison, **Environmental Science and Pollution Research**, v. 15, n. 7, p. 600-605, 2008.

KATAGIR, M; KAGAWA, N; WATERMAN, M R, The role of cytochrome b5 in the biosynthesis of androgen by human P450 C17, **Archives Biochemistry Biophysics**, v. 317, n. 2, p. 343 – 347, 1995.

KEPPLER, C; GWOOD, A H, Expression of P-glycoprotein in the gills of oyster, *Crassostrea virginica* related effects, **Aquatic toxicology**, v. 54, n. 3-4, p. 195–204, 2001.

KINBROUGH, R D; JENSEN, A A, Halogenated Biphenyls, Terphenyles, Naphthalenes, Dibenzodioxins and Related Products, **Topics in Environmental Health, Elsevier**, v. 2, p. 518, 1989.

KITTIGUL, L *et al*. Development of a method for concentrating and detecting rotavirus in oysters, **International Journal of Food Microbiology. Amsterdam: Elsevier**, v. 122, n. 1-2, p. 204-210, 2007.

KRUSEKOP, F S *et al*, Time dependent transcriptional induction of CYP1A1, CYP1A2 and CYP1B1 m RNAs by H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> - ATPase inhibitors and other xenobióticos, **Xenobiótica**, v. 33, n. 2, p. 1017–1018, 2003.

KUBOTA, A *et al*, Cytochrome P450 CYP2 genes in the common cormorant: Evolutionary relationships with 130 diapsid CYP2 clan sequences and chemical effects on their expression, **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 153, n. 3, p. 280-289, 2011.

LAI, L *et al*, Retinoic acid regulates endothelial cell proliferation during vasculogenesis, **Development**, v. 130, n. 26, p. 6465-6474, 2003.

LAMBET, G H *et al*, Induced CYP1A2 activity as a phenotypic biomarker in humans highly exposed to certain PCBs/OCDFs, **Environmental Science and Technology**, v. 40, p. 990-994, 2008.

LAPÉGUE, S; BOUDRY, P; GOULLETQUER, P, Pacific cupped oyster – *Crassostrea gigas*, **Geninfect final Scientific report**, p. 76–86, 2000.

LEE, J K *et al*, Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters from Korean retail outlets, **Food Control**, v. 19, n. 10, p. 990-994, 2008.

LEEROBICHAUD, P *et al*, Interaction of human CYP17 (P450 17 alpha, 17 alpha – hydroxylase-17,20 – lyase) with cytochrome b (5) importance of the orientation of the hydrophobic domain of cytochrome b (5), **Biochemical Journal**, v. 321, n. 3, p. 857–863, 1997.

LEWIS, D F, Human cytochromes P450 associated with the phase I metabolism of drugs and other xenobiotics : a compilation of substrates and inhibitors of the CYP1, CYP2 and CYP3 families, **Current Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 19, p. 1955–1972, 2003.

LI, Q; ZHANG, X; YAN, C, Polycyclic aromatic hydrocarbon contamination of recent sediments and marine organisms from xiamen Bay, China, **Archives Environmental Contamination and Toxicology**, v. 58, n. 3, p. 711–721, 2010.

LIN, D; TU, Y; ZHU, L, Concentrations and health risk of polycyclic aromatic hydrocarbons in tea, **Food chemical Toxicology**, v. 43, n. 1, p. 41–48, 2005.

LOCATELLI, M A F, *Investigação sobre a emissão e caracterização dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) na bacia do Rio Atibaia*. Dissertação (MESTRADO), Instituto de Química do Departamento de Química da Universidade Estadual de Campinas, Instituto Química, p. 1-86, 2006.

LÜCHMANN, K H *et al*, Suppressive subtractive hybridization libraries prepared from the digestive gland of the oyster *Crassostrea brasiliana* exposed to a diesel fuel water – accommodated fraction, **Environmental Toxicology Chemical**, v. 31, n. 6, p. 1249–1253, 2012.

LÜCHMANN, K H, *Respostas Bioquímicas e moleculares em ostra do mangue, Crassostrea brasiliana, expostas a diferentes contaminantes ambientais*. Tese (Doutorado), Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

MACIAS-ZONARA, J V; RAMIREZ-ALVAREZ, N, Tracing sewage, pollution using linear alkylbenzenes (LABs) in surface sediments at the

south end of the southern California Bight, **Environmental Pollution**, v. 130, n. 2, p. 229–238, 2004.

