

Clei Endrigo Piazza

**IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DA TRANSCRIÇÃO GÊNICA
DIFERENCIAL EM PEIXES *Poecilia vivipara* Bloch & Scheider, 1801,
EXPOSTOS AO ESGOTO SANITÁRIO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de mestre em Biotecnologia e Biociências.

Orientador: Prof. Dr. Afonso Celso Dias Bainy

Florianópolis

2012

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

Piazza, Clei Endrigo

IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DA TRANSCRIÇÃO
GÊNICA DIFERENCIAL EM PEIXES *Poecilia vivipara* Bloch
& Scheider, 1801, EXPOSTOS AO ESGOTO SANITÁRIO /
Clei Endrigo Piazza ; orientador, Afonso Celso Dias Bainy -
Florianópolis, SC,

2012.

91 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. Ecotoxicologia. 3.
Biomarcadores moleculares. 4. *Poecilia vivipara*. 5. Esgoto
Sanitário. I. Bainy, Afonso Celso Dias. II. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação
em Biotecnologia e Biociências. III. Título.

Clei Endrigo Piazza

**IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DA TRANSCRIÇÃO GÊNICA
DIFERENCIAL EM PEIXES *Poecilia vivipara* Bloch & Scheider, 1801,
EXPOSTOS AO ESGOTO SANITÁRIO**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Biotecnologia e Biociências.

Florianópolis, 13 de junho de 2012.

Profa., Dra. Cláudia Maria Oliveira Simões
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
e Biociências
CIF/CCS/UFSC

Banca Examinadora:

Prof., Dr. Afonso Celso Dias Bainy
Orientador
BQA/CCB/UFSC

Prof., Dr. Alcir Luiz Dafré
BQA/CCB/UFSC

Prof., Dr. Boris J. C. Ugarte Stambuk
BQA/CCB/UFSC

Prof., Dr. Juliano Zanette
Instituto de Ciências Biológicas/FURG

Este trabalho é dedicado aos
meus pais.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho não teria sido viável sem a participação de muitas pessoas envolvidas direta e indiretamente. Sei que citá-las, torna-se bastante complicado por correremos o risco de esquecermos algumas, mas sei também que deixar de citar pessoas importantes neste pequeno espaço, seria muito pior.

Gostaria de agradecer imensamente ao Dr. Afonso Bainy por ter me aceitado como orientado, ter disponibilizado este espaço tão cobiçado e muitas vezes invejado que é o LABCAI e por ter garantido o fundamental para realização da pesquisa: orientação e recursos. Muito obrigado pelo voto de confiança e incentivo.

Obrigado aos meus pais e minha irmã, que mesmo sem entender muito o tipo de trabalho que realizamos e o que são os biomarcadores, sempre me incentivaram e torceram pelo meu sucesso, tanto profissional como pessoal. Muito obrigado por todo carinho, compreensão e amor incondicional.

Juliana e Cadão, o casal mais legal de Floripa, vocês foram as primeiras pessoas que me acolheram nessa cidade e desde o primeiro dia me trataram como um velho amigo. A convivência neste lugar se tornou muito mais fácil e prazerosa, obrigado pelos ensinamentos, pelo carinho e pelas terapias de grupo.

Jacó, Fabrício e Lila, muito obrigado pela parceria desempenhada nos últimos experimentos, a ajuda de vocês foi fundamental em diversas etapas, sobretudo no Real Time, sem a amizade e trabalho árduo, muitos outros trabalhos no laboratório não teriam sido possíveis. Aos caras, ainda reservo um agradecimento especial por todo trabalho de campo, de estatística, de organização do bioensaios, de filosofia barata e papo sério, cerveja no boteco, vídeos toscos de youtube, risadas e besteiro compartilhados que foram extremamente necessários para aguentar o desafio de conduzir 3 grandes experimentos ao mesmo tempo. Valeu mesmo!

Elisa, Flávia e Mariana, muito obrigado por todo o auxílio nas clonagens, minipreps, pescarias, manutenção dos peixes, congressos, finais de semana de SSH e amizade.

Muito obrigado à Talita que fez todo sequenciamento dos clones deste trabalho, sempre atenciosa e comprometida com a qualidade dos dados.

Dr. Alcir, Arnaldo, Daiane Acosta e todo pessoal do LABDEF por todo empenho nos trabalhos do mangue.

Maya por sempre auxiliar com a logística dos equipamentos e reagentes.

A todo pessoal do LABCAI, agradeço por terem sido compreensivos, ou quase, com o meu TOC de ficar batucando em tudo.

Agradeço também a Karim e a Dani, com seus ótimos conselhos e idéias, Aninha e Pedrão das proteínas, sempre tão calmos. Ao pessoal da Biotec, Naíssa e Rafa, juntamente com a Claudia e os ICs, Laura, Gabriel e Tomás, sempre disputando o uso do Real Time, gentilmente (ou quase) cederam a vez para uso do mesmo.

Tati, Shayla, Miriam, Gabriele, Miguel, Rômi e Roberta, obrigado por tornar os dias no laboratório mais divertidos.

A Joice por ter sempre resolvido os problemas burocráticos com o PPG.

Agradeço aos meus professores e amigos desde os tempos da Graduação, Dr. Claus e o futuro doutor Cláudio Ricken por todo incentivo.

Ao INCT-TA por financiar meu projeto de pesquisa diretamente.

Ao Reuni pela minha bolsa de mestrado.

A Daiane Trombin pelo incentivo, paciência, carinho e apoio na realização deste trabalho e de tantos outros projetos e sonhos.

Ao Luiz Keller que me emprestou gentilmente o computador para as análises de bioinformática.

Ao Ney por toda hospitalidade e descontração e pelo computador aos 45 do segundo tempo.

A Tia, Madrinha, Amiga e psicóloga de plantão, Cleusa Piazza, por ter me incentivado sempre, acreditado no meu trabalho, ter dado suporte, carinho, atenção, abrigo, amor incondicional e junto de meus pais, sempre ter sido o meu porto

seguro, desde a seleção para o mestrado, até a conclusão desta dissertação e por todas as demais etapas da minha vida que passaram ou que virão. Muitíssimo obrigado, amo-a incomensuravelmente.

Por último muito obrigado à cafeína, à cerveja artesanal e ao Heavy Metal/Rock que me mantiveram controlado, quando a insanidade parecia cada vez mais próxima.

"A natureza não é cruel, apenas implacavelmente indiferente. Essa é uma das lições mais duras que os humanos têm de aprender."

(Richard Dawkins)

RESUMO

O crescimento desenfreado da urbanização e industrialização nas últimas décadas tem sido um dos principais responsáveis pela contaminação dos ecossistemas marinhos. As atividades antrópicas, industriais e agrícolas são responsáveis pelo consumo de mais de um terço da água doce acessível no mundo, e consequentemente por sua contaminação. Diversas substâncias potencialmente danosas são liberadas constantemente no ambiente, sejam elas de origem antropogênica ou natural. A mistura complexa de contaminantes presentes no ambiente acaba por causar efeitos interativos na biota. Dentre os contaminantes mais comuns, encontra-se o esgoto sanitário que é composto por uma variedade de substâncias em concentrações de difícil caracterização e que é considerado como a principal fonte de contaminantes de ambientes costeiros. Sabendo-se que os efeitos dos poluentes não podem ser avaliados por análises químicas, torna-se necessária a utilização de meios mais sensíveis e confiáveis para a avaliação ambiental. No capítulo I, peixes *Poecilia vivipara* foram expostos ao esgoto sanitário na concentração de 33% (v/v) em condições de laboratório para a identificação e análise de biomarcadores moleculares pela técnica de Hibridização Substrativa Supressiva (SSH). Genes de biotransformação como *GST*, *UDPGT* e *MET* também foram testados por qPCR. Neste estudo foram encontrados 22 genes diferencialmente transcritos, sendo 10 induzidos e 12 reprimidos. Os resultados de qPCR confirmaram a indução de *CYP1A*, *GST*, *UDPGT*, e a repressão de *C3*, *FIB*, *TF* e *DMRT1*. No capítulo II os genes que obtiveram respostas no experimento de laboratório, foram testados em exposição de campo no Mangue de Ratoões (local Referência) e no Mangue do Itacorubi, em dois locais considerados contaminados por esgoto sanitário, um a jusante e outro a montante da saída do mangue. As transcrições dos genes *DMRT1*, *MET*, *GST* e *UDPGT* foram induzidas no local contaminado situado a jusante, em relação ao grupo referência. *CYP1A* apresentou uma maior transcrição no local situado mais a montante do Mangue do Itacorubi e nenhum gene foi reprimido. Em ambos os estudos os genes que obtiveram respostas significativas, estão associados a funções biológicas como

biotransformação, sistema imune e diferenciação sexual. Os resultados fornecem boas medidas que os caracterizam como possíveis e promissores biomarcadores de contaminação ambiental por esgoto sanitário.

Palavras-chave: Biomarcadores, esgoto sanitário, *Poecilia vivipara*, SSH, transcrição gênica.

ABSTRACT

The uncontrolled growth of urbanization and industrialization in recent decades has been a major contributor to the contamination of marine ecosystems. Human activities, industrial and agricultural are responsible for the consumption of more than a third of the accessible freshwater in the world, and consequently by their contamination. Several potentially harmful substances are released into the environment constantly, whether they are natural or anthropogenic origin. The complex mixture of contaminants in the environment ultimately causes interactive effects on biota. Among the most common contaminants, lies the sewage which is composed by a variety of substances and concentrations difficult to characterize and is regarded as the main source of contaminants in coastal areas. It is known that the effects of pollutants can not only be measured by chemical analysis, it becomes necessary to use more sensitive and reliable means for environmental assessment. In the Chapter I, fishes *Poecilia vivipara* were exposed to sanitary sewage in the concentration of 33% (v/v) in the laboratory for the identification and analysis of molecular biomarkers by using the technique Suppressive Subtractive Hybridization (SSH). Genes of Biotransformation such as GST, UDPGT and MET were also tested by qPCR. In this study were found 22 differentially transcribed genes, 10 were induced and 12 repressed. The qPCR results confirmed the induction of CYP1A, GST, UDPGT, and repression of C3, FIB, TF and DMRT1. In Chapter II the responsive genes in the laboratory experiments, were tested in field exposure in the Ratones Mangrove (Reference site) and in the Itacorubi Mangrove at two sites considered contaminated by sanitary sewage, one upstream and one downstream sites. Transcription of DMRT1, MET, GST and UDPGT were induced in the liver of fish kept at the downstream site. CYP1A transcription was induced in the fish from the upstream site and no gene was repressed. In both studies, the genes that had significant responses are associated with biological functions such as biotransformation, immune system, and sexual differentiation. The associated results provide good measurements that characterize them as possible and promising biomarkers of

environmental contamination by sanitary sewage in coastal region.

Keywords: Biomarkers, sewage, *Poecilia vivipara*, SSH, gene transcription.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Sequência de iniciadores senso (F) e anti-senso (R) dos genes de *Poecilia vivipara* selecionados: *Serina-treonina quinase (RAF1a)*, *Hormônio de crescimento (GH)*, *Complexo majoritário de hispocompatibilidade classe 1 A (MHCIA)*, *Fibrinogênio gama (FIB)*, *Determinante sexual (DMRT1)*, *Proteína ribossomal 40S (40S)*, *Proteína do sistema complemento C3 (C3)*, *Transferrina (TF)*, *Glutaciona S-transferase (GST)*, *Citocromo P450 1A (CYP1A)*, *Metiltransferase (MET)*, *Uridina difosfato glicuroniltransferase 1B (UDPGT1B)*, β -*Actina (ACT)*, *Fator de Elongação 2 (EF2)* e *Proteína ribossomal S2 (S2)* e suas respectivas temperaturas de anelamento..... 36

Tabela 2 Valores de correlação (R^2), inclinação da reta (M) e eficiência da reação ($100\%=1$) para as curvas padrões geradas na padronização das reações de qPCR. 41

Tabela 3 Lista gerada pela SSH de genes induzidos pela exposição ao esgoto sanitário 33%(v/v) durante 24h em fígado de peixes *Poecilia vivipara*. Na tabela estão dispostas informações sobre a função biológica do gene, probabilidade de identificação imprecisa do gene (e-value) e tamanho do fragmento em pares de base (pb)..... 43

Tabela 4 Lista gerada pela SSH de genes reprimidos pela exposição ao esgoto sanitário 33%(v/v) durante 24h em fígado de peixes *Poecilia vivipara*. Na tabela estão dispostas informações sobre a função biológica do gene, probabilidade de identificação imprecisa do gene (e-value) e tamanho do fragmento em pares de base (pb)..... 44

Tabela 5 Valores de correlação (R^2), inclinação da reta (M) e eficiência da reação ($100\%=1$) para as curvas padrões geradas na padronização das reações de qPCR. 72

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Fotografia de peixes da espécie *Poecilia vivipara*..... 25
- Figura 2.** Transcrição dos genes candidatos a normalizadores. O asterisco (*) representa diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle. O eixo y representa quantas vezes o gene aumentou ou diminuiu em relação ao seu controle. Os dados estão representados por valores de média e desvio padrão..... 46
- Figura 3.** Transcrição gênica e validação por RT-PCR quantitativo dos genes reprimidos identificados na SSH para o grupo de peixes expostos ao esgoto sanitário 33% após 24 h e 96 h de exposição. O asterisco (*) representa diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle. O eixo y representa quantas vezes o gene aumentou ou diminuiu em relação ao seu controle. Os dados estão representados por valores de média e desvio padrão. 47
- Figura 4.** Transcrição gênica e validação por RT-PCR quantitativo dos genes induzidos para o grupo de peixes expostos ao esgoto sanitário 33% após 24 h e 96 h de exposição. O asterisco (*) representa diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle. O eixo y representa quantas vezes o gene aumentou ou diminuiu em relação ao seu controle. Os dados estão representados por valores de média e desvio padrão. 48
- Figura 5.** Transcrição gênica por RT-PCR quantitativo da *HSP70* identificada na biblioteca subtrativa de genes reprimidos do grupo de peixes expostos ao esgoto sanitário 33% após 24 h e 96 h de exposição..... 49
- Figura 6.** Identificação do local amostral referência onde foi fixada uma balsa de exposição. 68
- Figura 7.** Identificação dos locais amostrais expostos onde foram fixadas balsas de exposição. 68
- Figura 8.** Mini-balsa com balde adaptado para exposição de peixes *in situ*..... 69

Figura 9. Transcrição dos genes candidatos a normalizadores. O asterisco (*) representa diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo referência (RAT). O eixo y representa quantas vezes a transcrição do gene aumentou ou diminuiu em relação ao seu controle. Os dados estão representados por valores de média e desvio padrão. 73

Figura 10. Transcrição gênica por RT-PCR quantitativo dos genes *CYP1A* e *DMRT1* dos animais mantidos no mangue após 24 h. O asterisco (*) representa diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo referência (RAT). O eixo y representa quantas vezes o gene aumentou ou diminuiu em relação ao grupo referência. Os dados estão representados por valores de média e desvio padrão. 74

Figura 11. Transcrição gênica por RT-PCR quantitativo dos genes *MET*, *UDPGT1B* e *GST* dos animais expostos ao mangue após 24 h. Letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos. O eixo y representa quantas vezes o gene aumentou ou diminuiu em relação ao grupo referência. Os dados estão representados por valores de média e desvio padrão. 75

Figura 12. Transcrição gênica por RT-PCR quantitativo dos genes *TF*, *HSP70*, *C3* e *FIB* dos animais mantidos no mangue após 24 h. O eixo y representa quantas vezes o gene aumentou ou diminuiu em relação ao grupo referência. Os dados estão representados por valores de média e desvio padrão. 76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 40S – Proteína ribossomal 40S
ACT – β -Actina
AHR – Receptor de hidrocarbonetos aromáticos
BFR – Retardantes de chama bromados
C3 – Sistema complemento C3
COMT – Catecol-O-Metiltransferase
CT – Ciclo limiar
CYP – Citocromo P 450
DDT – Dicloro-difenil-tricloroetano
DMRT1 – Double-sex and mab3 related transcription factor 1
EF2 – Fator de alongação 2
EROD – Etoxiresorufina-O-deetilase
FIB – Fibrinogênio gama
GH – Hormônio de crescimento
GST – Glutathione S-transferase
HBCD - Hexabromociclododecano
HPA – Hidrocarboneto policíclico aromático
HSP70 – Proteína de choque térmico 70
INCT-TA – Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Toxicologia Aquática
MET – Metiltransferase
MHCIA – Complexo principal de histocompatibilidade classe I A
mMYH-2 - Isoforma da cadeia pesada de miosina do músculo liso
OCP – Pesticidas organoclorados
PBB – Bifenilas polibromadas
PBDE – Éteres de difenila polibromados
PCB – Bifenilas policloradas
PCDD - Dibenzo-p-dioxinas policloradas
PCDF – Dibenzofuranos policlorados
PCR – Reação em cadeia da polimerase
PDGFRBB - Receptor beta do fator de crescimento derivado plaquetário

