



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

CLEI ENDRIGO PIAZZA

ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS E MOLECULARES EM PEIXES
Poecilia vivipara (Bloch e Schneider, 1801) **EXPOSTOS AO ESGOTO**
SANITÁRIO E 4-n-NONILFENOL

FLORIANÓPOLIS

2019

Clei Endrigo Piazza

ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS E MOLECULARES EM PEIXES *Poecilia vivipara*
(Bloch e Schneider, 1801) **EXPOSTOS AO ESGOTO SANITÁRIO E 4-n-**
NONILFENOL

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de doutor em bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Afonso Celso Dias Bainy

Coorientador: Prof. Dr. Guilherme de Toledo e Silva

Florianópolis

2019

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

Piazza, Clei Endrigo

Alterações bioquímicas e moleculares em peixes *Poecilia vivipara* (Bloch e Schneider, 1801) expostos ao esgoto sanitário e 4-n-Nonilfenol / Clei Endrigo Piazza ; orientador, Afonso Celso Dias Bainy, coorientador, Guilherme de Toledo e Silva, 2020.

216 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação em Bioquímica, Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

1. Bioquímica. 2. Transcriptoma. 3. Transcrição gênica. 4. Atividade enzimática. 5. Ecotoxicologia. I. Bainy, Afonso Celso Dias . II. de Toledo e Silva, Guilherme . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. IV. Título.

Clei Endrigo Piazza

Alterações bioquímicas e moleculares em peixes *Poecilia vivipara* (Bloch e Schneider, 1801) expostos ao esgoto sanitário e 4-n-Nonilfenol

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

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

Prof. Dr. Alcir Luiz Dafré
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.(a). Dr(a). Patrícia Hermes Stoco
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutor em bioquímica.

Prof. (a) Dr.(a) Ariane Zamoner Pacheco de Souza
Coordenador(a) do Programa

Prof. Dr. Afonso Celso Dias Bainy
Orientador

Prof. Dr. Guilherme de Toledo e Silva
Coorientador

Florianópolis, 19 de dezembro de 2019.

Este trabalho é dedicado a todos aqueles que permanecem resilientes e continuam tratando as ciências e educação com respeito, dedicação e apreço.

AGRADECIMENTOS

A realização desse trabalho só foi viável com o envolvimento de muitas pessoas direta e indiretamente. Seja em coletas, na bancada, no computador, em análises, cafês, cervejas, conversas, limpeza e arrumação do laboratório, seminários, disciplinas, aprendizados, ensinamentos entre tantas outras coisas que fazem parte do mundo acadêmico... Ciência não se faz sozinha, portanto considero esse estudo tão meu quanto de todos que, através das formas citadas acima participaram da construção dessa tese.

Gostaria de agradecer ao Dr. Afonso Bainy por ter acreditado nessa pesquisa, confiado no meu trabalho, aceitado me orientar no desenvolvimento dessa tese, por garantir o essencial para o desenvolvimento da pesquisa e ter permitido que nos últimos (quase) 10 anos eu fizesse parte desse grupo referência em Ecotoxicologia Aquática, o LABCAI. Certamente todos esses anos me tornaram um profissional melhor. Aliás, graças ao Afonso eu pude ter meu primeiro emprego como biólogo em um dos projetos mais audaciosos envolvendo biomarcadores no País.

Ao meu coorientador Dr. Guilherme de Toledo e Silva, o meu muito obrigado pela parceria e por todo o ensinamento de bioinformática que recebi antes mesmo de ele ter se tornado professor da UFSC. O desafio de desbravar a montagem de um transcriptoma sem uma boa base inicial seria colossal, imagine dois! O Toledo foi peça fundamental no meu aprendizado de bioinformática, sempre preocupando-se em mostrar que precisamos muito mais de BIO do que propriamente de processadores e RAMs para dar sentido aos nossos resultados.