MACLEOD, W D *et al*, Standard Analytical Procedures of the NOAA National Analytical Facility, 1985-1986. Extractable Toxic Organic Components. Second edition, **U. S. Department of Commerce, National Oceanic and Atmospheric Administration. National Marine Fisheries Service**, p. 1-127, 1986.

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

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

MARIGOMEZ, I *et al*, Cellular and subcellular distribution of metals in mollusks, **Microscopy Research and Technique**, v. 56, n. 5, p. 358–392, 2002.

MARIGOMEZ, I; LEKUBE, X; CANCIO, I, Immunochemical localisation of proliferating cells in mussel digestive gland tissue, **Histochemical Journal**, v. 31, n. 12, p. 781-788. 1999.

MARTINS, CC, *Marcadores orgânicos geoquímicos em testemunhas de sedimento do Sistema Estuarino de Santos e São Vicente, SP: um registro histórico da introdução de hidrocarbonetos no ambiente marinho*. Tese (Doutorado), Instituto Oceanográfico de Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

MATTOS, J J *et al*, Differential gene expression in *Poecilia vivipara* exposed to diesel oil water accommodated fraction, **Marine Environmental Research**, v. 69, n.1, p. 31–33, 2009.

MCARTHU, A G *et al*, Phylogenetic analysis of the cytochrome P450 3 (CYP3) gene family, **Journal Molecular Biology**, v. 57, n. 2, p. 200–221, 2003.

MCGRANE, M M, Vitamina A regulation of gene expression molecular mechanism of a prototype gene, **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 18, n. 8, p. 497–508, 2007.

MCLEOD, C *et al*, Localization of norovirus and poliovirus in Pacific oysters, **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, n. 4, p. 1220-1230, 2009.

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, 2008.

MEYER, U, Overview of enzymes of drug metabolism, **Journal of Pharmacokinetic and Biopharmaceutics**, v. 24, n. 5, p. 449–459, 1996.

MONSERRAT, J M *et al*, Pollution biomarkes in estuarine animal: critical review and new perspectives, **Comparative Biochemistry and Physiology C Toxicology & Pharmacology**, v. 146, n. 1-2, p. 221–234, 2007.

MORIYA, N *et al*, Effect of Lipopolysaccharide on the Xenobiotic-Induced Expression and Activity of Hepatic Cytochrome P450 in Mice, **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 35, n. 4, p. 473-480, 2012.

MOUNT, A S *et al*, Hemocyte – mediated Shell mineralization in the eastern oyster, **Science**, v. 304, n. 5668, p. 297–300, 2004.

NAKAJIN, S; HALL, P F; ONODA, M, Testicular microsomal cytochrome P450 for C4 steroid side chain cleavage. Spectral and binding studies, **The Journal of Biological Chemistry**, v. 256, p. 6134–6139, 1981.

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

NEBERT, D W.; KARP, C L, Endogenous Functions of the Aryl Hydrocarbon Receptor (AHR): Intersection of Cytochrome P450 1 (CYP1)-metabolized Eicosanoids and AHR Biology, **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 52, p. 36061-36065, 2008.

NEBERT, D W; FETEREISEM, R, Evolutionary argument for a connection between drug metabolism and signal transduction, **John Libbey Eurotext**, p. 3–13, 1993.

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

NEBERT, D W; WIKVALL, K; MILLER, W L, Human cytochromes P450 in health and disease, **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 368, n. 1612, 2013.

NEI, M; KUMAR, S, Molecular Evolution and Phylogenetics, **Oxford University Press**, New York, 2000.

NELSON, D R *et al*, The P450 superfamily: Update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names, and nomenclature, **DNA and Cell Biology**, v. 12, n. 1, p.1-51, 1993.

NELSON, D R, P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, and nomenclature, **Pharmacogenetics**, v.6, n. 1, p.1–42, 1996.

NELSON, D R, The Cytochrome P450 Homepage, **Human Genomics**, v. 4, p. 59-65, 2009.