PNSB – Pesquisa Nacional de Saneamento Básico

qPCR – PCR em tempo real

RAF1a – Serina/treonina quinase

S2 – Proteína ribossomal 2

SLC4A2 - Família transportadora de soluto 4 trocador de ânions
membro 2

SSH – Hibridização Subtrativa Supressiva

TBBPA - Tetrabromobisfenol A

TF – Transferrina

UDPGT – Uridina difosfato glicuronil transferase

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	21
1.1 Contaminação Aquática	21
1.2 Esgoto sanitário	23
1.3 Gênero <i>Poecilia</i>	24
2. OBJETIVOS	25
2.1 Objetivos Gerais	25
2.2 Objetivos Específicos	25
3. CAPITULO I	26
4. INTRODUÇÃO	27
5. OBJETIVOS	30
6. METODOLOGIA	31
6.1 Coleta dos animais.....	31
6.2 Exposição ao esgoto sanitário	31
6.3 Extração de RNA total.....	32
6.4 Extração do RNA mensageiro (RNAm)	32
6.5 Hibridização Subtrativa Supressiva (SSH)	33
6.6 Clonagem	33
6.7 Sequenciamento.....	34
6.8 Comparação de sequências.....	34
6.9 Validação dos genes	34
6.9.1 Desenho de iniciadores	35
6.9.2 Padronização das reações de qPCR	37
6.9.3 Exposição de <i>P. vivipara</i> ao esgoto sanitário para validação	38
6.9.4 Extração de RNA total.....	38
6.9.5 Síntese de cDNA.....	39
7. PCR em tempo real (qPCR)	39
8. Análise estatística	39
9. RESULTADOS.....	40
10. DISCUSSÃO	50

10.1 Sistema de Biotransformação de Fase I.....	50
10.2 Sistema de Biotransformação de Fase II.....	52
10.3 Genes relacionados ao Sistema Imune	54
10.4 Trocadores de ânions	57
10.5 Serina/treonina quinase e receptor do fator de crescimento plaquetário.....	57
10.6 Diferenciação e determinação sexual.....	58
11. CONCLUSÃO	60
12. CAPITULO II.....	61
13. INTRODUÇÃO	62
14. OBJETIVOS	65
15. METODOLOGIA	66
15.1 Coleta dos animais	66
15.2 Área de estudo	66
15.3 Manguezal de Ratores	66
15.4 Manguezal do Itacorubi	67
15.5 Exposição dos animais	69
15.6 Extração de RNA total	70
15.7 Síntese de cDNA.....	70
15.8 Padronização das reações de qPCR.....	70
15.9 Reações de PCR em tempo real qPCR	71
15.10 Análise estatística	71
16. RESULTADOS.....	72
17. DISCUSSÃO	77
18. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	81
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Contaminação Aquática

Diversas substâncias químicas de origem natural ou antrópica potencialmente danosas são despejadas no ambiente constantemente (SILVA; HEUSER; ANDRADE, 2003). O aumento na necessidade de água para o abastecimento, agricultura e atividades de lazer associado a industrialização crescente e a formação de grandes aglomerados urbanos, tornou as atividades humanas cada vez mais dependentes da disponibilidade e qualidade das águas continentais (LEMOS; TERRA, 2003).

Segundo Cajaraville e colaboradores (2000) a contaminação dos ecossistemas marinhos tem aumentado nas últimas décadas por consequência da atividade humana, que caracteriza-se como uma das principais causas do lançamento de xenobióticos na água, sedimento e biota (ADAM *et al.*, 2010).

Estima-se ainda que as atividades industriais, agrícolas e domésticas sejam responsáveis pela utilização de mais de um terço da água doce acessível, resultando na contaminação da mesma por compostos sintéticos e orgânicos (FREIRE *et al.*, 2008).

Entre os mais importantes ambientes da zona costeira, estão os estuários, que constituem zonas de transição, ou ecótonos, onde as águas drenadas dos solos misturam-se com a água do mar, dando origem a uma das áreas mais produtivas biologicamente na Terra (KENNISH, 2002). A maioria das cidades da costa brasileira não possui instalações apropriadas para coleta, tratamento e despejo de esgoto (ABESSA *et al.*, 2005).

Durante várias décadas, os ecossistemas costeiros têm sofrido danos severos como o enriquecimento de nutrientes e carbono orgânico provenientes do esgoto sanitário, derramamento de óleos e um aumento na contaminação por compostos tóxicos, tais como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs), as bifenilas policloradas (PCBs), hidrocarbonetos halogenados, metais traços, pesticidas organoclorados (OCPs), dibenzofuranos policlorados (PCDFs), dibenzo-*p*-dioxinas (PCDDs), fármacos e produtos de higiene

pessoal (KENNISH, 2002; VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003; BOUTET; TANGUY; MORAGA, 2004; WASSMUR et al., 2010).

A exposição aos hidrocarbonetos é considerada um dos maiores causadores de estresse nos organismos marinhos e uma eficiente biotransformação e detoxificação destes compostos é um mecanismo vital para os mesmos (BOUTET; TANGUY; MORAGA, 2004).

Os contaminantes, geralmente apresentam-se como misturas complexas no ambiente e podem causar efeitos interativos na biota impossíveis de serem avaliados somente através de análises químicas. Desta forma os biomarcadores oferecem medidas integradas dos efeitos dos poluentes presentes sobre os organismos expostos no ambiente (CAJARAVILLE et al., 2002). O principal objetivo em estudos ecotoxicológicos, é a elucidação da relação causa-efeito entre sistemas biológicos e as misturas de poluentes complexos aos quais estão expostos (SILVA; HEUSER; ANDRADE, 2003). Portanto, existe a necessidade do desenvolvimento de métodos para a identificação, estimativa, avaliação comparativa e análise de risco da poluição química no ambiente (CAJARAVILLE et al, 2000). Neste caso, o uso de espécies selvagens como sentinelas dos problemas ambientais é a base para o estabelecimento de ligações diretas entre os efeitos ecológicos e a saúde humana, visto que a mesma depende da saúde ambiental (SILVA; FONSECA, 2003). No Brasil, os testes ecotoxicológicos, ou bioensaios, tem se tornado comuns nos últimos anos, visando o monitoramento e avaliação da qualidade das águas (MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008). A partir de 1975 é que foram desenvolvidos e adaptados diversos métodos de ensaios de toxicidade aguda e crônica em alguns grupos e espécies de organismos aquáticos como algas, microcrustáceos e peixes de águas marinhas e continentais (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

Vários bioensaios, tanto *in vitro*, como *in vivo* com peixes vêm sendo utilizados como sistemas modelo para estudos de desenvolvimento, bioquímicos e toxicológicos. Uma das vantagens é a capacidade dos peixes expostos a contaminantes responderem bioquimicamente de forma semelhante aos mamíferos, como por exemplo, apresentando danos em hepatócitos, indução da expressão e atividade das

monooxigenases do citocromo P-450 que metabolizam muitos carcinógenos (SILVA; HEUSER; ANDRADE, 2003).

Outra facilidade é a capacidade de alguns peixes teleósteos de tamanho pequeno serem facilmente mantidos em laboratório para exposição a contaminantes, sob condições controladas (SILVA; HEUSER; ANDRADE, 2003). Desta forma, os peixes podem ser utilizados para investigar os efeitos de substâncias químicas potencialmente teratogênicas e carcinogênicas, além de determinar a distribuição e os efeitos tóxicos de contaminantes químicos na água (SILVA; HEUSER; ANDRADE, 2003; MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008).

1.2 Esgoto sanitário

Em 2008, de acordo com a Pesquisa Nacional de Saneamento Básico (PNSB 2008) 45,7% dos domicílios brasileiros passaram a ter acesso à rede de esgoto sanitário, sendo que em 2000, o acesso era de 33,5%. Mesmo assim, encontra-se ainda muito aquém do necessário. Dos 5.564 municípios, apenas 3.069 possuem rede coletora de esgoto, e destes, apenas 1.587 realizam o tratamento (IBGE, 2011).

O esgoto é considerado a principal fonte de contaminantes de ambientes costeiros (KENNISH, 1991) e um dos responsáveis pela diminuição da qualidade dos mesmos afetando a vida dos organismos que ali habitam (ZANETTE et al, 2008).

A variedade e concentração das substâncias encontradas nos efluentes urbanos são complexas e de difícil caracterização, bem como seus riscos para a biota (ABESSA et al, 2005). A composição do esgoto varia de acordo com as atividades humanas podendo em geral apresentar matéria orgânica, como carbono orgânico, nitrogênio, enxofre e contaminantes, produtos de higiene pessoal, produtos de limpeza e fármacos de uso humano ou veterinário (ABESSA et al., 2005; GAGNÉ et al., 2007; SANCHEZ et al., 2011). Além destes, existem também vários compostos considerados poluentes emergentes, como pesticidas, ácidos, agentes antibacterianos e surfactantes degradados que, além de serem ubíquos no ambiente aquático, podem causar danos à saúde, e sua remoção durante o tratamento de águas residuais pode não ser satisfatório (PETROVIĆ; GONZALEZ; BARCELO, 2003).

1.3 Gênero *Poecilia*

Apresentando uma grande variedade de adaptação reprodutiva, os poecilídeos, em sua maioria, são vivíparos sendo que apenas uma espécie das 150 conhecidas não é vivípara (THIBAUD; SCHULTZ, 1978). Geralmente apresentam dieta onívora, alimentando-se de invertebrados aquáticos e terrestres, detritos, plantas e principalmente larvas de insetos (NEVES; MONTEIRO, 2003).

Os indivíduos de *Poecilia vivipara* Bloch & Scheider, 1801, (Figura 1) conhecidos popularmente como barrigudinhos, são peixes da família *Poeciliidae* caracterizados por possuírem corpo alongado, comprimido posteriormente, sendo o macho menor que as fêmeas (MENDONÇA; ANDREATA, 2001).

Os peixes *P. vivipara* são capazes de se adaptar a condições ambientais extremas, com alta tolerância a salinidade e temperatura da água (BIZERRIL; PRIMO, 2001). São peixes amplamente distribuídos por toda a costa Sul Americana e considerados organismos-modelo para estudos de biologia reprodutiva e desenvolvimento (PARENTI; RAUCHEMBERGER, 1989).

Atualmente esta espécie tem sido utilizada como sentinela e em estudos de identificação de novos biomarcadores através de trabalhos como os de Bila et al., (2004) que utilizaram *P. vivipara* para avaliar a toxicidade de lixiviados ozonizados de aterros; Zanette, (2009) que identificou e caracterizou marcadores moleculares para estudos ecotoxicológicos; Mattos et al., (2009) que encontraram genes diferencialmente transcritos nos peixes quando expostos a fração acomodada do óleo diesel; e Adam et al., (2010) que utilizaram a técnica contagem de micronúcleos em sangue periférico de *P. vivipara* para avaliar um rio contaminado em Curitiba, Paraná.



Figura 1. Fotografia de peixes da espécie *Poecilia vivipara*

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Identificar e analisar a transcrição gênica diferencial em peixes *Poecilia vivipara* expostos ao esgoto sanitário.

2.2 Objetivos Específicos

1. Identificar genes ativados e reprimidos em fígado de peixes *Poecilia vivipara* expostos ao esgoto sanitário;
2. Testar a utilização de iniciadores específicos, através da técnica de PCR quantitativo, para avaliar alterações na transcrição gênica no fígado de peixes *Poecilia vivipara* expostos ao esgoto sanitário em laboratório;
3. Testar a utilização dos biomarcadores moleculares identificados em experimentos de monitoramento *in situ* em locais contaminados por esgoto sanitário.

3. CAPITULO I

**IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DA TRANSCRIÇÃO GÊNICA
DIFERENCIAL EM PEIXES *Poecilia vivipara* Bloch & Scheider, 1801,
EXPOSTOS AO ESGOTO SANITÁRIO**

4. INTRODUÇÃO

Durante as últimas três décadas, o interesse da comunidade científica e de agências regulatórias, tem aumentando em relação à detecção, conhecimento e controle sobre os agentes ambientais responsáveis por danos à saúde humana e à sustentabilidade dos ecossistemas (SILVA; FONSECA, 2003).

Segundo Silva e Fonseca (2003), esta preocupação crescente se deve ao aumento de relatos sobre danos na camada de ozônio, alterações climáticas globais, derrames de petróleo, liberações acidentais de dejetos e gases radioativos industriais e aumento de nitrogênio no ambiente.

Muitos dos compostos orgânicos hidrofóbicos e seus metabólitos que contaminam o ecossistema aquático ainda precisam ser identificados, da mesma forma que seus impactos na vida existente nestes ambientes, precisam ser determinados (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

Efeitos deletérios em populações são difíceis de detectar em organismos selvagens, já que muitos deles se manifestam após um tempo prolongado e quando eles se tornam claros, o processo destrutivo pode estar além do estágio em que poderia ser remediado ou ter seus danos reduzidos (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003; SILVA; HEUSER; ANDRADE, 2003).

Para este propósito, ferramentas como os biomarcadores podem ser utilizados. Este termo ganhou aceitação nos últimos anos, entretanto sua definição permanece inconsistente (WALKER et al., 1996), visto que muitos pesquisadores apresentam definições diferentes.

Lam e Gray (2003) dizem que os biomarcadores podem ser definidos como alterações bioquímicas, celulares, moleculares ou mudanças fisiológicas nas células, fluidos corpóreos, tecidos ou órgãos de um organismo que são indicativas da exposição ou efeito de um xenobiótico. Invariavelmente, seu papel como monitores está diretamente ligado à quantificação dos efeitos tóxicos de um poluente, direta ou indiretamente (WALKER et al., 1996; BEEBY, 2001).

Desta forma, uma das características mais importantes de biomarcadores celulares e moleculares, é a capacidade de antecipar mudanças em níveis superiores de organização biológica, isto é, população, comunidade ou ecossistema (CAJARAVILLE et al., 2000). O desenvolvimento de biomarcadores que permitam um diagnóstico antecipado dos distúrbios ambientais a longo prazo representa um desafio aos ecotoxicologistas (BRULLE et al., 2008).

Peixes e moluscos têm sido empregados como organismos sentinelas em programas de biomonitoramento, tanto nacional, como internacionalmente (FREIRE et al., 2008). São valiosos sistemas modelo não-mamíferos *in vivo* para determinação ambiental do efeito carcinogênico relacionado aos contaminantes em estudos tanto de laboratório, como de campo (WANG et al., 2010b).

Os peixes podem ser encontrados praticamente em qualquer ambiente aquático, e exercem um importante papel ecológico na cadeia alimentar, devido a sua função de carreador de energia desde os mais baixos, aos mais altos níveis tróficos. A compreensão do padrão de bioacumulação de substâncias tóxicas, comportamento e respostas em peixes, podem ser de grande relevância ecológica (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

Com o desenvolvimento de técnicas sofisticadas para a detecção de elementos-traço, os toxicologistas têm detectado e caracterizado metabólitos presentes em pequenas quantidades de até mesmo uma molécula por célula. Além disso, a biologia molecular tem auxiliado a toxicologia (LEBOUTE; SILVA, 2003), através da elucidação dos mecanismos moleculares de ação de contaminantes em organismos vivos. De fato, os perfis de transcrição gênica representam o primeiro nível de integração entre estressores ambientais e o genoma, que através da síntese de proteínas, comandam as respostas do organismo a mudanças externas (BRULLE et al., 2008).

A técnica de Hibridização Subtrativa Supressiva (SSH) possibilita a oportunidade de caracterizar mudanças na transcrição de centenas de genes, simultaneamente, durante, por exemplo, a exposição a agentes químicos tóxicos (QU et al., 2011).

A SSH envolve a subtração de uma amostra de DNA teste (*Tester*) de outra amostra de DNA referência (*Driver*), e a subsequente identificação das sequências que estão presentes no *Driver* e ausentes no *Tester* (WINSTANLEY, 2008).

Descrita por Diatchenko e colaboradores (1996) e patenteada pela *Clontech PCR-Select®*, a técnica de SSH seguida pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utiliza de 0,5 a 2µg de RNAm para cada amostra testada como material inicial, podendo resultar no enriquecimento de genes raros em uma quantidade de até 1000 vezes. O processo envolve a transcrição reversa das amostras de RNAm em fitas duplas, a digestão com enzimas de restrição Rsa I, a ligação de adaptadores específicos seguidos por uma primeira hibridização que irá enriquecer exacerbadamente sequências diferencialmente transcritas, resultando numa otimização dos genes diferenciais pela segunda hibridização e ampliações por PCR.

As técnicas de hibridização subtrativa têm sido empregadas na identificação de genes diferencialmente transcritos para vários propósitos, como na saúde humana, relacionando doenças com vários tipos de tecido (câncer de próstata, pulmão e bexiga), em plantas como o Tabaco, na resistência a infecções, em bactérias, nos estudos de resistência a fármacos, identificação de genes de virulência, e nos peixes, nas expressões de genes relacionados à resistência de infecções, adaptação à salinidade, e respostas a poluentes (WINSTANLEY, 2008).