Agradeço imensamente a minha esposa, Dra. Vanessa Almeida de Oliveira que acompanhou todas as etapas desse doutorado, desde o processo de seleção até a entrega da versão final. Fomos até colegas de classe em disciplinas da PPG BQA. Muito obrigado por ter acreditado no meu trabalho, me incentivado sempre, criticado quando necessário, consolado nos momentos mais difíceis, auxiliado na correção da tese, sempre ter cerveja gelada em casa, ou me levar até um barzinho para desestressar.

Ao Dr. Emanuel Maltempi, Dra. Michelle Tadra-Sfeir e Dr. Eduardo Balsanelli da UFPR, meus mais sinceros agradecimentos por terem nos proporcionado a possibilidade de realizarmos o sequenciamento dos transcriptomas no Ion Proton e Illumina MiSeq. À Michelle em especial, muito obrigado pelo auxílio na bancada com a construção das bibliotecas. Foi uma semana intensa de muito trabalho e aprendizado.

Ao Jacó, me faltam palavras suficientes. O Jacó é uma pessoa ímpar! Profissional dedicado, amigo fiel e cientista brilhante. As pessoas que têm alguém para chamar de “braço

direito” são muito sortudas. No meu caso, o Jacó é praticamente o “polegar opositor”. Muito obrigado por todo auxílio desde o amadurecimento da ideia desse projeto, pescas de poecilias, execução de todas as etapas científicas e por toda a descontração no laboratório e fora dele. 93!

Agradeço imensamente à equipe formada para realização da exposição e coleta de tecidos do delineamento experimental 2, Jacó, Marília (Lila), Flávia, Ísis e Daína. Sem dúvidas o auxílio de vocês para biometria, coleta e organização dos tubos poupou-nos centenas de horas de bancada. O sucesso dos experimentos do LABCAI certamente são frutos da boa organização de todos.

Ainda em relação a este experimento, um muito obrigado à Daína e ao Jacó pelo auxílio na avaliação das atividades enzimáticas, à Fernanda Ferrari que não é necessariamente do LABCAI, mas que me ajudou imensamente nas análises do transcriptoma MiSeq.

Ao Rodrigo Prim da CASAN que nos auxiliou nas autorizações e coletas do esgoto bruto diretamente da Estação de Tratamento de Esgoto Insular.

Às pesquisadoras Dra. Márcia Bicego e Dra. Satie Taniguchi do Instituto Oceanográfico da USP, pelas análises químicas de bioacumulação nos peixes.

Com relação aos delineamentos experimentais 3 e 4, gostaria de agradecer à Giulia Brocardo, IC de PIBIC que tem continuado os trabalhos com *P. vivipara* no laboratório (Jacó, seu legado está salvo!). A Giulia auxiliou na organização do bioensaios, em pescas, aclimação dos peixes, exposição e coleta. Aproveito para agradecer ao Miguel, que além de ser um grande amigo, assumiu a orientação da Giulia quando eu precisei me ausentar para terminar a tese.

Muito obrigado aos colegas do projeto: “Padronização de Técnicas e Análise de Biomarcadores em espécies de Tetrápodes Marinhos da Costa Brasileira”, pela oportunidade, Afonso Bainsy, Karim Lüchmann, Jacó, Bárbara (*Barbara barbara barbara*), Daína, Lígia e Luíza.

À Dra. Maria Risoleta, uma das coordenadoras do LABCAI, por não medir esforços para a organização do laboratório, pelas boas discussões nos seminários de grupo e por todo incentivo. A paixão da Riso pelo ensino é algo verdadeiramente inspirador.

Aos colegas e ex-colegas de LABCAI: Nestor Cubas, hoje STAE na UFSC, muito obrigado por todo auxílio de bioinformática. Luiz, Camila, Thiago, Amanda e Vanessa pela descontração e por dividir o bom gosto musical (ou pelo menos não reclamar do meu) na sala 93, ou na bancada. Ao Vanessão em especial por contribuir pela manutenção do som pesado. Agora dá para dividir a culpa... À Vera pela organização dos seminários e companhia agradável de bancada.