NISHUGIMA, F N, *Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (PAHs) – Determinação do balanço de massa na atmosfera, água e sedimento no estuário de Santos, SP. Brasil*. Tese (Doutorado), Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

NORUM, U; LAI, V W M; CULLEN, W R, Trace element distribution during the reproductive cycle of female and male spiny and Pacific scallops, with implications for biomonitoring, **Marine Pollution Bulletin**, v. 50, n. 2, p. 175 – 184, 2005.

NOTAR, M; LESKV, H; FAGANELI, J, Composition, distribution and sorption of polycyclic aromatic hydrocarbons sediments of the Gulf of Trieste, Northern Adriatic Sea, **Marine Pollution Bulletin**, v. 42, p. 36–44, 2001.

NUNES, F F, *Avaliação in situ da contaminação e dos efeitos de efluentes domésticos sobre biomarcadores bioquímicos em ostra do pacífico Crassostrea gigas na Baía Norte da Ilha de Santa Catarina*. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós Graduação em Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina. Centro de Ciências Agrárias. p, 1-55, 2008.

OKUMURA, Y; YAMASHITA, Y; ISAGAWA, S, Concentrations of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans, non-ortho polychlorinated biphenyls in Japanese Flounder, with reference to the relationship between body length and concentration, **Journal of Environmental Monitoring**, v. 6, n. 3, p. 201–208, 2004.

OLIVEIRA NETO, F M, Diagnóstico do cultivo de moluscos em Santa Catarina. Florianópolis:EPAGRI, v. 220, p. 67., 2005.

OLIVEIRA-RIBEIRO, C A *et al*, Bioaccumulation and the effects of organochlorine pesticides PAH and heavy metals in the Eel (*Anguilla Anguilla*) at the Camargue Nature Reserve, France, **Aquatic Toxicology**, v. 74, p. 53 – 69, 2005.

ONU, **Organization de las Naciones Unidas**, The Millennium Development Goals, Report 2011, Nueva York, 2011.

OSHIMA-FRANCO, Y O; FRANCO, L M, Biotransformação: Importância e toxicidade, **Saúde em Revista**, v. 5, p. 69–76, 2003.

PAN, L *et al*, Identification of a novel P450 gene belonging to the CYP4 family in the clam *Ruditapes philippinarum*, and analysis of basal- and benzo(a)pyrene-induced mRNA expression levels in selected tissues, **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 32, n. 3, p. 390-398, 2011.

PARK, D J *et al.*, CCAAT/enhancer binding protein epsilon is a potential retinoid target gene in acute promyelocytic leukemia treatment, **Journal of Clinical Investigation**, v.103, n.10, p.1399–1408, 1999.

PARKINSON, A, Biotransformation of xenobiotics Casarett and Dull's Toxicology: The basic science of poisons, **Curts D Klaassen, Kansas, McGraw – Hill**, p. 161 – 303, 2008.

PATEU, N; DAVIES, C. Direcionado para os objetivos. PNNMA,. **GEO BRASIL Nº 5**, [www.unep.org/geo](http://www.unep.org/geo) p. 30 -32, 2010.

PAYNE, J F, Field Evaluation of Benzopyrene Hydroxylase Induction as a Monitor for Marine Petroleum Pollution, **Science**, v. 191, n. 4230, p. 945-946, 1976.

PENTEADO, J C P; EL SEOUD, O A; CARVALHO, L R F, Linear alkylbenzene sulfonates: Chemistry, environmental impact and analysis , **Alquilbenzeno sulfonato linear: Uma abordagem ambiental e analítica**, v. 29, n. 5, p. 1038-1046, 2006.

PEREIRA, M A *et al*, Microbiological quality of oysters (*Crassostrea gigas*) produced and commercialized in the coastal region of Florianópolis - Brazil, **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, n. 2, p. 159-163, 2006.

PERFETTI, G A *et al*, Determination of polynuclear aromatic hydrocarbons in seafood by liquid chromatography with fluorescence detection, **Journal of AOAC International**, v. 75, n. 5, p. 872–877, 1992.

PERLMANN, T *et al*, Determinants for selective RAR and TR recognition of direct repeat HRES, **Genes & Development**, v. 7, n. 7B, p. 1411–1422, 1993.