Neste estudo, foi avaliada a transcrição gênica diferencial no fígado de peixes *P. vivipara*, expostos ao esgoto sanitário, utilizando a técnica de Hibridização Subtrativa Supressiva, visando à descoberta de novos biomarcadores sensíveis e eficientes no biomonitoramento ambiental.

5. OBJETIVOS

1. Verificar alterações na transcrição gênica em fígado de peixes *Poecilia vivipara* expostos ao esgoto sanitário em laboratório através da técnica de hibridização subtrativa supressiva (SSH);
2. Construir uma biblioteca transcriptômica subtrativa de *P. vivipara* com genes diferencialmente transcritos para o esgoto sanitário;
3. A partir das sequências de cDNA identificadas, desenhar e validar o uso de pares de iniciadores, através da técnica de PCR quantitativo, para avaliar alterações na transcrição gênica no fígado de peixes *P. vivipara* expostos ao esgoto sanitário por 24h e 96h;

6. METODOLOGIA

6.1 Coleta dos animais

Os exemplares de *P. vivipara*, provenientes dos tanques de cultivo de peixes do Laboratório de Piscicultura Marinha (LAPMAR), do Departamento de Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), localizados na Barra da Lagoa, Florianópolis, SC, foram coletados utilizando armadilhas de captura (Minnowtrap™) com ração para peixes como atrativo.

Em seguida, os animais foram encaminhados para o Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica (LABCAI), CCA, UFSC, onde foram aclimatados por 40 dias em água do mar filtrada (0,45µm), a 21°C e salinidade 24, com aeração constante. Durante a aclimação, os peixes foram alimentados duas vezes ao dia com ração peletizada e tiveram seus aquários drenados com renovação de 50% do volume da água.

6.2 Exposição ao esgoto sanitário

Depois de aclimatados, somente fêmeas foram expostas ao esgoto sanitário não tratado proveniente da estação de tratamento de esgotos da Companhia Catarinense de Águas e Saneamento de Florianópolis, (ETA/CASAN) em concentrações definidas na proporção 33% (v/v), durante 96 horas.

Foram utilizados aquários de vidro com capacidade para 35L em duplicata, isto é, dois aquários para exposição por 24h, grupo controle e grupo exposto, e outros dois, da mesma forma, para exposição por 96h. Foram mantidos 30 animais por aquário (1 peixe por litro), totalizando 120 indivíduos.

Para o grupo controle, os animais foram expostos à água do mar filtrada e com salinidade 24, aeração constante, fotoperíodo de 12:12 claro:escuro e temperatura de 21°C.

A concentração de 33% (v/v) foi definida para que a salinidade da solução se mantivesse em 24, a mesma dos animais do grupo controle, sob as mesmas condições. Todo o

procedimento para coleta, transporte e aclimação seguiu o protocolo CEUA PP00266, juntamente com a autorização do IBAMA.

Após o período de 24 horas, os animais foram sacrificados por transecção cervical, medidos, pesados.

Em seguida, foram retiradas amostras de fígado e brânquias de 16 animais, agrupando em pools de dois fígados (n=8) e outros 4 animais foram congelados imediatamente em nitrogênio líquido para análises químicas (dados não inclusos). Os 10 animais restantes de cada aquário foram utilizados em experimentos de histologia que não fizeram parte desta dissertação.

Os tecidos foram congelados imediatamente em nitrogênio líquido e em seguida armazenados em freezer -80°C, para ensaios posteriores. Estes procedimentos foram realizados em ambos os grupos, controle e exposto.

Quarenta e oito horas depois do início da exposição, a água do grupo controle foi totalmente renovada, bem como a solução de água e esgoto sanitário 33% do grupo exposto.

Ao final de 96h de exposição, os animais foram mortos seguindo-se os mesmos procedimentos citados anteriormente.

6.3 Extração de RNA total

O RNA total foi extraído a partir de 8 pools de fêmeas do grupo controle e 8 pools de fêmeas do grupo exposto, ambos dos tempos de 24h de exposição para realização da técnica de Hibridização Subtrativa Supressiva (SSH).

A Extração foi realizada utilizando o protocolo para o reagente TRizol (Invitrogen).

6.4 Extração do RNA mensageiro (RNAm)

A partir das amostras de RNA total, foi utilizado kit *MicropoliA mRNA* (Ambion), de acordo com o protocolo do fabricante, para obtenção do RNAm. A concentração e pureza

das amostras utilizadas para a técnica de SSH foram verificadas em espectrofotômetro Nanodrop, a 260, 280 e 320nm.

6.5 Hibridização Subtrativa Supressiva (SSH)

Como o protocolo da SSH requer de 0,5 até 2,0µg de RNAm em no máximo 5µL de amostra, foi necessário juntar todo o RNAm resultante do passo anterior, concentrando-o e eluindo novamente conforme o protocolo do *MicropoliA mRNA kit* (Ambion), tanto para o grupo controle, quanto para o exposto.

Uma vez que as concentrações foram obtidas e ajustadas equivalentemente em 1µg de RNAm, seguiram-se as instruções do protocolo do kit *PCR Select cDNA Subtraction Kit* (Clontech), onde, a partir do RNAm, foi realizada a síntese do DNA complementar (cDNA), seguido das hibridizações.

Este kit, permite a hibridização dos fragmentos de cDNA que são comuns a duas populações, enquanto os fragmentos diferencialmente transcritos são amplificados por reações de PCR ao final do procedimento (ZANETTE, 2009).

Para a comparação dos genes diferencialmente transcritos, foram realizadas hibridizações subtrativas nos dois sentidos, isto é, no grupo controle em relação ao grupo exposto, resultando em genes reprimidos, e no grupo exposto em relação ao grupo controle, resultando em genes induzidos.

Ao final da técnica, os produtos de PCR foram purificados com o kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare).

6.6 Clonagem

Depois de purificados, os produtos de PCR foram ligados a vetores pGEM-T®Easy (Promega).

Em seguida, células competentes de *E.coli* DH5-α foram transformadas com o vetor de expressão contendo os insertos, através de choque térmico, e plaqueadas em meio LB Agar contendo ampicilina (100mM), X-gal (50mM) e IPTG (0,5mM), incubando-as a 37°C por 18 horas em uma estufa para crescimento das colônias.

As colônias que apresentaram coloração branca, indicando a presença do inserto foram transferidas para placas de 96 poços (*deepwell*), contendo 1,0 mL de meio de cultura SuperBroth com ampicilina (100mM) e permaneceram sob agitação a 250 rpm a 37°C durante 18 horas.

Após este período, o DNA plasmidial foi purificado utilizando-se o protocolo adaptado de Sambrook (1989).

6.7 Sequenciamento

Foi realizada uma reação de PCR utilizando os iniciadores M13F ou M13R que se alinham a uma região próxima ao inserto no vetor pGEM-T®Easy (Promega), com a incorporação do corante fluorescente Big Dye Terminator (Applied Biosystems), para sequenciamento dos fragmentos.

A reação foi então aplicada no sequenciador ABI PRISM DNA Sequencer 3033 (Applied Biosystems), para determinação das sequências gênicas expressas durante o experimento.

Todas as sequências obtidas foram analisadas com o *software* Fast PCR 6.2 para retirada de vetores e adaptadores, sendo posteriormente alinhadas no programa CAP3 (HUANG; MADAN, 1999) para obtenção dos *contigs* e *singletons*.

6.8 Comparação de sequências

As sequências obtidas dos fragmentos clonados foram comparadas com o banco de dados, GenBank, utilizando o aplicativo BLAST (www.ncbi.nih.gov/blast).

Todas as sequências foram analisadas individualmente utilizando o algoritmo tBLASTx.

6.9 Validação dos genes

Para a validação dos genes diferencialmente transcritos no fígado dos peixes foi utilizada a técnica de PCR em tempo Real (qPCR). Esta técnica exige a utilização de iniciadores específicos para cada gene de interesse.

Para as reações, foi utilizado o kit *QuantiFast™SYBR® Green PCR* (Qiagen) com o programa de ciclagem que incluíam a ativação da enzima a 95°C por 5 minutos, seguidos por 40 ciclos com desnaturação por 10 s a 95°C e 30 s de anelamento conforme a Tabela 1, com a quantificação de fluorescência. Ao término dos 40 ciclos, a temperatura foi elevada em 1°C a cada 5 s, partindo de 55°C até 99°C para realização da curva de dissociação. Todas as análises foram realizadas no aparelho Rotor Gene 6000 (Corbett Lifesciences) com rotor de 72 poços, Rotor-Disc 72 (Qiagen).

6.9.1 Desenho de iniciadores

Os iniciadores específicos foram desenhados a partir das sequências geradas nas bibliotecas subtrativas deste estudo, com o auxílio do software PrimerQuest (Integrated DNA Technology). Os seguintes genes foram selecionados: *Proteína serina/treonina quinase (RAF1a)*, *Hormônio de crescimento (GH)*, *Complexo principal de histocompatibilidade classe I A (MHCIA)*, *Fibrinogênio gama (FIB)*, *Proteína de choque térmico 70 (HSP70)*, *Determinante sexual double-sex and mab-3 related transcription factor 1 (DMRT1)* e *Proteína ribossomal 40S (40S)* para utilização como normalizador.

Outros iniciadores foram selecionados a partir de estudos anteriores realizados no Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica, que apresentaram genes semelhantes encontrados como: *Citocromo P450 família 1A (CYP1A)*, *Transferrina (TF)*, *Proteína do sistema complemento C3 (C3)*. Além destes, foram utilizados iniciadores para outros genes, por serem considerados de extrema importância na biotransformação, que foram: *Metiltransferase (MET)*, *Uridina difosfato glicuroniltransferase 1B (UDPGT)*, *Glutationa S-transferase (GST)*, além de β -*Actina (ACT)* (MATTOS et al., 2009) o *Fator de alongação 2 (EF2)* e a *Proteína ribossomal S2 (S2)* (FERREIRA, 2012 dados não publicados) para normalização da técnica (Tabela 1).

Tabela 1 Sequência de iniciadores senso (F) e anti-senso (R) dos genes de *Poecilia vivipara* selecionados: *Serina-treonina quinase (RAF1a)*, *Hormônio de crescimento (GH)*, *Complexo majoritário de hispocompatibilidade classe 1 A (MHCIA)*, *Fibrinogênio gama (FIB)*, *Determinante sexual (DMRT1)*, *Proteína ribossomal 40S (40S)*, *Proteína do sistema complemento C3 (C3)*, *Transferrina (TF)*, *Glutationa S-transferase (GST)*, *Citocromo P450 1A (CYP1A)*, *Metiltransferase (MET)*, *Uridina difosfato glicuroniltransferase 1B (UDPGT1B)*, β -*Actina (ACT)*, *Fator de Elongação 2 (EF2)* e *Proteína ribossomal S2 (S2)* e suas respectivas temperaturas de anelamento.

Gene	Iniciador	Sequência	Ta(°C)
RAF1a	F	agagggtgatctgatcctactgga	58
	R	gcactggattccaaatcgtgactg	
GH	F	agaacgaactcctgtagctgtctg	58
	R	tactgtggagggtcaaagctcttc	
MHCIA	F	gattcctgaaatgtggtggagagactcag	59
	R	catgtgacatgctgtactagaaac	
FIB	F	ggtttatgcatctccgagctcctccaaactg	62
	R	accacatgaagatcattccagtgagcc	
HSP70	F	ccatgtgtcaatgcagttatggacctagt	59
	R	tacctcctgggatgtaagaccgaa	
DMRT1	F	gatcttctggttctggtctgctctac	58
	R	gtggtgcgtagaagctgaatggtg	
40S	F	cttcactgggaatgtctctatccgtg	60
	R	gcactctccaacagtcacaatgtctccaac	
C3	F	ccaatcagtgagggtgtgtggttgaaca	58
	R	aggtgctacttccatgactagcccacaca	
TF	F	tctggtagagggtgctggtgacggtt	58
	R	gcagaattcacaccacgagcccagt	

Tabela 1 (continuação)

Gene	Iniciador	Sequência	Ta(°C)
<i>GST</i>	F	aacatcacccctgaacgagtcctacggc	58
	R	ggtgtcagctgtttccttggccct	
<i>CYP1A</i>	F	acacaaacgctgctacctgggagt	58
	R	cacagtcaacacaggccaccttcaga	
<i>MET</i>	F	atccacatcgccctgcaacaacgct	58
	R	ccagccacctgacagcacatgaaca	
<i>UDPGT1B</i>	F	tcaacaggctgctttcaggcacca	58
	R	aaggtgtggttatgccctggtg	
<i>ACT</i>	F	aaagccaacagggagaagatgacca	55
	R	tgacaccgtctccagagtccatcacaat	
<i>EF2</i>	F	actgtaagcgaggaatcagagggtg	58
	R	tactgtcagcgaggtaacggg	
<i>S2</i>	F	ggaaggaacagatgagcaggtagaag	58
	R	gccaatgtctttggatgagccc	

6.9.2 Padronização das reações de qPCR

A padronização das reações foi realizada utilizando-se uma curva de cDNA contendo 500 ng, 250 ng, 125 ng, 62,5 ng e 31,25 ng por reação de qPCR, para o cálculo da eficiência da reação. Neste caso, uma reação considerada ótima, teria a quantidade de cDNA duplicada a cada ciclo, o que corresponde a uma eficiência de 100%.

Utilizando o programa Corbett Rotor-Gene 6000 Application Software 1.7, os valores brutos de fluorescência foram transformados em uma escala logarítmica, tornando possível a delimitação do ciclo limiar (Ct) com base no coeficiente de correlação (R^2) e eficiência da curva, calculados pelo próprio equipamento.

6.9.3 Exposição de *P. vivipara* ao esgoto sanitário para validação

Os exemplares de *P.vivipara* foram mais uma vez coletados e aclimatados como descrito anteriormente (itens 6.1 e 6.2) e posteriormente expostos ao esgoto sanitário na concentração de 33% (v/v) por 96 h.

Foram utilizados quatro aquários de vidro com capacidade de 35 L, sendo dois aquários para o grupo exposto e dois para o grupo controle. Cada aquário recebeu um volume de 30 L de água do mar filtrada e diluída com água doce filtrada ou esgoto para atingir a salinidade 24 e continha 30 peixes.

Após 24 h, 18 fêmeas de cada grupo foram medidas e pesadas e em seguida mortas por transecção cervical, tendo seus fígados, brânquias e vesículas biliares retiradas, e congeladas em N₂ líquido e em seguida armazenadas em freezer -80°C.

Seis pools de tecidos de três indivíduos foram agrupados para posterior análise.

Após 48 h de exposição, a água dos aquários do grupo controle, bem como a solução de esgoto dos aquários do grupo exposto, foram totalmente renovadas. Ao final das 96h de exposição os animais foram processados conforme descrito anteriormente.

6.9.4 Extração de RNA total

O RNA total foi extraído dos pools de fígado de fêmeas do grupo controle e do grupo exposto, após 24 h e 96 h de exposição utilizando o protocolo para o reagente TRIzol (Invitrogen).

A concentração e pureza das amostras resultantes foram verificadas em espectrofotômetro Nanodrop, a 260, 280 e 320nm, e em seguida foram utilizadas para a reação de transcrição reversa.

6.9.5 Síntese de cDNA

As amostras de RNA total foram utilizadas para a síntese de DNA complementar (cDNA) pela ação da transcriptase reversa utilizando o kit QuantiTect Reverse Transcription (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. Novamente a concentração e a pureza das amostras de cDNA foram verificadas em Nanodrop.

Em seguida as amostras de cDNA foram diluídas para 100ng para utilização na técnica de qPCR.

7. PCR em tempo real (qPCR)

Após a padronização das reações para cada gene, foram realizadas as reações de qPCRs sempre com uma curva padrão em paralelo. A ciclagem e os dados colhidos foram os mesmos daqueles da etapa de padronização.

Com os dados obtidos, a quantificação relativa da transcrição de cada gene foi comparada utilizando o método de Ct ou $\Delta\Delta Ct$, que compara a transcrição de um gene alvo com um gene controle, neste caso, um grupo tratado contra um exposto. Porém os valores de transcrição destes genes devem ser relativizados por um normalizador, isto é, um gene que não apresente alteração em sua transcrição tanto no grupo controle, como no grupo tratado. O Ct (threshold), ou ciclo limiar é definido como o ciclo de PCR onde o sinal fluorescente do corante sinalizador cruza um limiar arbitrário, que deve estar na fase de amplificação exponencial, acima do background, e abaixo da fase de platô da reação (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008).

8. Análise estatística

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente pelo teste de Shapiro-Wilk para verificar a distribuição normal. Os dados paramétricos foram testados pela análise de variância em uma via (ANOVA) e os não paramétricos, pelo teste de Mann-Whitney, todos com nível de significância $\leq 0,05$ utilizando-se o programa *GraphPad Prism 5.0*.