Ao Juliano Valério Luiz pela presteza e disponibilidade sempre que foi necessário limpar e organizar o bioensaios e o NEPAQ.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES), pela bolsa de Doutorado.

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Toxicologia Aquática (INCT-TA), ao Fixação Biológica de Nitrogênio (INCTFBN/CNPq-MCT) pelo auxílio financeiro do transcriptoma Ion Proton.

Ao CNPq Universal processo 425840/2016-6 pelo financiamento desse projeto.

À Alexandra Asanovna Elbakyan pela coragem e todo o serviço prestado à comunidade científica global sendo considerada uma das maiores divulgadoras científicas do nosso tempo.

À Banca examinadora por se disponibilizar a avaliar esse trabalho.

Gostaria de agradecer aos meus pais, minha irmã Kelly e minha tia Cleusa que mesmo ainda sem entender exatamente o que são os tais biomarcadores, transcriptomas e ecotoxicologia, sempre me apoiaram e torceram pelo meu sucesso.

"A poluição, a ganância e a estupidez são as maiores ameaças ao planeta."
(Stephen Hawking)

RESUMO

Nas últimas décadas, diversas substâncias químicas naturais ou de origem antrópicas potencialmente tóxicas têm sido lançadas no ambiente promovendo a contaminação dos ecossistemas. A poluição ambiental atualmente constitui um dos maiores problemas de saúde pública enfrentados em escala global. Ambientes aquáticos estão sujeitos a ameaças de múltiplas atividades humanas convertendo-se em uma espécie de sumidouro de contaminantes. A preocupação com a qualidade da água é prioritária, visto que até 2050 a população mundial deve ultrapassar nove bilhões de habitantes. O lançamento de esgoto sanitário não tratado é considerado a principal fonte de contaminantes de ambientes costeiros podendo apresentar uma numerosa família de compostos naturais ou sintéticos, referida como “contaminantes emergentes”. Dentre os compostos químicos presentes no esgoto há uma classe de surfactantes não iônicos altamente tóxicos: os alquilfenóis etoxilados (APEOs). Os APEOs são amplamente utilizados na produção de diversos produtos químicos. Há uma crescente preocupação quanto aos APEOs no ambiente devido ao fato de seus metabólitos serem menos biodegradáveis, mais lipofílicos e tóxicos que seus precursores e mimetizarem hormônios. O 4-n-Nonilfenol (NP) é apontado como o metabólito mais crítico dos APEOs. Monitorar os tipos e quantidades de substâncias tóxicas no ambiente, principalmente em misturas complexas, é uma tarefa exaustiva e desafiadora. Ferramentas integrativas baseadas em efeito, como biomarcadores, são recomendadas para o monitoramento da qualidade ambiental. Neste estudo, peixes *Poecilia vivipara* foram expostos ao esgoto sanitário na diluição de 33 % (v/v) por 24 e 96 horas para avaliar a resposta molecular de exposição através da identificação de transcritos gênicos no fígado dos animais expostos. Para isto foi realizada a montagem *de novo* do transcriptoma hepático utilizando as plataformas Ion Proton e MiSeq. Foram montadas 120.277 sequências via Ion Proton e 54.285 via Illumina MiSeq. A exposição ao esgoto sanitário alterou os níveis transcricionais hepáticos dos peixes, principalmente após 96 h de exposição, no qual foram observados 14 efeitos de interação nos genes receptores: *Receptor para aril hidrocarboneto (AhR)*, *Receptor pregnano x (PXR)*; genes de biotransformação de fase I: *Citocromo P450 família 1A1 (CYP1A1)*, *Citocromo P450 família 2K1 (CYP2K1)*, *Citocromo P450 família 3A30 (CYP3A30)*, *NADPH-quinona oxidorreductase-1 (NQO1)*; genes de biotransformação de fase II: *Uridina difosfato glicuronosiltransferase 1A1 (UGT1A1)*, *Glutaciona S-transferase A3 (GSTA3)*, *Glutaciona S-transferase Mu 3 (GSTmu)*, *Sulfotransferase 1C1 (ST1C1)*; enzimas antioxidantes: *Superóxido dismutase (SOD)*; transportadores do tipo ABC: *Proteína associada a multirresistência 1 (ABCC1)*, *Resistência a múltiplas drogas (MDR1)* e relacionado a desregulação endócrina: *Fator de transcrição SOX9 (SOX9)*, analisados por qPCR. Além de respostas transcricionais, foram observadas alterações nas atividades enzimáticas hepáticas e branquiais: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutaciona peroxidase total (GPx) e dependente de selênio (Se-GPx), glutaciona redutase (GR), glutaciona-S-transferase (GST), glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) e etóxi-resorufina O-deetilase (EROD). Todas as enzimas estudadas no presente trabalho apresentaram alguma diferença em ambos os períodos de exposição no fígado, e nas brânquias houve uma prevalência de resultados significativos após 96 h. Entretanto, a maioria das diferenças observadas foram em relação ao sexo dos animais e não à exposição ao esgoto. Os níveis transcricionais dos mesmos genes analisados no primeiro estudo foram quantificados em fígado de peixes *P. vivipara* injetados intraperitonealmente com NP (15 µg/g e 150 µg/g). Quatro apresentaram diferenças significativas em fígados de fêmeas: *AhR*, *PXR*, *GSTA3*, e *SOX9*, todos induzidos na dose menor de 15 µg/g de NP. Em machos, três foram alterados significativamente na dose menor, sendo um gene induzido: *ABCC1*, e dois reprimidos: *GSTA3* e *MRP2*. Na dose maior, de 150 µg/g de NP, *GSTA3* foi reprimido em fígado de machos. Quanto às gônadas, foram observadas