PETRYK, A *et al*, Shade is the *Drosophila* P450 enzyme that mediates the hydroxylation of ecdys one to the steroid insect molting hormone 20-hydroxyecdysone, **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 24, p. 13773-13778, 2003.

PFAFFL, M W; HORGAN, G W; DEMPFLER, L, Relative expression software tool (REST©) for group – wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real time PCR, **Nucleic Acids Research**. v. 30, n. 9, p. 1–10, 2002.

PROGRAMA DE LAS NACIONES UNIDAS PARA EL MEDIO AMBIENTE, *Seguimiento a nuestro medio ambiente em transformacion*. **Rio Mais 20**, PNUMA, 2012.



PURNAPATRE, K; KHATTAR, S K; SAIN, K S, Cytochrome P450 in the development of target based anticancer drugs, **Cancer Letters**, v. 259, n. 1, p. 1–15, 2008.

RAMDINE, G *et al*, Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in surface sediment and oyster (*Crassostrea rhizophorae*) from mangrove of Guadeloupe: Levels, bioavailability, and effects, **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 79, p. 80–89, 2012.

RAMOS, R J *et al*, Microorganismo indicadores de qualidade higiênico-sanitária em ostra *Crassostrea gigas* e águas salina de fazendas marinhas localizadas na Baía Sul da Ilha de Santa Catarina, Brasil, **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, n. 1, p. 29–37, 2010.

RAY, W J *et al*, CYP26 a novel mammalian cytochrome P450 is induced by retinoic acid and defines a new family, **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 18702–18708, 1997.

REIJNTJES, S *et al*, Generating gradients of retinoic acid in the chick embryo: CYP26C1 expression and a comparative analysis of the CYP26 enzymes, **Developmental Dynamics**, v. 230, n. 3, p. 509 – 517, 2004.

REWITZ, K F *et al*, Marine invertebrate cytochrome P450: emerging insights from vertebrate and insects analogies, **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 143, v. 4, p. 363-381, 2006.

ROCHA, P S *et al*, Changes in toxicity and dioxin-like activity of sediments from the Tietê River (São Paulo, Brazil). **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 73, n. 4, p. 550 – 558, 2010.

ROUIMI, Patrick *et al*, Impacts of low doses of pesticide mixtures on liver cell defence systems, **Toxicology in Vitro**, v. 26, n. 5, p. 718-726, 2012.

RUPPERT, E E; FOX, R S; BARNES, R D, **Zoologia dos invertebrados**. Editora Roca LTDA, 7ª edição, São Paulo, 2005.

SAAVEDRA, C; BACHÈRE, E, Bivalve genomics, **Aquaculture**, v. 256, n. 1-4, p. 1-14, 2006.

SAFE, S, Polychlorinated biphenyls (PCBs), dibenzo – p – acioxins (PCUDIS), dibenzofurans (PCDFs), and related compounds: environmental and mechanistic considerations which support the development of toxic equivalency factors (TEFs), **Critical Reviews in Toxicology**, v. 21, n. 1, p. 51–88, 1990.

SAKAI, Y *et al*, The retinoic acid-inactivating enzyme CYP26 is essential for establishing an uneven distribution of retinoic acid along the antero-posterior axis within the mouse embryo, **Genes & Development**, v. 15, n. 2, p. 213-225, 2001.

SAMBROOK, J; FRITSCH, E F; MANIATIS, T, Molecular Cloning - A Laboratory Manual, **Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press**, v. 2, 1989.

SANTOS, E A *et al*, Mast cells are present in epithelial layers of different tissues of the mollusc *Anomalocardia brasiliana*. In situ characterization of heparin and a correlation of heparin and histamine concentration, **Histochemical Journal**, v. 34, n. 11-12, p. 553-558, 2002.

SAPOZHNIKOVA, Y; BAWARDI, O; SCHLENK, D, Pesticides and PCBs in sediments and fish from the Salton Sea, California, USA, **Chemosphere**, v. 55, n. 6, p. 797–809, 2004.

SARKAR, A *et al*, Molecular Biomarkers: Their significance and application in marine pollution monitoring, **Ecotoxicology**, v.15, n.4, p.333-340, 2006.