9. RESULTADOS

Foram utilizadas amostras de RNAm de fígado de *P. vivipara* do grupo controle e do grupo exposto ao esgoto sanitário por 24 h para a obtenção de uma biblioteca subtrativa, visando a identificação de novos biomarcadores de contaminação aquática para a espécie.

Para a biblioteca subtrativa de genes induzidos, foram sequenciados 185 fragmentos de cDNA, resultando em 42 contigs e 63 singletons. As sequências anotadas foram classificadas segundo sua função biológica, como transporte transmembrana, sistema imune, transferase, anidrase carbônica, Fase I de biotransformação, somatotropina (Tabela 3).

Os resultados da biblioteca subtrativa de genes reprimidos são de 230 fragmentos de cDNA sequenciados que geraram 71 contigs. As sequências anotadas foram classificadas como funções biológicas de diferenciação sexual, efluxo de colesterol, coagulação sanguínea, fosforilação oxidativa, importação nuclear, sistema imune, transporte de ferro, metabolismo de aminoácidos, chaperona, protease, formação do citoesqueleto e maturação de vesículas sinápticas (Tabela 4). Foram encontradas proteínas ribossomais 16S e 40S nas duas bibliotecas, portanto não foram incluídas nas tabelas citadas.

Depois de escolhidos os genes para validação, e desenhados os iniciadores, os mesmos foram testados nas reações de padronização. Todos os genes testados, incluindo os escolhidos de outras bibliotecas subtrativas para a espécie *P. vivipara* obtiveram resultados de eficiência dentro do limite necessário para aplicação do método do $\Delta\Delta CT$ comparativo (Tabela 2). Porém, os genes para *GH*, *RAF1a* e *MHCIA* foram descartados. O primeiro apresentou a formação de diversos produtos na curva de dissociação, o segundo não amplificou e o terceiro começou a amplificar próximo ao trigésimo ciclo e apenas em algumas duplicatas.

Tabela 2 Valores de correlação (R^2), inclinação da reta (M) e eficiência da reação (100%=1) para as curvas padrões geradas na padronização das reações de qPCR.

Gene	R^2	Inclinação	Eficiência
<i>GST</i>	0,977	-3,320	1,00
<i>CYP1A</i>	0,994	-3,331	1,00
<i>MET</i>	0,980	-3,205	1,05
<i>C3</i>	0,998	-3,279	1,02
<i>ACT</i>	0,951	-3,455	0,95
<i>S2</i>	0,973	-3,236	1,04
<i>UDPGT1B</i>	0,956	-3,205	1,05
<i>EF2</i>	0,978	-3,304	1,01
<i>DMRT1</i>	0,990	-3,216	1,05
<i>40S</i>	0,975	-3,295	1,01
<i>FIB</i>	0,996	-3,316	1,00
<i>HSP70</i>	0,996	-3,271	1,02
<i>TF</i>	0,998	-3,203	1,05

Foram testados como normalizadores a β -Actina, as proteínas ribossomais 40S e S2, e o Fator de *elongação 2*, e as análises estatísticas mostraram que para este propósito, somente os genes das proteínas ribossomais puderam exercer este papel, visto que a β -Actina e o Fator de *elongação* apresentaram alterações significativas na transcrição entre os

grupos (Figura 2). A média entre os valores de CT de 40S e S2 foram utilizadas como normalizador das reações dos genes de interesse, estando de acordo com o método proposto por Schmittgen e Livak (2008).

Os peixes *P. vivipara* apresentaram uma repressão na transcrição dos genes hepáticos *C3*, *FIB*, *DMRT1* e *TF* após 24 h de exposição ao esgoto em 5,95, 1,8, 3,03 e 3,33 vezes respectivamente (Figura 3). Foi observado um aumento na transcrição dos genes *GST*, *MET* e *UDPGT1B*, respectivamente de 2,6, 1,9 e 4,8 vezes após 96 h de exposição. A transcrição de *CYP1A* apresentou um aumento de 2,2 vezes após 24h e de 4,2 vezes após 96 h de exposição (Figura 4).

O único gene que não apresentou alteração na sua transcrição no fígado dos animais expostos foi aquele que codifica a Proteína de choque térmico 70 representando um falso positivo da técnica (Figura 4).

Tabela 3 Lista gerada pela SSH de genes induzidos pela exposição ao esgoto sanitário 33%(v/v) durante 24h em fígado de peixes *Poecilia vivipara*. Na tabela estão dispostas informações sobre a função biológica do gene, probabilidade de identificação imprecisa do gene (e-value) e tamanho do fragmento em pares de base (pb).

Função biológica	Homólogo (proteína ou DNA)	Espécie comparada	Nome da sequência	e-value	Tamanho do fragmento (pb)
Sistema imune	<i>Domínio C2 (similar CC2D1A)</i>	<i>Danio rerio</i>	Contig 21	7e-18	446
	<i>Similar ao domínio tipo dedos de zinco CCCH (ZC3HDC1)</i>	<i>Danio rerio</i>	Contig 39	0.21	557
	<i>Complexo principal de histocompatibilidade classe I (MHC-classIA)</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	Singleton 57	1e-07	352
Transporte transmembrana	<i>Família transportadora de soluto 4 trocador de ânions membro 2 (SLC4A2)</i>	<i>Danio rerio</i>	Contig 35	2.0	236
Transferase	<i>Serina-Treonina quinase (RAF1A)</i>	<i>Salmo salar</i>	Singleton 10	0.27	633
	<i>Carreador de treonina (tRNA-Thr)</i>	<i>Cyprichromis cf. leptosoma</i>	Singleton 34	0.13	393
Anidrase carbônica	<i>Anidrase carbônica XVI c (CA16C)</i>	<i>Danio rerio</i>	Singleton 41	2.0	548
Fase I de Biotransformação	<i>Citocromo P450 1A (CYP1A)</i>	<i>Rivulus marmoratus</i>	Singleton 53	0.53	243
Somatotropina	<i>Hormônio de crescimento (GH)</i>	<i>Poecilia reticulata</i>	Singleton 54	0.43	421

continuação...

Diferenciação/Crescimento celular	<i>Receptor beta B do fator de crescimento derivado plaquetário (PDGFRBB)</i>	<i>Astotilapia burtoni</i>	Contig 18	3e-15	318
-----------------------------------	---	----------------------------	-----------	-------	-----

Tabela 4 Lista gerada pela SSH de genes reprimidos pela exposição ao esgoto sanitário 33%(v/v) durante 24h em fígado de peixes *Poecilia vivipara*. Na tabela estão dispostas informações sobre a função biológica do gene, probabilidade de identificação imprecisa do gene (e-value) e tamanho do fragmento em pares de base (pb).

Função biológica	Homólogo (proteína ou DNA)	Espécie comparada	Nome da sequência	e-value	Tamanho do fragmento (pb)
Diferenciação sexual	<i>DMRT1</i>	<i>Kryptolebias marmoratus</i>	Contig 2	2e-54	905
Efluxo de colesterol	<i>Apolipoproteína 14KDA</i>	<i>Oplegnathus fasciatus</i>	Contig 1	5e-11	221
Coagulação sanguínea	<i>Fibrinogênio, polipeptídio gama</i>	<i>Danio rerio</i>	Contig 5	2e-09	356
Fosforilação oxidativa	<i>Citocromo B (CYPB)</i>	<i>Poecilia vivipara</i>	Contig 8	6e-66	374
Importação nuclear	<i>Importina 9</i>	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	Contig 14	1.9	519
Sistema imune	<i>Proteína do sistema complemento C3 (C3)</i>	<i>Fundulus heteroclitus</i>	Contig 16	7e-37	216
Metabolismo do ferro e sistema imune	<i>Transferrina (TF)</i>	<i>Fundulus heteroclitus</i>	Contig 38	6e-16	301

continuação...

Metabolismo de aminoácidos	<i>Serina-piruvato aminotransferase</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	Contig 28	5e-50	370
Chaperona	<i>Proteína de choque térmico 70 (HSP70)</i>	<i>Poecilia reticulata</i>	Contig 39	2e-48	298
Protease	<i>Inibidor de serina/cisteína protease</i>	<i>Xiphophorus hellerii</i>	Contig 46	5e-06	106
Citoesqueleto	<i>Isoforma da cadeia pesada de miosina do músculo liso (mMYH-2)</i>	<i>Oryzias latipes</i>	Contig 52	2e-19	252
Maturação de vesículas sinápticas	<i>Proteína unc-13 homóloga tipo B</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	Contig 55	0.002	564

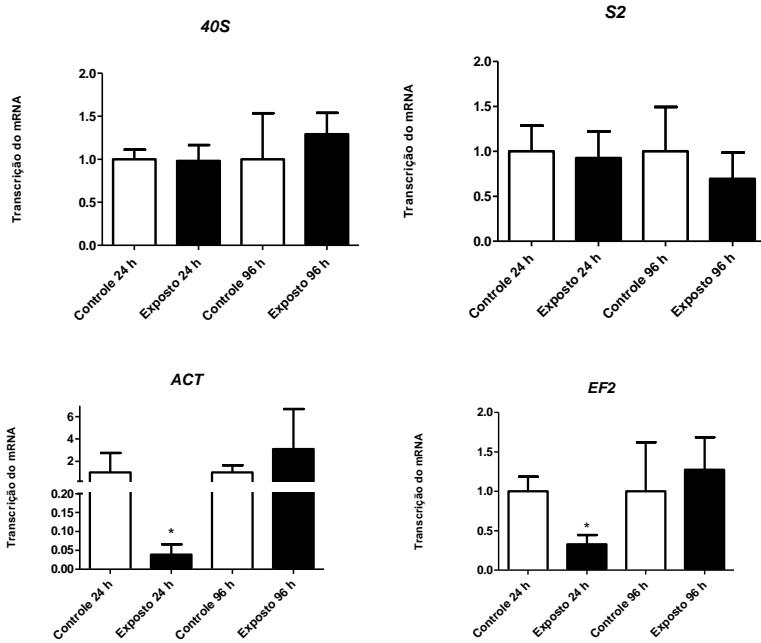


Figura 2. Transcrição dos genes candidatos a normalizadores. O asterisco (*) representa diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle. O eixo y representa quantas vezes o gene aumentou ou diminuiu em relação ao seu controle. Os dados estão representados por valores de média e desvio padrão.

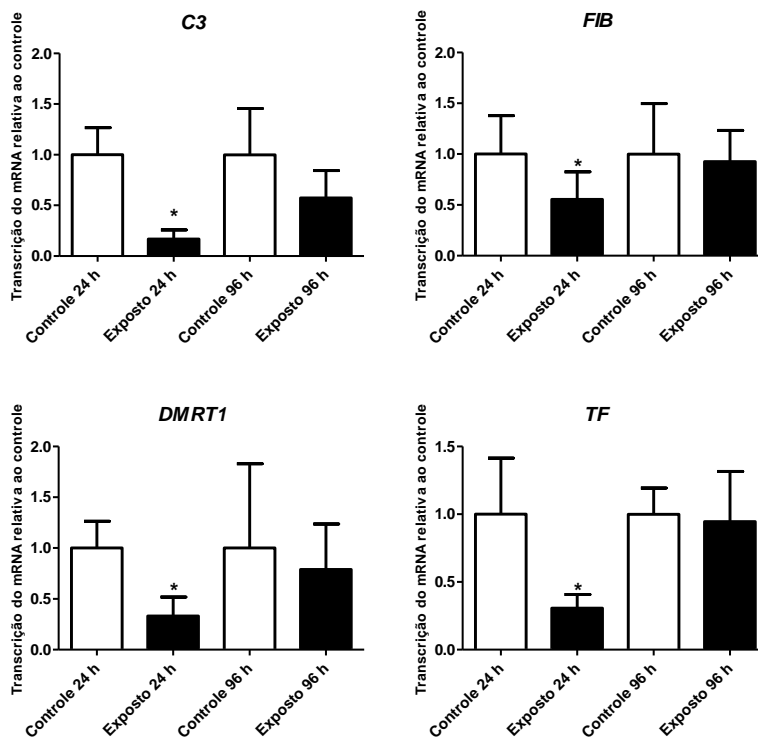


Figura 3. Transcrição gênica e validação por RT-PCR quantitativo dos genes reprimidos identificados na SSH para o grupo de peixes expostos ao esgoto sanitário 33% após 24 h e 96 h de exposição. O asterisco (*) representa diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle. O eixo y representa quantas vezes o gene aumentou ou diminuiu em relação ao seu controle. Os dados estão representados por valores de média e desvio padrão.

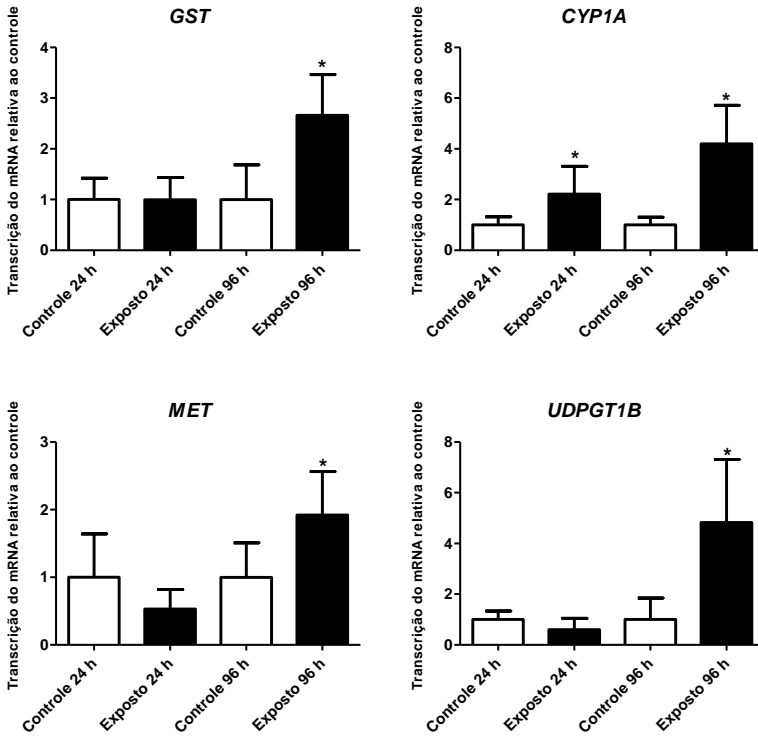


Figura 4. Transcrição gênica e validação por RT-PCR quantitativo dos genes induzidos para o grupo de peixes expostos ao esgoto sanitário 33% após 24 h e 96 h de exposição. O asterisco (*) representa diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle. O eixo y representa quantas vezes o gene aumentou ou diminuiu em relação ao seu controle. Os dados estão representados por valores de média e desvio padrão.

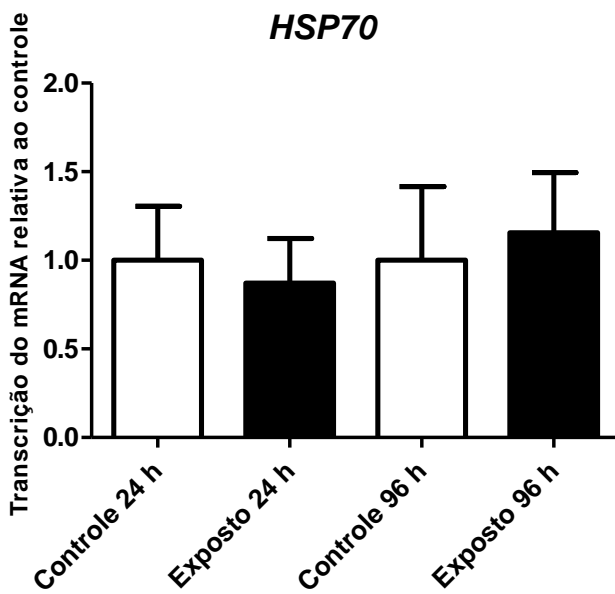


Figura 5. Transcrição gênica por RT-PCR quantitativo da *HSP70* identificada na biblioteca subtrativa de genes reprimidos do grupo de peixes expostos ao esgoto sanitário 33% após 24 h e 96 h de exposição.

10. DISCUSSÃO

A SSH é uma técnica bastante eficiente para identificar genes diferencialmente transcritos comparando-se duas populações de RNAm. Neste trabalho, esta técnica foi utilizada para possibilitar a identificação de novos biomarcadores moleculares em peixes nativos expostos ao esgoto sanitário, que se constitui em um dos principais problemas ambientais de contaminação dos corpos d'água na atualidade. Este estudo visou uma maior compreensão das respostas moleculares frente à exposição ao esgoto sanitário em uma espécie de peixe modelo (*P. vivipara*) pertencente à família Poeciliidae, praticamente cosmopolita no ambiente aquático.

Nas bibliotecas subtrativas foram identificados genes referentes a diversos processos biológicos, desde crescimento e diferenciação sexual, até biotransformação e sistema imune.

10.1 Sistema de Biotransformação de Fase I

Neste trabalho foi identificado um gene correspondente ao processo de biotransformação, o *citocromo P450 da família 1A (CYP1A)* que foi induzido nos peixes expostos ao esgoto sanitário em 24 horas, e praticamente dobrando sua taxa transcricional após 96 h de exposição. O Citocromo P450 é uma superfamília de enzimas do sistema de monooxigenases de função mista, que apresenta um papel central no metabolismo oxidativo e detoxificação de várias substâncias naturais ou xenobióticas. A subfamília *CYP1A* e a enzima *etoxiresorufina-O-deetilase (EROD)*, expressão catalítica de *CYP1A* (BAINY; WOODIN; STEGEMAN, 1999), desempenham uma importante função na biotransformação de compostos orgânicos, incluindo PAHs, PCBs e dioxinas (WILLIAMS; LECH; BUHLER, 1998; BAINY; WOODIN; STEGEMAN, 1999; CAJARAVILLE et al., 2000; FREIRE et al., 2008).

CYPs são essenciais no metabolismo de xenobióticos e sua função pode estar relacionada a diferenças inter-específicas quanto a susceptibilidade aos efeitos tóxicos de produtos químicos. São amplamente utilizados como biomarcadores de contaminação aquática, já que são induzidos por compostos

tóxicos (BAINY; WOODIN; STEGEMAN, 1999; JONSSON et al., 2010).

Uma via endógena envolvendo cAMP, parece ativar o receptor de hidrocarbonetos aromáticos (AHR) para translocação nuclear e medeia a expressão gênica para eventos fisiológicos normais, sendo que ativações persistentes de AHR por xenobióticos pode mediar vários eventos tóxicos em tecidos incluindo fígado e sistema vascular e imune (CURTIS et al., 2011).

Muitos estudos têm observado alterações na transcrição de *CYP1A* em fígado de peixes teleósteos oriundos do ambiente e também em experimentos laboratoriais (WANG et al., 2010b).

Curtis e colaboradores (2011) observaram que as proteínas de *CYP1A* catalisaram mais de 98% da atividade da EROD em truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss* expostas a benzo[a]pireno e benzo[e]pireno. Estudando a mesma espécie, Jonsson et al (2010) relataram a indução da transcrição de *CYP1A* e *CYP1B* em peixes expostos a diferentes ambientes.

Em monitoramentos ambientais, Williams, Lech e Buhler, (1998) descrevem a indução de *CYP1A* em trutas arco-íris, devido a vários carcinógenos genotóxicos, bem como a modulação de CYPs por xenoestrógenos.

Através da SSH e de técnicas de microarray, Williams e colaboradores (2003) observaram um aumento na transcrição de *CYP1A* no linguado *Platichthys flesus* coletados em um estuário poluído.

Utilizando *P. vivipara* expostos por 24h a fração de óleo diesel acomodada em água, Mattos e colaboradores (2009) observaram um aumento significativo de *CYP1A* em fígado. Zanette e colaboradores (2009) encontraram novas isoformas de *CYP1* em peixes *Fundulus heteroclitus* e *P.vivipara*. Bairy, Woodin e Stegeman (1999) utilizaram a atividade de múltiplas formas de CYPs em tilápia como bioindicador de qualidade de água, observando um aumento da atividade de *CYP1A*. De forma similar, Regoli e colaboradores (2011) observaram um aumento de *CYP1A* em enguias *Anguilla anguilla* expostas a sedimentos contaminados em condições laboratoriais.

Os trabalhos supracitados corroboram os resultados obtidos neste estudo, onde a taxa de transcrição de *CYP1A* mostrou-se uma ferramenta importante como biomarcador de contaminação aquática, neste caso por esgoto sanitário.

10.2 Sistema de Biotransformação de Fase II

Estudos anteriores realizados em fígado de peixes *P. vivipara* expostos à fração acomodada em água de óleo diesel, observaram um aumento na transcrição de genes que codificam enzimas de biotransformação de Fase II, tais como a *GST*, a *UDPGT1B* e *MET*, sendo que também foi observado um aumento na atividade enzimática de *GST* (Mattos et al., 2009). Devido à função destes genes na detoxificação de xenobióticos e a utilização do mesmo organismo modelo, estes genes também foram testados no presente estudo.

Neste trabalho foi observado o aumento na transcrição dos genes de *CYP1A*, *GST* e *UDPGT1B* no fígado dos peixes expostos ao esgoto sanitário, o que pode ter sido induzido pelos PAHs presentes neste efluente ou outro tipo de agonista dos receptores AHR. Tanto a *GST* quanto o *UDPGT1B* apresentaram um aumento na transcrição hepática após 96 h de exposição. A transcrição do *CYP1A* apresentou um aumento já após 24 h do início da exposição e praticamente duplicou após 96 h. Com base nestes resultados pode-se sugerir que a resposta inicial dos sistemas de biotransformação de fase I tenha tornado os compostos originais em metabólitos mais adequados para a reação com as enzimas de Fase II (*GST* e *UDPGT1B*), que teriam suas respostas de aumento de transcrição temporalmente subsequentes.

As *GST* são descritas como as principais e mais distribuídas enzimas de fase II que conjugam glutationa a substratos eletrofílicos (BOUTET; TANGUY; MORAGA, 2004) e atuam na defesa contra o dano oxidativo e produtos peroxidativos de DNA e lipídios (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003), podendo ser modulados por AHR e fatores de transcrição NRF2 (KONISHI et al., 2005). A avaliação de sua atividade, assim como a da enzima catalase têm sido amplamente utilizadas em estudos laboratoriais e em programas de biomonitoramento ambiental, tanto em peixes quanto em moluscos como organismos sentinela (VIARENGO et al., 2007).

Vários autores relacionam um aumento na atividade da *GST* com a exposição a contaminantes, tais como em truta arco-íris expostas cronicamente ao fungicida propiconazol (LI et al., 2010). Qu et al (2011) associam este aumento à detoxificação

de microcistina do fígado de carpas *Hypophthalmichthys molitrix* tratadas com esta hepatotoxina. Em uma biblioteca subtrativa de *Crassostrea gigas* expostas à fração acomodada de combustíveis em água, tanto genes induzidos, quanto reprimidos de diferentes isoformas de GST foram encontrados (BOUTET; TANGUY; MORAGA, 2004).

Burnett e colaboradores (2007) citam que peixes *Fundulus heteroclitus* apresentam diversas adaptações bioquímicas e moleculares, que podem estar relacionadas com sua capacidade de sobreviver em ambientes contaminados. Entre estas, estão o aumento das atividades da GST, UDPGT, de enzimas antioxidantes e da glicoproteína P hepáticas.

A síntese de glicuronídeos pela UDPGT microsomal é a maior via de inativação e excreção subsequente de compostos orgânicos xenobióticos e endógenos em peixes (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Segundo os mesmos autores, diversas isoformas com diferentes especificidades por substrato estão presentes em peixes, sendo que a isoforma que preferencialmente conjuga fenóis planares é induzida por PAHs. A atividade da UDPGT é considerada o parâmetro mais responsivo nas reações de fase II aos poluentes.

No presente estudo, também foi observado um aumento na transcrição do gene da *MET* no fígado dos peixes expostos por 96h ao esgoto sanitário.

Estudos por similaridade com a sequência de *Danio rerio* sugerem que o gene da metiltransferase codifica para uma proteína com atividade Catecol-O-Metiltransferase (COMT). Em humanos, estrógenos de catecol como o 2- e 4-hidroxiestradiol (2-OH-E₂ e 4-OH-E₂) são rapidamente O-metilados formando monometil éteres catalisados pelo COMT utilizando S-adenosil-L-metionina (AdoMet) como doador de metil (ZHU et al., 2008). COMT inativa hormônios, neurotransmissores e xenobióticos contendo grupos catecóis (TENHUNEN et al., 1994). Estudos *in vitro* têm demonstrado que várias drogas podem afetar a atividade enzimática de MET, geralmente baixando a atividade (LOIT et al., 2011).

O aumento da transcrição gênica de *MET* pode estar associado à presença de possíveis estrógenos na água, bem como xenobióticos com grupos catecol.

10.3 Genes relacionados ao Sistema Imune

Nas bibliotecas subtrativas deste estudo, foram encontrados genes relacionados ao sistema imune que foram agrupados por pertencerem ao sistema propriamente dito, ou por exercerem funções relacionadas, acarretando em mudanças moleculares e fisiológicas do organismo.

O gene *C3* encontrado na biblioteca reprimida, foi validado por qPCR, apresentando uma inibição da transcrição gênica após 24 h de exposição. Dentre as proteínas do sistema complemento, a *C3* é uma molécula central envolvida no sistema imune inato e sua ativação é essencial para todas as funções realizadas por este sistema. (QI et al., 2011). Esta proteína é derivada de hepatócitos da fase aguda, conhecidos por serem induzidos em peixes teleósteos em respostas a infecções bacterianas (WILLIAMS et al., 2003).

Dentre as funções de *C3*, estão a produção de moléculas de opsonina, anafilatoxinas, morte direta de patógenos, manutenção da homeostase (QI et al., 2011; BO et al., 2012) e recentemente, descobriu-se que o sistema complemento desempenha papéis importantes em processos como a hematopoiese, desenvolvimento vascular e esquelético, reprodução e regeneração de membros (QI et al., 2011).

Qi e colaboradores (2011) observaram uma indução na transcrição do gene *C3* no peixe *Epinephelus coioides* mantido em diferentes condições de temperatura e pH, e que este gene está envolvido nas respostas ao estresse ambiental.

Outro gene encontrado neste estudo foi o referente ao *complexo principal de histocompatibilidade (MHC)*, que é um sistema de defesa imune que atua no reconhecimento e apresentação de antígenos. Dividem-se em dois grupos, os de classe I, que interagem com o CD8 de linfócitos T e os de classe II que ativam o CD4 dos linfócitos T mediando a imunidade humoral (ZHU et al., 2012). Não foi possível a validação deste gene por problemas de amplificação dos iniciadores.

Já as *transferrinas*, que também foram encontradas nos genes reprimidos, puderam ser avaliadas, resultando em uma redução de transcritos nos animais expostos ao esgoto sanitário por 24 h. As transferrinas são glicoproteínas monoméricas provavelmente ubíquas em metazoários, mais conhecidas por

sua capacidade de sequestrar e transportar ferro não heme e pela habilidade de alguns homólogos de responder em atividades imunes (LAMBERT, 2011). São primeiramente expressas no fígado e em seguida liberadas na corrente sanguínea. Nos vertebrados as transferrinas séricas são essenciais no transporte de Fe(III) em resposta aos ligantes do receptor e a mudanças no pH. Algumas famílias de transferrinas como as lactoferrinas e melanotransferrinas também podem se ligar ao ferro, enquanto outras perderam esta habilidade, ganhando novas funções como inibição da anidrase carbônica em mamíferos (LAMBERT, 2011).

A anidrase carbônica é uma família de metaloenzimas que catalizam a rápida conversão de dióxido de carbono e prótons em bicarbonato, e que também foram identificadas pela técnica de SSH deste estudo. Em animais, desempenham um papel chave no controle de pH fisiológico, balanço gasoso e calcificação (CEYHUN et al., 2011).

Um dos genes identificados no presente estudo pertence à família das serina-cisteína proteases. Enzimas proteolíticas são biocatalizadores que hidrolisam ligações peptídicas, sendo classificados de acordo com a reação catalisada ou com o aminoácido alvo do sítio catalítico (BEZERRA et al., 2001).

Em animais aquáticos, as serino-proteases como a tripsina, quimiotripsina e elastase, são as mais estudadas entre os teleósteos, e estão relacionadas na coordenação de vários processos fisiológicos como digestão, resposta imune, coagulação sanguínea e reprodução (BEZERRA et al., 2001).

Alguns antiretrovirais têm como mecanismo básico de ação, a inibição de proteases, como anti-herpéticos (Aciclovir, Docosanol) anti-influenza (Amantadina, Peramivir), anti-hepatite (Adefovir, Lamivudina) e outros (Interferons) (MOLINARO et al., 2010).

A ativação da via clássica do sistema complemento é feita por uma serino-protease e neste trabalho, tanto as *serino-protease* quanto C3 foram inibidos sugerindo uma possível redução na capacidade imune dos peixes expostos.

Muitos autores sugerem que várias serino-proteases pertencem ao sistema de coagulação e podem ativar a cascata do sistema complemento independentemente das três vias estabelecidas (via clássica, via alternativa e via da lectina) (BO et al., 2012). Todas as vias convertem à via Lítica que leva a opsonização ou morte direta de microorganismos invasores.

Cisteíno-proteases agem de forma semelhante às serino-proteases, alterando apenas o sítio catalítico e estando envolvidas na degradação de proteína intracelulares e defesa imune (BO et al., 2012). Peixes da espécie *Oryzias latipes* (Medaka) infectados por bactérias apresentaram um aumento na transcrição de apolipoproteína e a cisteíno-proteases (BO et al., 2012).

As apolipoproteínas ligam-se aos lipídios formando lipoproteínas que transportam os lipídios através dos sistemas, linfático e circulatório. O seu papel primário é o transporte reverso de colesterol, onde a via leva o colesterol das células extra-hepáticas para serem secretadas no fígado. A apolipoproteína A-I pode ter uma função na defesa inata contra patógenos bacteriais ou vírus em peixes teleósteos (CHOUDHURY et al., 2009; BO et al., 2012).

Neste estudo, a técnica de SSH identificou os genes *C3*, *apolipoproteína 14kDa*, *MHC classe I*, *fibrinogênio gama* e *transferrina* na lista de genes reprimidos, sendo que *C3*, *FIB* e *TF* foram validados e apresentaram uma redução na sua taxa de transcrição no fígado de peixes expostos por 24 h ao esgoto sanitário.

Hall et al (2011) em uma SSH realizada com a espécie de peixe *Osmerus mordax* expostos a um modelo de frio induzido por glicerol, identificaram genes induzidos para *C3*, *apolipoproteína C* e *TF*. Utilizando a mesma técnica em carpa prateada injetada intraperitonealmente com microcistina, Qu et al (2011) encontraram genes induzidos para *C3*, *apolipoproteína 14kDa*, *MHC classe I*, *fibrinogênio beta* e *transferrina*.

C3 pode ter sido reprimido pela supressão das respostas de fase aguda nos peixes submetidos ao esgoto. No presente trabalho, os peixes do grupo exposto ao esgoto apresentaram hemorragias ao longo do corpo, o que pode estar relacionado à baixa expressão de *FIB* em 24 h.

O fibrinogênio é uma proteína do plasma que pode ser transformada em uma rede de fibrinas insolúveis pela ação da trombina e fator XIIIa nos estágios finais da cascata de coagulação sanguínea. É um dímero de duas metades iguais com três cadeias polipeptídicas cada, designadas A α , B β e γ , que são interligados por pontes dissulfeto (MANSETH et al., 2004). Sendo uma proteína de fase aguda, o fibrinogênio pode aumentar sua expressão nos processos inflamatórios e em

concentrações altas pode ocasionar doença cardiovascular aterosclerótica e ocorrências de eventos isquêmicos, e em baixas concentrações, está associado a doenças hepáticas, lesões na medula óssea subnutrição e hemorragias de caráter grave (MOLINARO et al., 2010).

Foi identificado na lista de genes, um que codifica uma proteína de choque térmico 70, porém, a mesma não foi validada por PCR quantitativo, tornando-se possivelmente um resultado falso positivo obtido pela técnica do SSH.

10.4 Trocadores de ânions

Na biblioteca subtrativa de genes induzidos, foi encontrada uma sequência homóloga ao de zebrafish, *SLC4A2* que é um trocador de ânions. Trocadores de cloreto e bicarbonato da superfamília de genes *SLC4* e *SLC26* controlam o pH intracelular, volume das células e concentração de Cl^- intracelular em quase todos os tecidos. Em mamíferos o *SLC4A1/AE1* é expresso inicialmente nos eritrócitos e em células intercaladas do tipo A dos ductos renais coletores (SHMUKLER et al., 2005).

Os polipeptídeos do homólogo AE2 codificam um trocador de ânions eletroneuro, Na^+ -voltagem-independente, inibida por pH intracelular e extracelular, e induzida por NH_4^+ . Em *Danio rerio* e camundongo o trocador de ânions é regulado de forma aguda e independentemente, por pH intra e extracelular e por NH_4^+ (SHMUKLER et al., 2008).

Provavelmente neste estudo, por se tratar de uma exposição ao esgoto sanitário não tratado, a concentração de nitrogênio amoniacal pode ter sido responsável pela indução do *SLC4* de *P.vivipara*. No entanto, não foram avaliados os níveis de amônia nas amostras utilizadas.

10.5 Serina/treonina quinase e receptor do fator de crescimento plaquetário

Na biblioteca de genes induzidos, foram encontrados genes que codificam uma *serina/treonina quinase (RAF1)* e um *receptor beta do fator de crescimento derivado plaquetário (PDGFRBB)*.