SCHNELL, S *et al*, The Interference of Nitro- and Polycyclic Musks with Endogenous and Xenobiotic Metabolizing Enzymes in Carp: An In Vitro Study, **Environmental Science & Technology**, v. 43, n. 24, p. 9458-9464, 2009.

SIDDARTH, M *et al*, Association of CYP1A1 gene polymorphism with chronic kidney disease: A case control study, **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 36, n. 1, p. 164-170, 2013.

SOUZA, D S M *et al*, Evaluation of tropical water sources and mollusks in southern Brazil using microbiological, biochemical, and chemical

parameters, **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 76, n. 1, p. 153-161, 2012.

STEGEMAN, J J; LIVINGSTONE, D R, Forms and functions of cytochrome P450, **Comparative Biochemistry and Physiology - C Pharmacology Toxicology and Endocrinology**, v. 121, n. 1-3, p. 1-3, 1998.

STOLL, J M; GIGER, W, Determination of detergent derived fluorescent whitening agent isomers in lake sediments and surface Waters by liquid chromatography, **Analysis Chemical**, v. 69, n. 13, p. 2594–2599, 1997.

SWINDELL, E C *et al*, Complementary domains of retinoic acid production and degradation in the early chick embryo, **Developmental Biology**, v. 216, n. 1, p. 282-296, 1999.

TAKADA, H *et al*, Distribution of linear alkylbenzene (LABs) in reverine and coastal environmets in South and Southeast Asia, **Water Research**, v. 38, n. 9, p. 2449–2459, 2004.

TAKADA, H; EGANHOUSE, RP, **Molecular markers of anthropogenis**. Encyclopedia of Environmental Analysis and Remediation, New York. p. 2883 – 2940, 1998.

TAKADA, H; ISHIWATARI, R; OGURA, N, Distributing of linear alkybenzenes (LABs) and Linear alkylbenzene – sulphonates (LAS) in Tokyo Bay sediments. Estuarine, Coastal and Shelf, **Science**, v. 35, p. 141–156, 1992.

TAMURA, K *et al*, MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods, **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, n. 10, p. 2731-2739, 2011.

TARNOW, P *et al*, Effects of triclocarban on the transcription of estrogen, androgen and aryl hydrocarbon receptor responsive genes in human breast cancer cells, **Toxicology in Vitro**, v. 27, n. 5, p. 1467-1475, 2013.

TEUNISSEN, Y *et al*, Molecular cloning of a cDNA encoding a member of a novel cytochrome P450 family in the mollusc *Lymnaea stagnalis*, **Journal of Biochemistry**, v. 112, n. 2, p. 249-252, 1992.

THEODORAKIS, C W; WIRGIN, I I, Genetic responses as population level biomarkers of stress in aquatic ecosystems, 2012, In: ADAMS S.M. (Ed), Biological Indicators of Aquatic Ecosystems stress, **American Fisheries Society Bethesda Maryland**, p. 149 – 186, 2002

TOLEDO-SILVA, G, *Análise da expressão gênica diferencial em ostras-do-pacífico Crassostrea gigas expostas a esgoto doméstico in situ*, Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Santa Catarina. Centro de Ciências Biológicas, p. 1-94, 2009.

TOLEDO-SILVA *et al*, Cloning a new cytochrome P450 isoform (CYP356A1) from oyster *Crassostrea gigas*, **Marine Environmental Research**, v. 66, n. 1, p. 15-18, 2008.

TOWNSLEY, J D; BRODIE, H J, Studies on the mechanism of estrogen biosynthesis III. The stereochemistry of aromatization of C19 and C18 steroids, **Biochemistry**, v. 7, n. 1, p. 33 – 40, 1986.

TREVISAN, R *et al*, Antioxidant deficit in gills of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) exposed to chlordinitrobenzene increases menadione toxicity, **Aquatic Toxicology**, v. 108, p. 85 – 93, 2012.

TUN, K L *et al*, Seasonality in the infection and invasion of *Marteilioides chungmuensis* in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 80, n. 2, p. 157-165, 2008.

UNEP, **Guidance for a Global Monitoring Programme for Persistent Organic Pollutants**. Inter-Organization Programme for the Sound Management of Chemicals. Geneva, Switzerland, 2004.

VAN DER, O O S T; BEYER, J, Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review, **Environmental Toxicology Pharmacology**, v. 149, n. 2, p. 13 – 57, 2003.