Funções como proliferação, diferenciação e morte celular, são processos coordenados que auxiliam na manutenção da homeostase. Fatores de crescimento desempenham um papel central no controle destes processos, funcionando como desencadeadores das cascatas de transdução de sinal, após ligação com seus receptores cognatos de membrana. Qualquer componente desta cascata pode ser desregulado contribuindo para eventos de transformação e tumorigênese (WEINSTEIN-OPPENHEIMER et al., 2000).

Raf é uma enzima proto-oncogênese de serina/treonina quinase que em humanos é codificada pelo gene *RAF1*, funcionando na via do MAPK/ERK como parte da cascata de proteína quinase. (WEINSTEIN-OPPENHEIMER et al., 2000).

O *PDGF* é membro da família de receptores do fator de crescimento derivado plaquetário transmembrana, que contém uma atividade de Y quinase intrínseca, e pode induzir a ativação da via Ras-Raf-MEK-ERK. Mutações pontuais, deleção, rearranjos e amplificação gênica são responsáveis pela ativação da expressão de *Raf* (WEINSTEIN-OPPENHEIMER et al., 2000), que envolve uma complexa série de eventos que incluem recrutamento de membrana, fosforilação e defosforilação, desorganização e formação de várias interações proteína-proteína (CHONG; VIKIS; GUAN, 2003).

O aumento da expressão de *Raf* está envolvido com o aumento da incidência de vários tipos de câncer (WEINSTEIN-OPPENHEIMER et al., 2003).

Pode-se sugerir a hipótese de que a indução destes dois genes pode estar associada diretamente nos sinais anti-apoptóticos. O dano ao DNA e o estresse oxidativo causados pela mistura de compostos complexos presentes no esgoto sanitário, bem como a presença de patógenos, podem gerar estímulos fisiológicos nos peixes expostos, culminando na apoptose celular.

10.6 Diferenciação e determinação sexual

Um gene de maturação e diferenciação sexual, o *DMRT1*, foi encontrado reprimido em animais expostos ao esgoto sanitário pela SSH, e sua repressão foi confirmada por testes de qPCR.

DMRT1 é um gene que codifica para uma proteína com um motivo de ligação de DNA, que foi recentemente caracterizado em humanos como contrapartida a dois genes envolvidos na diferenciação sexual de invertebrados, o *doublesex (dsx)* de drosófilas e o *mab3* de nematódeos e está envolvido na diferenciação e maturação sexual de vertebrados como aves, répteis, mamíferos e peixes (MARCHAND et al., 2000; WANG et al., 2010a).

A transcrição deste gene está associada em vertebrados, ao fenótipo masculino implicando na diferenciação testicular inicial (WANG et al., 2010a). Marchand et al., (2000) acreditam que o *DMRT1* em peixes, pode ter um papel mais crucial na diferenciação sexual que nos mamíferos, visto que não foram encontrados equivalentes de *Sry* (gene determinante sexual no cromossomo y de mamíferos).

Estudos em tilápia demonstraram que o *DMRT1* é um repressor natural da aromatase (*CYP19A1*), que é um de seus alvos, e que o mesmo é um repressor dos genes da via feminina. Nestes peixes, o estrogênio é um indutor natural da diferenciação do ovário, entretanto, *DMRT1* suprime a via feminina pela repressão da transcrição gênica da aromatase e produção de estrogênio pela gônada (WANG et al., 2010a).

O 17 β -estradiol é um dos esteróides mais consumidos como forma de contraceptivo e sua detecção no ambiente é proveniente de esgoto sanitário não tratado, remoção incompleta nas estações de tratamento de esgoto, ou por compostos inativados em formas conjugadas por glicuronação ou sulfatação, que podem se tornar ativas pela ação de desconjugação das bactérias no ambiente ou na própria estação de tratamento. Além disso, compostos como PCBs, alquil fenóis e ésteres fitalatos, mimetizam estrógenos naturais (FROEHNER et al., 2012).

Com base nestes estudos pode-se sugerir que a ação destes hormônios possivelmente presentes no esgoto tenham sido responsáveis pela alteração da transcrição gênica observada.

11. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos neste trabalho podemos chegar às seguintes conclusões:

- A técnica de SSH apresentou-se como uma ferramenta adequada na busca de novos biomarcadores moleculares em peixes *P. vivipara* expostos ao esgoto sanitário.

- As funções mais afetadas encontradas foram as de biotransformação que tiveram suas expressões aumentadas, e as funções do sistema imune, que em geral foram reprimidas.

- Quatro genes foram validados pela técnica de PCR em Tempo Real, com *CYP1A* induzido, *DMRT1*, *FIB*, *C3* e *TF* reprimidos.

- Os genes de biotransformação de fase II *MET*, *UDPGT* e *GST* testados, também foram induzidos, confirmando sua eficiência como biomarcadores para contaminação aquática em fígado de *P. vivipara*.

- Os genes induzidos, possivelmente tiveram sua transcrição alterada devido à ativação do AHR de compostos prováveis do esgoto sanitário, como PAHs, fármacos, entre outros.

- A repressão de genes como *C3* e *FIB* sugere que além dos patógenos, outros compostos encontrados no esgoto sanitário, podem afetar diretamente o sistema imune de animais aquáticos.

12. CAPITULO II

ANÁLISE DA TRANSCRIÇÃO GÊNICA DIFERENCIAL EM FÍGADO DE PEIXES *Poecilia vivipara* EXPOSTOS *in situ* AO ESGOTO SANITÁRIO

13. INTRODUÇÃO

Mangues são importantes ecossistemas que fazem interface entre os ambientes marinhos e terrestres ao longo da zona costeira de regiões tropicais e subtropicais (FROEHNER et al., 2012). Ecossistemas de terras úmidas e florestas de mangue fornecem até 21 tipos de serviço ecológico, dentre eles, proteção contra cheias, prevenção da erosão costeira e como reguladores de salinidade, além de promoverem a diversidade de espécies (LEWIS; PRYOR; WILKING, 2011). Os mangues possuem uma grande produção primária, abundância em detritos, são ricos em carbono orgânico e com condições oxi-redutivas, o que tornam estes locais ideais para absorção de poluentes antropogênicos (FROEHNER et., 2012).

Várias perturbações ocasionadas pelo homem vêm afetando o ambiente estuarino, contribuindo para alteração do habitat e mudando a estrutura e dinâmica das comunidades bióticas. Problemas ambientais encontrados nestes sistemas invariavelmente resultam da superpopulação e desenvolvimento descontrolado das bacias hidrográficas costeiras, bem como as atividades humanas nas próprias enseadas estuarinas (KENNISH, 2002).

Sistemas de água doce em estações de tratamento de esgoto são expostos a uma mistura complexa de poluentes com propriedades de desregulação endócrina que pode ter efeitos negativos sobre as populações animais. Devido à vasta natureza dos químicos despejados pelas estações de tratamento no ambiente com efeitos variados, sendo alguns de mecanismos de toxicidade antagônicos, a resposta integrada em peixes expostos é praticamente imprevisível e deve ser testada (SOLÉ et al., 2003).

Monitorar os tipos e quantidades de substâncias tóxicas que entram constantemente no ambiente é uma tarefa exaustiva, e mesmo que inúmeros métodos analíticos estejam disponíveis, coletar amostras suficientes em tempo hábil é um grande obstáculo na avaliação de danos ambientais (SILVA; HEUSER; ANDRADE, 2003). Medidas de rotina na coluna d'água não podem ser feitas quando as concentrações estão sempre próximas ou abaixo do limite de detecção, além de que essas

análises, quando possíveis, requerem aparatos caros e analistas habilidosos (LAM; GRAY, 2003).

Para contornar estas dificuldades, o monitoramento ambiental, utilizando testes em sistemas biológicos, propiciam ferramentas mais adequadas para a identificação de poluentes capazes de causar dano à saúde do homem e ao ambiente (LAM; GRAY, 2003; SILVA; HEUSER; ANDRADE, 2003; VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

Os programas de monitoramento nacionais e internacionais levaram muitos anos para chegar a um senso comum, entretanto as pesquisas em biomarcadores não pararam, levando ao contínuo desenvolvimento de técnicas mais sensíveis, mais confiáveis, ou que possam detectar novos efeitos que não tinham sido observados anteriormente (LAM; GRAY, 2003).

Os organismos sentinela têm sido utilizados como um meio de quantificar padrões de exposição ou de melhorar a sensibilidade analítica, geralmente, escolhidos de espécies com uma simples relação estatística entre seus tecidos e as fontes de concentração. Organismos cuja fisiologia, comportamento ou número de indivíduos alterem em resposta ao poluente, ou que mostrem interações com outros contaminantes, invariavelmente apresentam problemas de interpretação, já que seu valor como monitor incide na quantificação direta ou indireta de efeitos tóxicos, devendo ser classificado mais precisamente como indicador, ou espécie monitora (BEEBY, 2001).

A utilização de biomarcadores precisa preencher certos requisitos como ser sensível ao estresse em um nível molecular e celular, devendo ser ativados rapidamente, avisando aos sinais de risco de efeitos tóxicos nos animais, avaliar danos de poluentes em nível tecidual e avaliar estresse em nível de organismo, indicando a capacidade potencial de sobrevivência tanto quanto sua capacidade reprodutiva (VIARENGO et al., 2007).

Nos últimos anos, uma variedade de abordagens em biologia molecular foi enriquecida com o desenvolvimento de técnicas mais precisas e sensíveis como o qPCR, que é uma técnica bastante sensível e precisa, capaz de quantificar os níveis de expressão de genes relevantes toxicologicamente, mesmo com baixas abundâncias transcricionais. Esta técnica oferece uma série de vantagens sobre as técnicas moleculares

convencionais, pois apresentam especificidade e uma vasta gama linear de quantificação (VIARENGO et al., 2007).

Neste trabalho foram investigadas as transcrições diferenciais de genes envolvidos em processos como biotransformação, sistema imune e diferenciação sexual, provenientes de estudos laboratoriais, utilizando peixes *Poecilia vivipara* como modelo de organismo sentinela exposto aos mangues de Ratonés e do Itacorubi, Florianópolis, SC, com a técnica de PCR em tempo real.

14. OBJETIVOS

1. Analisar a transcrição de genes em peixes *P. vivipara* expostos ao esgoto sanitário *in situ*, nos mangues de Rationes e Itacorubi, na Ilha de Santa Catarina.
2. Analisar a transcrição dos genes *CYP1A*, *C3*, *MET*, *UDPGT*, *FIB*, *DMRT1*, *TF*, *HSP70* e *GST* em peixes *P. vivipara* expostos ao esgoto sanitário *in situ*;
3. Comparar a transcrição de genes nos organismos mantidos no local contaminado com os do local referência após 24 h e 96 h de exposição.

15. METODOLOGIA

15.1 Coleta dos animais

Os animais foram coletados nos tanques de cultivo de peixes do LAPMAR, da UFSC utilizando armadilhas de captura (MinnowtrapTM) com ração para peixes como atrativo.

Em seguida, os animais foram encaminhados para o Laboratório de Defesas Celulares (LABDEF), CCB, UFSC, onde foram aclimatados por 40 dias em água do mar filtrada (0,45 µm), a 21°C e salinidade 24, com aeração constante. Durante a aclimação, os peixes foram alimentados duas vezes ao dia com ração peletizada e tiveram seus aquários drenados com renovação de 50% do volume da água.

Duas semanas antecedentes a exposição no ambiente, os aquários tiveram suas salinidades reduzidas gradativamente até 16, de acordo com a média de salinidade medida no mesmo período nas áreas de estudo.

15.2 Área de estudo

15.3 Manguezal de Ratonés

O manguezal de Ratonés situa-se nas coordenadas geográficas (27°27'30"/27°30'00"S; 48°28'12"/48°31'43"O) localizado a Noroeste da Ilha de Santa Catarina, sobre a Baía Norte, sendo parte integrante da Estação Ecológica de Carijós. O mangue de Ratonés é drenado por diversos córregos e rios, sendo o principal, o Rio Ratonés (CAMARGO; PELLERIN; PANITZ, 2001).

O local foi escolhido como área referência deste trabalho por ter características de pouca atividade antrópica e pela adequada qualidade da água analisada previamente.

O local experimental está identificado nas coordenadas 27°28'16,04S" e 48°31'14,18"O (Figura 6).

15.4 Manguezal do Itacorubi

O manguezal do Itacorubi faz parte da Bacia Hidrográfica do Itacorubi, região que recebeu inúmeros aterros para implantação e ampliação de vias públicas e residências. Uma parte desta área, com aproximadamente 4 ha foi utilizada por muitos anos como zona de depósito de lixo urbano sob a administração da Companhia de Melhoramento da Capital (COMCAP). Ainda hoje os córregos que drenam esta área recebem o despejo clandestino de esgoto sanitário associado ao esgoto pluvial.

O manguezal situa-se nas coordenadas geográficas 27°34'14"/ 27°35'31"S e 48°30'07"/48°31'33"O, e é alimentado pelos rios Itacorubi e Sertão e localiza-se no setor Centro-Oeste da Ilha de Santa Catarina.

A literatura aponta inúmeras atividades potencialmente danosas ao mangue que estão compiladas em uma revisão bastante apurada feita por Governigo (2009). Com base na literatura e por observações feitas diretamente no local, este mangue foi escolhido como área de estudo contaminada por esgoto sanitário, sendo que os dois locais amostrais, definidos como Itacorubi I (ITA I) localizado a montante e Itacorubi II (ITA II), localizado a jusante em relação ao fluxo de água dos córregos e situam-se respectivamente nas coordenadas: ITA I 27°34'41,52"S e 48°30'58,56"O e ITA II, 27°34'32,7" e 48°31'08,70"O (Figura 7).

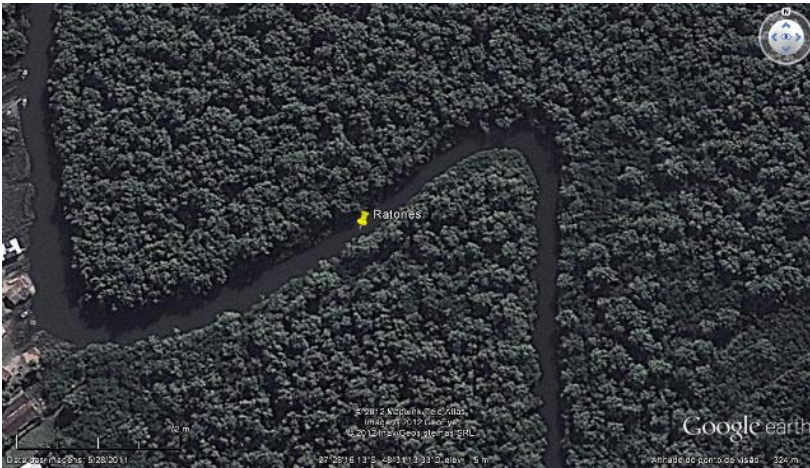


Figura 6. Identificação do local amostral referência onde foi fixada uma balsa de exposição.



Figura 7. Identificação dos locais amostrais expostos onde foram fixadas balsas de exposição.

15.5 Exposição dos animais

Os exemplares de *P.vivipara* depois de aclimatados foram transportados aos locais de estudo onde foram mantidos no mangue com auxílio de baldes alimentícios adaptados. Cada balde teve o fundo, a tampa e 70% das laterais removidas, substituindo-as por uma tela de tecido sintético, em cada balde foi fixada uma pequena poita para mantê-lo na posição vertical. Os baldes foram fixados em uma mini-balsa flutuante que por sua vez foi presa a uma poita (Figura 8). Este tipo de exposição foi uma adaptação de outro modelo proposto por Nunes (2008) para exposição de ostras, que vem sendo utilizado com sucesso pela equipe do LABCAI.



Figura 8. Mini-balsa com balde adaptado para exposição de peixes in situ.

Em cada balsa, foram fixados dois baldes contendo 30 animais, num total de 60 peixes por local.

Para os objetivos deste trabalho, um total de 12 animais por local amostral seria suficiente (pools de 2 animais, $n=6$), os demais animais expostos fizeram parte de outro trabalho conjunto para análises bioquímicas e histológicas.

Após o período de 24 e 96 horas, os animais foram mortos por transecção cervical, medidos, pesados e amostras de fígado foram coletadas.

Os tecidos foram congelados imediatamente em nitrogênio líquido e em seguida armazenados em freezer -80°C . Estes procedimentos foram realizados com os animais do grupo referência mantido no Mangue de Ratores, e nos grupos contaminados mantidos nos locais ITA I e ITA II.

15.6 Extração de RNA total

O RNA total foi extraído a partir de 6 pools de peixes, agrupados por sexo, dos grupos referência, e contaminado ITA I e ITA II dos tempos de 24 h de exposição, visto que os animais dos grupos contaminados morreram após 24 h de exposição, restando apenas os do grupo referência

A extração foi realizada apenas nos fígados e utilizando o protocolo para o reagente TRizol (Invitrogen).

15.7 Síntese de cDNA

As amostras de RNA total foram transformadas em DNA complementar (cDNA) pela ação da transcrição reversa utilizando o kit QuantiTech Reverse Transcription (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante e suas concentrações e pureza foram verificadas em Nanodrop.

Em seguida as amostras de cDNA foram diluídas para 100 ng para utilização na técnica de qPCR.

15.8 Padronização das reações de qPCR

A padronização das reações foi realizada utilizando uma curva contendo 500 ng, 250 ng, 125 ng, 62,5 ng e 31,25 ng de cDNA por reação de qPCR, para o cálculo da eficiência da reação, como descrito no capítulo I deste trabalho.

Utilizando o programa Corbett Rotor-Gene 6000 Application Software 1.7, os valores brutos de fluorescência foram transformados em uma escala logarítmica, tornando possível a delimitação do ciclo limiar (Ct) com base no

coeficiente de correlação (R^2) e eficiência da curva, calculados pelo próprio aparelho.

Os genes escolhidos para serem testados foram os que melhor responderam na validação da SSH descrita no capítulo I, além de outros genes escolhidos por sua importância nas funções de biotransformações. Desta forma, foram utilizados os iniciadores para amplificação dos genes *CYP1A*, *C3*, *GST*, *MET*, *UDPGT*, *FIB*, *DMRT1*, *TF*, *HSP70*, e genes normalizadores *40S*, *S2* e *EF2*.

15.9 Reações de PCR em tempo real qPCR

Após a padronização das reações para cada gene, foram realizadas as reações de qPCRs sempre com uma curva padrão em paralelo. A ciclagem e os dados colhidos foram os mesmos daqueles da etapa de padronização.

Com os dados obtidos, a quantificação relativa da expressão de cada gene foi comparada utilizando-se o método de Ct ou $\Delta\Delta Ct$ (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008).

15.10 Análise estatística

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente pelo teste de Shapiro-Wilk para verificar a distribuição normal. Os dados paramétricos foram testados pela análise de variância em uma via (ANOVA) e os não paramétricos, pelo teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns, todos com nível de significância $\leq 0,05$ utilizando-se o programa *GraphPad Prism 5.0*.

16. RESULTADOS

Os peixes mantidos no local contaminado ITA I apresentaram uma mortalidade superior a 75% após 24 h de exposição, visto que somente 13 animais sobreviveram, dos quais, os 12 primeiros foram amostrados gerando um pool de 2 e n=6. No segundo grupo exposto, ocorreu situação semelhante com apenas 12 peixes sobreviventes. No local referência, todos os animais sobreviveram durante 96 h de exposição, mas somente os animais do tempo 24 h foram utilizados.

Todos os genes testados obtiveram resultados de eficiência dentro do limite necessário para aplicação do método do $\Delta\Delta CT$ comparativo (Tabela 5).

Tabela 5 Valores de correlação (R^2), inclinação da reta (M) e eficiência da reação (100%=1) para as curvas padrões geradas na padronização das reações de qPCR.

Gene	R^2	Inclinação	Eficiência
<i>CYP1A</i>	0,987	-3,380	0,97
<i>C3</i>	0,999	-3,330	1,00
<i>GST</i>	0,994	-3,314	1,00
<i>MET</i>	0,995	-3,327	1,00
<i>UDPGT1B</i>	0,996	-3,315	1,00
<i>FIB</i>	0,998	-3,313	1,00
<i>DMRT1</i>	0,993	-3,332	1,00
<i>40S</i>	0,992	-3,445	0,95
<i>TF</i>	0,996	-3,238	1,04
<i>EF2</i>	0,994	-3,259	1,03
<i>S2</i>	0,999	-3,205	1,05
<i>HSP70</i>	0,997	-3,202	1,05

Foram testados como normalizadores os genes que codificam as proteínas ribossomais 40S e S2, e o *Fator de Elongação 2*, e as análises estatísticas mostraram que para este propósito, os genes 40S e o EF2 puderam exercer este papel, visto que a o gene para S2 apresentou alteração na taxa transcrricional entre os grupos experimentais, tendo sua expressão gênica reduzida no grupo exposto ITA I (Figura 9). O gene 40S foi escolhido como normalizador das reações dos genes de interesse por apresentar médias mais próximas entre os grupos e menores valores de desvio padrão.

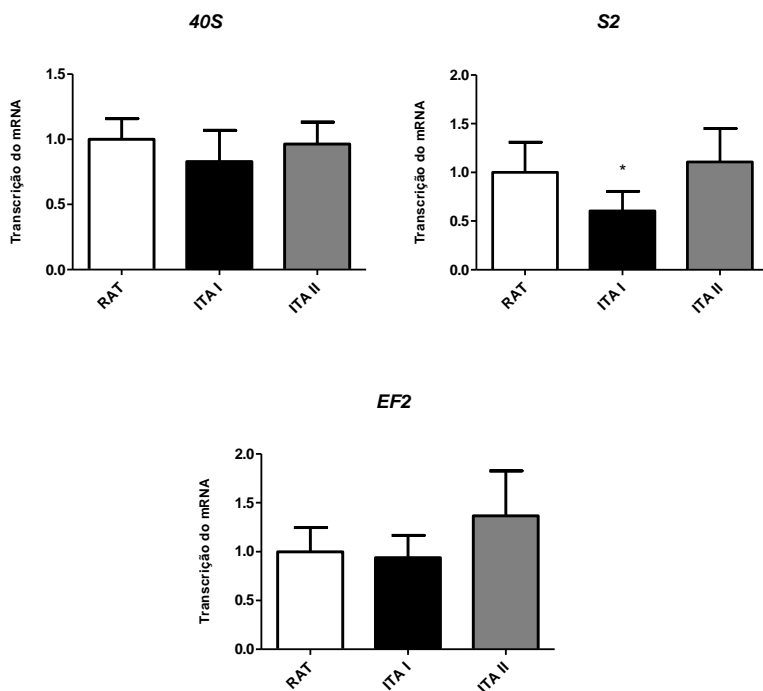


Figura 9. Transcrição dos genes candidatos a normalizadores. O asterisco (*) representa diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo referência (RAT). O eixo y representa quantas vezes a transcrição do gene aumentou ou diminuiu em relação ao seu controle. Os dados estão representados por valores de média e desvio padrão.

Os peixes *P. vivipara* apresentaram um aumento de 2,8 vezes na transcrição de *CYP1A* após 24 h de exposição no local contaminado ITA I (Figura 10). Aqueles que permaneceram no local ITA II apresentaram um pequeno aumento, porém, não significativo.

O gene de diferenciação sexual *DMRT1* também apresentou uma maior transcrição de 1,7 vezes nos animais mantidos no local ITA II (Figura 10).

A *MET* apresentou uma indução de 1,7 vezes nos animais mantidos em ITA I e 4,3 vezes, em ITA II, com diferenças significativas entre os dois grupos contaminados (Figura 11). Da mesma forma, foi observado um aumento na transcrição de *UDPGT1B* nos animais do grupo ITA II, que foi significativa em relação aos grupos referência e ITA I (Figura 11). O mesmo comportamento foi seguido pela *GST*, com indução de 5,3 vezes nos animais de ITA II e significativamente diferente de Ratos e ITA I (Figura 11).

Transferrina e *HSP70* não apresentaram alterações significativas entre os grupos, embora a primeira tenha apresentado uma leve tendência de indução nos grupos contaminados (Figura 12). *C3* também não apresentou diferenças, porém, foi o único gene com tendências à repressão gênica em ITA I, bem como *FIB* que apresentou leve tendência à repressão em ITA II (Figura 12).

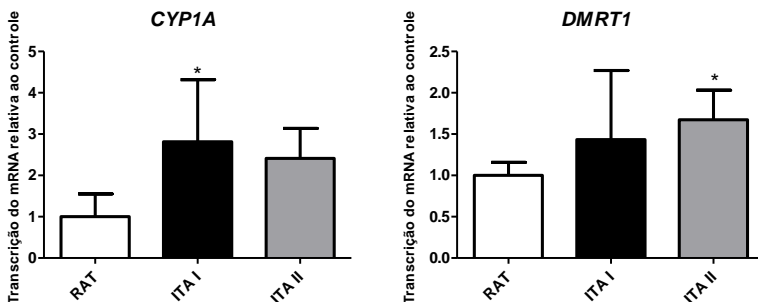


Figura 10. Transcrição gênica por RT-PCR quantitativo dos genes *CYP1A* e *DMRT1* dos animais mantidos no mangue após 24 h. O asterisco (*) representa diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo referência (RAT). O eixo y representa quantas vezes o gene aumentou ou diminuiu em relação ao grupo referência. Os dados estão representados por valores de média e desvio padrão.

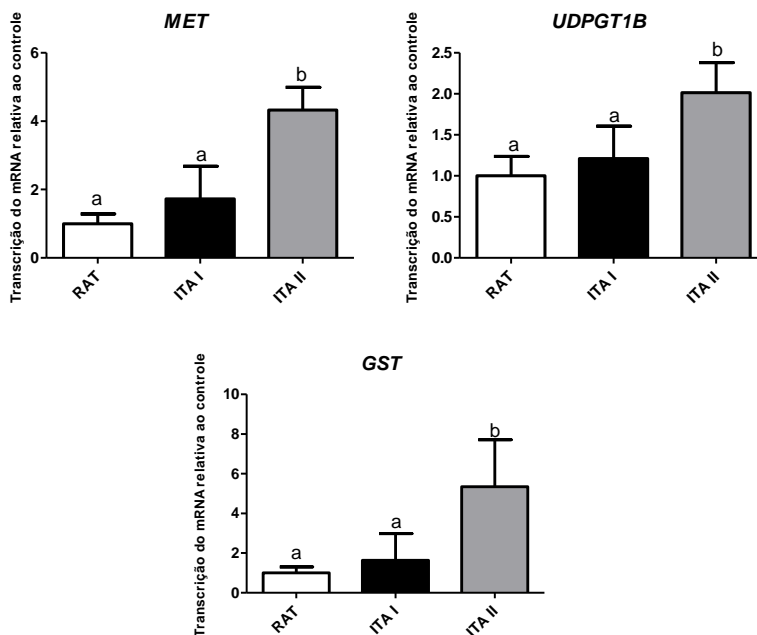


Figura 11. Transcrição gênica por RT-PCR quantitativo dos genes *MET*, *UDPGT1B* e *GST* dos animais expostos ao mangue após 24 h. Letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos. O eixo y representa quantas vezes o gene aumentou ou diminuiu em relação ao grupo referência. Os dados estão representados por valores de média e desvio padrão.

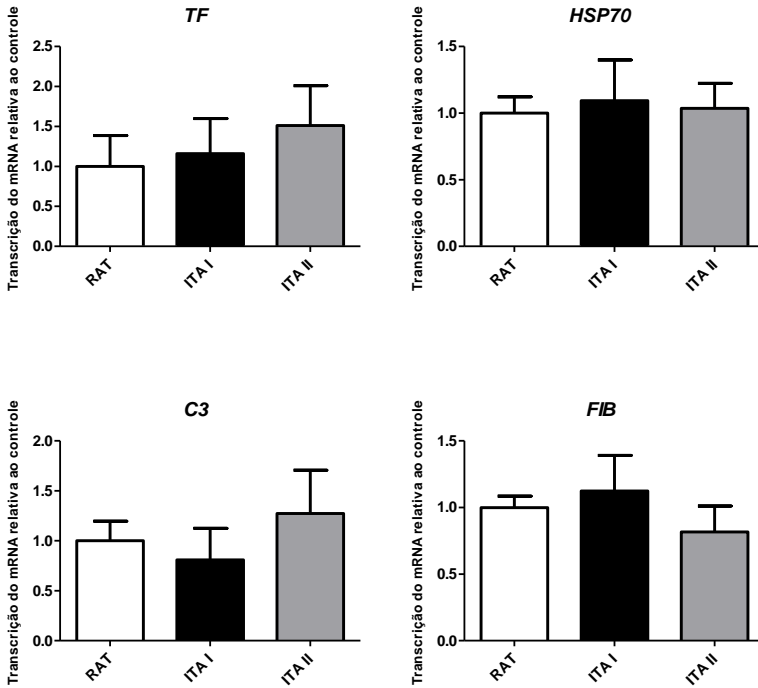


Figura 12. Transcrição gênica por RT-PCR quantitativo dos genes *TF*, *HSP70*, *C3* e *FIB* dos animais mantidos no mangue após 24 h. O eixo y representa quantas vezes o gene aumentou ou diminuiu em relação ao grupo referência. Os dados estão representados por valores de média e desvio padrão.

17. DISCUSSÃO

Estudos ecotoxicológicos em organismos sentinela são tipicamente baseados na mensuração de muitos biomarcadores para avaliar os efeitos biológicos de poluentes químicos. Na última década, o desenvolvimento de tecnologias genômicas, tem aumentado a descoberta de biomarcadores no nível molecular, contribuindo para um melhor entendimento dos modos de ação destes compostos (REGOLI et al., 2011).

Neste trabalho foram avaliadas as transcrições de alguns genes identificados em uma biblioteca subtrativa e validados em experimentos de laboratório descritos no capítulo I e em outros genes de interesse relacionados à biotransformação, mas que também apresentaram sua transcrição alterada em estudos anteriores (MATTOS et al., 2009).

Os animais expostos aos locais contaminados apresentaram uma mortalidade bastante elevada, o que pode ter sido explicado pela grande amplitude de marés, modificando constantemente a salinidade e o despejo de esgoto sanitário não tratado diretamente nos rios, o que afeta a qualidade da água com patógenos e diversos outros compostos de origem natural e antropogênica, diminuindo o oxigênio dissolvido e eutrofizando a água.

Com uma dinâmica ambiental bastante plástica, provavelmente os peixes acabam não resistindo às decorrências do estresse gerado, principalmente pelo modelo de exposição confinada com a mini-balsa fixada em poitas. Desta maneira, os animais não podem se abrigar em locais com condições mais amenas como no caso dos Poecilídeos residentes daquele ambiente.

Foram encontradas respostas transcricionais diferenciais nos genes estudados nos peixes expostos ao mangue de Itacorubi quando comparados ao local referência, o mangue de Ratones, sendo que os níveis foram significativamente maiores no local ITA II, quando comparados com ITA I. Esta diferença pode estar relacionada ao fato de ITA I estar localizado no rio Itacorubi, que abrange quatro bairros de Florianópolis, o Jardim Santa Mônica, Córrego Grande, Parque São Jorge e Itacorubi, e o local ITA II que se situa na junção do rio Itacorubi com o rio Sertão, que drena principalmente o bairro da Trindade, onde fica

localizada a Universidade Federal de Santa Catarina e o Hospital Universitário, áreas que recebem o movimento diário de centenas de pessoas.

Enquanto ITA I recebe os despejos de esgoto de várias residências e comércio local, ITA II, recebe os mesmos dejetos que ITA I, somados aos efluentes de uma área mais urbanizada, representando uma exposição de concentração de dejetos, e possíveis impactos superiores aos peixes deste local.

Os animais expostos por 24 h nos locais contaminados apresentaram uma resposta transcricional dos genes que codificam enzimas de biotransformação similar aos estudos realizados em laboratório. *CYP1A* foi o único gene que apresentou um aumento na transcrição nos peixes mantidos no local, que fica mais a montante (ITA I). Apesar de não apresentar diferença significativa, a transcrição de *CYP1A* também estava elevada nos animais mantidos no local ITA II. A indução de *CYP1A* é possivelmente o biomarcador de contaminação ambiental mais estudado em ecossistemas aquáticos, e em geral, uma alta expressão deste gene detectada tanto na SSH e subsequente validação, quanto nos animais expostos ao ambiente, pode estar envolvida diretamente com a exposição à agonistas do receptor AHR (BAINY; WOODIN; STEGEMAN, 1999; JONSSON et al., 2010).

Os genes *MET*, *UDPGT1B* e *GST* apresentaram comportamentos semelhantes, tendo uma maior transcrição nos animais mantidos no local ITA II, mas com tendências de indução no local ITA I, o que poderia estar mais uma vez relacionado com as atividades de *CYP1A* e as concentrações de xenobióticos como HPAs.

A regulação diferencial de *CYP1A* pode estar envolvida em consequências deletérias na saúde dos peixes. Enquanto as enzimas metabolizantes de xenobióticos, como o *CYP1A* protegem o organismo contra efeitos adversos, esta biotransformação pode estar gerando outras consequências associadas como a ativação de receptores AHR, que podem ativar os pró-oxidantes e alterações no metabolismo de drogas e substâncias endógenas (MORTENSEN; ARUKWE, 2007). Esta resposta aos AHRs desencadeia uma bateria de genes relacionados como o *UDPGT*, *GST* (STEGEMAN; HAHN, 1994 apud MORTENSEN; ARUKWE, 2007).

Nenhum gene envolvido no sistema imune foi induzido ou reprimido neste estudo, ao contrario do que ocorreu em laboratório. Como visto anteriormente, autores como Qi et al (2011) observaram a ativação do sistema complemento C3 por peixes expostos a diferentes temperaturas e pH. Neste estudo, esperava-se uma transcrição diferencial destes genes, já que os animais saíram de ambientes com temperatura, oxigênio e alimentação controlados para serem expostos em um ambiente com condições adversas.