VASCONCELOS, V *et al*, Effects of marine toxins on the reproduction and early stages development of aquatic organisms, **Marine Drugs**, v. 8, n. 1, p. 59-79, 2010.

VIARENGO, A, Heavy metals in marine invertebrates: Mechanisms of regulation and toxicity at cellular level, **Reviews in Aquatic Sciences**, v.1, p. 295-317, 1989.

VIEIRA, R H S F.; **Microbiologia, higiene e qualidade do pescado: teoria e prática**. São Paulo: Livraria Varela, 2004. 380 p.

WALKER, C H *et al*, **Principles of Ecotoxicology**, Taylor & Francis, Second Edition, Londres, p.309, 2001.

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

WARNE, M S; SCHIFKO, A D, Toxicity of laundry detergent components to a fresh water cladoceran and their contribution to detergent toxicity, **Ecotoxicol Environmental Safety**, v. 44, n. 2, p. 196–206, 1999.

WAXMAN, D J; AZAROFF, Phenobarbital induction of cytochrome P-450 gene expression, **Biochemical Journal**, v. 28, n. 3, p. 577-592, 1992.

WHALEN, K E *et al*, Cytochrome P450 diversity and induction by gorgonian allelochemicals in the marine gastropod *Cyphoma gibbosum*, **BMC Ecology**, v. 10, n. 24, p. 1-15, 2010.

WHEATON, F. Review of the properties of Eastern oysters, *Crassostrea virginica*: Part I- Physical properties. **Aquacultural Engineering**, v. 37, n. 1, p. 3–13, 2007.

WHITEHOUSE, B G, The effect of temperature and Solinity oh the aqueores solubility of polynuclear aromatic hydrocarbons, **Marine Chemistry**, v. 14, n. 4, p. 319–332, 1984.

YUAN *et al*, New cytochrome P450 1B1, 1C1, 2Aa, 2Y3, and 2K genes from Chinese rare minnow (*Gobiocypris rarus*): Molecular characterization, basal expression and response of rare minnow CYP1s

and CYP2s mRNA exposed to the AHR agonist benzo[a]pyrene, **Chemosphere**, v. 6535, n. 13, p. 1-8, 2013.

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, n. 0, p. 101-112, 2013.

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, Supple, n. 0, p. S1-S3, 2010.

ZANETTE, J, *Identificação e caracterização de marcadores moleculares para estudos ecotoxicológicos em moluscos bivalves e peixes*, Tese (Doutorado) –Programa de Pós Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, p. 1-180, 2009.

ZECHMEISTER, L; KOE, B K, The isolation of carcinogenic and other polycyclic aromatic hydrocarbons from barnacles, **Archives of Biochemistry Biophysic**, v. 35, n. 1, p. 1–11, 1952.

ZENG, E Y; KHAN, A R; TRAN, K, Organic pollutants in the coastal marine environment of San Diego California. 3. Using linear alkylbenzenes to trace sewage derived organic materials, **Environmental Toxicology and Chemistr**, v. 16, p. 196 – 201, 1997.

ZHAN, G *et al*, The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of Shell formation, **Nature**, 2012.

ZHANG, L *et al.*, Identification and expression profile of a new cytochrome P450 isoform (CYP414A1) in the hepatopancreas of *Venerupis* (Ruditapes) *philippinarum* exposed to benzo[a]pyrene, cadmium and copper, **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 33, n. 1, p. 85-91, 2012.

ZHANG, X *et al*, Real-Time PCR array to study effects of chemicals on the Hypothalamic-Pituitary-Gonadal axis of the Japanese medaka, **Aquatic Toxicology**, v. 88, n. 8, p. 173-182, 2008.

ZHOU, L *et al*, A novel type of P450C17 lacking the lyase activity is responsible for C21-steroid biosynthesis in the fish ovary and head kidney, **Endocrinology**, v. 148, n. 9, p. 4282-4191, 2007.

ZIOUZENKOVA, O; PLNTZKY, J, Retinoid metabolism and nuclear receptor responses: New insights in to coordinated regulation of the PPAR – RXR complex, **FEBS Letters**, v. 582, n. 1, p. 32 – 38, 2008.