Outro gene que teve sua transcrição alterada foi o *DMRT1*, que ao contrário do ocorrido em laboratório e na SSH, foi induzido nos animais expostos ao local contaminado. Considerando que *DMRT1* tem sido descrito em peixes como um repressor natural da aromatase (*CYP19A1*), enzima responsável pela aromatização de andrógenos em estrógenos (WANG et al., 2010a), pode-se especular que os animais possam estar mostrando indícios de um processo inicial de masculinização. Tal hipótese necessitará de estudos mais aprofundados para que possam ser comprovada, no entanto estes dados servem de alerta.

Poucos estudos dão atenção à concentração de androsterona no esgoto, resumindo-se basicamente aos níveis de estrógenos, porém, a testosterona e dehidroepiandrosterona são os andrógenos mais excretados em urina humana, atingindo níveis de 100 a 1000 vezes superior a dos estrógenos (BELLET et al., 2012). Além disso, em humanos, a pregnenolona, que é a precursora de todos os hormônios esteróides, é secretada pelas gônadas e glândulas adrenais e excretada através da urina (BELLET et al., 2012).

Estudos comprovam que o androgênio induz *DMRT1* (MARCHAND et al., 2000) e neste trabalho, os peixes expostos ao mangue contaminado, possivelmente tenham sido expostos a andrógenos presentes nestes efluentes.

Outra possibilidade para este resultado seria a indução de *DMRT1* concomitantemente com *CYP1A*, que por sua vez, pode ter reduzido a concentração de estradiol plasmático. PAHs, agonistas do AHR, podem funcionar como anti-estrógenos (WILLIAMS; LECH; BUHLER, 1998), no qual a redução de estradiol plasmático é decorrente de um aumento na atividade das enzimas de biotransformação de fase I e II em organismos expostos a PAHs (NICOLAS, 1999).

Os resultados das análises químicas (em andamento) das carcaças dos animais e do sedimento coletados neste experimento irão corroborar para elucidar as hipóteses levantadas neste estudo. Estas análises irão fornecer um conhecimento dos contaminantes bioacumulados pelos peixes expostos e do material particulado presente no sedimento.

18. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Com base nos resultados obtidos neste trabalho podemos concluir que a indução da transcrição dos genes que codificam enzimas de biotransformação de xenobióticos no fígado dos peixes mantidos por 24 h no mangue do Itacorubi, principalmente no local situado a jusante (ITA II) sugere fortemente que os contaminantes presentes nos efluentes que são despejados nos córregos de drenagem do Mangue do Itacorubi estão afetando os animais expostos nestes ambientes.

Considerando-se a transcrição do gene *DMRT1* que está relacionado com diferenciação sexual masculina também apresentou indução nos animais mantidos no Mangue do Itacorubi durante 24 h, pode-se sugerir que os animais estejam sendo expostos a substâncias potencialmente desreguladoras endócrinas nestes locais. No entanto, estudos posteriores visando à identificação quali-quantitativa destes compostos são necessários para comprovar tal hipótese.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABESSA, D. M. S. et al. Influence of a Brazilian sewage outfall on the toxicity and contamination of adjacent sediments. **Marine Pollution Bulletin**, v. 50, n. 8, p. 875-885. 2005.

ADAM, M.L. et al. Environmental degradation at a public park in southern Brazil as revealed through a genotoxicity test (MN) on peripheral blood cells from *Poecilia vivipara* (Teleostei). **Water, Air and Soil Pollution**. 2010.

BAINY, A.C.D; WOODIN, B.R; STEGEMAN, J.J. Elevated levels of multiple cytochrome P450 forms in tilapia from Billings Reservoir-São Paulo, Brasil. **Aquatic Toxicology**. 44, 289-305. 1999.

BEEBY, A. What do sentinels stand for? **Environmental Pollution**, v. 112, n. 2, p. 285-298. 2001.

BELLET, V. et al. Occurrence of androgens in sewage treatment plants influents is associated with antagonist activities on other steroid receptors. **Water Research**, n. 46, p.1912-1922. 2012.

BEZERRA, R. S. et al. Proteases no trato digestivo de peixes: Tripsina do tambaqui (*Colossoma macropomum*), modelo alternativo para o aproveitamento de sub-produtos na indústria pesqueira. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 32, p.46-49. 2001.

BILA, D. M. et al. Ozonation of a landfill leachate: evaluation of toxicity removal and biodegradability Improvement. **Journal of Hazardous Materials**, v. 117, n. 2-3, p. 235–242, 2004.

BIZERRIL, C. R. S. F.; PRIMO, P. B. S. Peixes de águas interiores do Estado do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro: FEMAR-SEMADS. 2001.

BO, J. et al. Identification of differentially expressed genes and quantitative expression of complement genes in the liver of marine medaka *Oryzias melastigma* challenged with *Vibrio parahaemolyticus*. **Comparative Biochemistry and Physiology: Part D**, n.7, p. 191-200. 2012.

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

BRULLE, F. et al. Identification and expression profile of gene transcripts differentially expressed during metallic exposure in *Eisenia fetida coelomocytes*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 32, p. 1441-1453, 2008.

BURNETT, K. G. et al. *Fundulus* as the premier teleost model in environmental biology: Opportunities for new insights using genomics. **Comparative Biochemistry And Physiology: Part D**, n. 2, p.257-286. 2007.

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. **The Science of the Total Environment**, v. 247, p. 295-311, 2000.

CAJARAVILLE, M.P. et al. Antioxidant enzymes and peroxisome proliferation in relation to contaminant body burdens of PAHs and PCBs in bivalve molluscs, crabs and fish from the Urdaibai and Plentzia estuaries (Bay of Biscay). **Aquatic Toxicology**, v.58, p.75-98. 2002.

CAMARGO, L.P.; PELLERIN, J.; PANITZ, I.M.N., Caracterização e classificação do manguezal do rio Ratoles, através das técnicas de sensoriamento remoto e do Sistema Geográfico de Informações (SIG). Ilha de Santa Catarina, Brasil. **Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto**; 21-26 abril 2001; Foz do Iguaçu, PR: INPE: 2001.

CEYHUN, S. B. et al. Purification and characterization of carbonic anhydrase from the teleost fish *Dicentrarchus labrax* (European seabass) liver and toxicological effects of metals on enzyme activity. **Environmental Toxicology And Pharmacology**, n.32, p.69-74. 2011.

CHONG, H.; VIKIS, H. G.; GUAN, KI.. Mechanisms of regulating the Raf kinase family. **Cellular Signalling**, n. 15, p.463-469. 2003.

CHOUDHURY, M. et al. Homologue of mammalian apolipoprotein A-II in non-mammalian vertebrates. **Acta Biochim Biophys Sin**, v. 41, n. 5, p.370-378. 2009.

CURTIS, L. R. et al. Reduced cytochrome P4501A activity and recovery from oxidative stress during subchronic benzo[a]pyrene and benzo[e]pyrene treatment of rainbow trout. **Toxicology And Applied Pharmacology**, n. 254, p.1-7. 2011.

DIATCHENKO, L. et al. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93(12), p.6025-30, 1996.

FREIRE, M. M. et al. Biomarcadores na avaliação da saúde ambiental dos ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, p. 347-354, 2008.

FROEHNER, S. et al. Occurrence of selected estrogens in mangrove sediments. **Marine Pollution Bulletin**, n. 64, p.75-79, 2012.

GAGNÉ, F. et al. Neuroendocrine disruption in *Mya arenaria* clams during gametogenesis at sites under pollution stress. **Marine Environmental Research**, v. 64(2), p. 87-107, 2007.

HALL, J. R. et al. Identification and validation of differentially expressed transcripts in a hepatocyte model of cold-induced glycerol production in rainbow smelt (*Osmerus mordax*). **American Physiological Society**, p.995-1010, 2011.

HUANG, X. Q.; MADAN, A. CAP3: A DNA sequence assembly program. **Genome Research**, v. 9, n. 9, p. 868-877, 1999.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Atlas de saneamento**, 2011.

JÖNSSON, M. E. et al. Induction patterns of new CYP1 genes in environmentally exposed rainbow trout. **Aquatic Toxicology**, n. 98, p.151-156, 2010.

KENNISH, M.J. **Ecology of Estuaries: Anthropogenic Effects**. London: CRC Press, p. 494, 1991.

KENNISH, Michael J.. Environmental threats and environmental future of estuaries. **Environmental Conservation: Foundation for Environmental Conservation**, v. 1, n. 29, p.78-107, 2002.

KONISHI, T. et al. A new class of glutathione S-transferase from the hepatopancreas of the red sea bream *Pagrus major*. **Biochemistry Journal**, v. 388, p. 299–307, 2005.

LAM, P.K.S; GRAY, J.S. The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. **Marine Pollution Bulletin**, 46(2): 182-186. 2003

LAMBERT, L. A. Molecular evolution of the transferrin family and associated receptors. **Biochimica et Biophysica Acta**. n. 1820, p.244-255. 2011.

LEWIS, M.; PRYOR, R.; WILKING, L.. Fate and effects of anthropogenic chemicals in mangrove ecosystems: A review. **Environmental Pollution**, n. 159, p.2328-2346. 2011.

LI, Zhi-hua et al. Modulation of glutathione-related antioxidant defense system of fish chronically treated by the fungicide propiconazole. **Comparative Biochemistry And Physiology: Part C**, n. 152, p.392-398. 2010.

LOIT, E. et al. Pre-analytic and analytic sources of variations in thiopurine methyltransferase activity measurement in patients prescribed thiopurine-based drugs: A systematic review. **Clinical Biochemistry**. n. 44, p.751-757. 2011.

MAGALHÃES, D. P.; FERRÃO FILHO, A. S. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, p. 355-381. 2008.

MANSETH, E. et al. Purification and characterization of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fibrinogen. **Comparative Biochemistry And Physiology: Part B**, n. 138, p.169-174. 2004.

MARCHAND, O. et al. DMRT1 expression during gonadal differentiation and spermatogenesis in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Biochimica Et Biophysica Acta**, n. 1493, p.180-187. 2000.

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

MENDONÇA, J. P.; ANDREATA, J. V.. Aspectos reprodutivos de *Poecilia vivipara* (Bloch & Scheider) (Poeciliidae) da Lagoa Rodrigo de Freitas, Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 18, n. 4, p.1041-1047, 2001.

MOLINARO E. et al. **Conceitos e Métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde-volume 4**. Rio de Janeiro:EPSJV / Fiocruz, 2010.496p.

MORTENSEN, A. S.; ARUKWE, A.. Effects of 17 α -ethynylestradiol on hormonal responses and xenobiotic biotransformation system of Atlantic salmon (*Salmo salar*): A comparison of biotransformation and antioxidant defense systems in multiple tissues. **Aquatic Toxicology**, n. 85, p.113-123, 2007.

NEVES, F. M.; MONTEIRO, L. R. Body shape and size divergence among populations of *Poecilia vivipara* in coastal lagoons of Southeastern Brazil. **Journal of Fish Biology**, v.63, p.928–941. 2003.

NICOLAS, J. Vitellogenesis in fish and the effects of polycyclic aromatic hydrocarbon contaminants. **Aquatic Toxicology**, v. 45, p. 77–90, 1999.

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**. 73 p. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Aquicultura). Centro de Ciências Agrárias, UFSC, Florianópolis, 2008.

PARENTI, L. R.; RAUCHEMBERGER, M. Systematic overview of the Poeciliines. In *The Ecology and Evolution of Poeciliid Fishes (Poeciliidae)* (Meffe, A. & Snellson, F.F., eds), p. 3–12. New Jersey: Prentice Hall. 1989.

PETROVIĆ, M.; GONZALEZ, S.; BARCELÓ, D. Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 10, p. 685-696, 2003.

QI, ZH. et al. Molecular characterization and functional analysis of a complement C3 molecule in the orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). **Fish and Shellfish Immunology**, n. 31, p. 1284-1290, 2011.

QU, X. et al. Construction and analysis of liver suppression subtractive hybridization library of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) intraperitoneally injected with microcystin-LR. **Aquatic Toxicology**, n. 105, p.151-156, 2011.

REGOLI, F. et al. Molecular and biochemical biomarkers in environmental monitoring:: A comparison of biotransformation and antioxidant defense systems in multiple tissues. **Aquatic Toxicology**, n. 105, p.56-66, 2011.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 2nd. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 3v.

SANCHEZ, W. et al. Adverse effects in wild fish living downstream from pharmaceutical manufacture discharges. **Environment International**, n. 37, p.1342-1348, 2011.

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

SHMUKLER, B. E. et al. Zebrafish slc4a2/ae2 anion exchanger: cDNA cloning, mapping, functional characterization, and localization. **American Physiological Society**, n. 289, p.835-849, 2005.

SHMUKLER, B. E. et al. Zebrafish ae2.2 encodes a second slc4a2 anion exchanger. **American Physiological Society**, n. 294, p.1081-1091, 2008.

SILVA, J da; ERDTMANN, B; HENRIQUES, J. A. P. Biomonitoramento Ambiental. In: SILVA, J. da; HEUSER,V; ANDRADE, V. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003. p.167-180.

_____. Causas, Efeitos e Controle. In: LEMOS, C. T; TERRA, N. R. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003. p.119-144.

_____. Estudos Toxicológicos no Ambiente e na Saúde Humana. In: SILVA, J. da; FONSECA, M. B da. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003. p.70-84.

_____. Toxicologia Molecular. In: LEBOUTE, A.P.M; SILVA, J. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003. p.119-144.

SOLÉ, M. et al. Long-term exposure effects in vitellogenin, sex hormones, and biotransformation enzymes in female carp in relation to a sewage treatment works. **Ecotoxicology And Environmental Safety**, n. 56, p.373-380, 2003.

SOVERNIGO, M.H. The mangrove swamp of Itacorubi, Florianopolis, Brazil: a review of the available ecological data for directing new studies. **Oecologia Brasiliensis**, n. 13 v. 4, p. 575–595. 2009

TENHUNEN, J. et al. Genomic organization of the human catechol O-methyltransferase gene and its expression from two distinct promoters. **European Journal of Biochemistry**, v. 223, p. 1049-1059, 1994.

THIBAUT, R. E.; SCHULTZ, R. J. Reproductive adaptations among viviparous fishes (Cyprinodontiformes: Poeciliidae). **Evolution**, v.32, p.320–333. 1978.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, p. 57-149, 2003.

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

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

WANG, DS. et al. *Doublesex*- and *Mab-3*-Related Transcription Factor-1 Repression of Aromatase Transcription, a Possible Mechanism Favoring the Male Pathway in Tilapia. **Endocrinology**. v. 151, n. 3, p. 1331-1340, 2010a.

WANG, L. et al. Expression of CYP1C1 and CYP1A in *Fundulus heteroclitus* during PAH-induced carcinogenesis. **Aquatic Toxicology**, n. 99, p.439-447, 2010b.

WASSMUR, B. et al. Interactions of pharmaceuticals and other xenobiotics on hepatic pregnane X receptor and cytochrome P450 3A signaling pathway in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquatic Toxicology**, n. 100, p.91-100, 2010.

WEINSTEIN-OPPENHEIMER, C. R et al. The Raf signal transduction cascade as a target for chemotherapeutic intervention in growth factor-responsive tumors. **Pharmacology & Therapeutics**, n. 88, p.229-279. 2000.

WILLIAMS, D. E.; LECH, J. J.; BUHLER, D. R.. Xenobiotics and xenoestrogens in fish: modulation of cytochrome P450 and carcinogenesis. **Mutation Research**, n. 399, p.179-192, 1998.

WILLIAMS, T.D et al, A DNA expression array to detect toxic stress response in European flounder (*Platichthys flesus*). **Aquatic Toxicology**, n. 65, p.141-157, 2003.

WINSTANLEY, C. **Molecular Biomethods Handbook**. Totowa:Humana Press, 2008. 1119 p.

ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações**. Ed. Rima. São Paulo, 2006. 464p.

ZANETTE, J. et al. Comparison of the antioxidant defense system in *Crassostrea rhizophorae* and *Crassostrea gigas* exposed to domestic sewage discharges. **Marine Environmental Research**, v. 66, n. 1, p. 196-198. 2008.

ZANETTE, J. et al. New cytochrome P450 1B1, 1C2 and 1D1 genes in the killifish *Fundulus heteroclitus*: basal expression and response of five killifish CYP1s to the AHR agonist PCB126. **Aquatic Toxicology**. 93, 234–243. 2009.

ZHU, B. T. et al. Inhibition of human catechol-O-methyltransferase (COMT)-mediated O-methylation of catechol estrogens by major polyphenolic components present in coffee. **Journal Of Steroid Biochemistry And Molecular Biology**, n. 113, p.65-74, 2008.

ZHU, LY. et al. Advances in research of fish immune-relevant genes: A comparative overview of innate and adaptive immunity in teleosts. **Developmental and Comparative Immunology**, 2012.