alterações significativas em *ABCC1* e *SOX9* de fêmeas expostas à maior dose de NP. Os resultados desse estudo demonstram que o esgoto sanitário e o NP afetaram diretamente o organismo dos peixes apresentando alterações em vias metabólicas como a de receptores nucleares, enzimas antioxidantes, biotransformação de fase I e II, transportadores do tipo ABC e relacionadas a desregulação endócrina, todas identificadas nos transcriptomas hepáticos aqui produzidos. As informações geradas nesse trabalho indicam que *P. vivipara* é um promissor modelo de organismo sentinela para estudos de ecotoxicologia, além disso, o grande avanço na obtenção de informações nucleotídicas para a espécie corrobora para a sua manutenção como organismo modelo. Também foram apresentados os primeiros estudos de exposição da espécie a xenobióticos levando em consideração fatores como sexo. Este conhecimento quanto ao modo de resposta de biomarcadores em relação ao gênero é fundamental para evitar interpretações equivocadas na avaliação de biomarcadores quanto aos efeitos dos poluentes.

Palavras-chave: *Poecilia vivipara*. Esgoto sanitário. 4-n-Nonilfenol. Transcriptoma. Biotransformação.

ABSTRACT

In recent decades, several potentially toxic natural or anthropogenic chemicals have been released into the environment promoting contamination of ecosystems. Environmental pollution is currently one of the biggest problems facing the world, representing a global public health problem. Aquatic environments are subject to threats from multiple human activities, becoming a kind of contaminant sink. Concern about water quality becomes a priority, given that by 2050 over nine billion inhabitants will be exceeded. The release of untreated sanitary sewage is considered the main source of contaminants from coastal environments, presenting a large family of natural or synthetic compounds, referred to as “emerging contaminants”. Among the chemical compounds present in sewage is a class of highly toxic nonionic surfactants: ethoxylated alkylphenols (APEOs). APEOs are widely used in the production of various chemicals. There is growing concern about APEOs in the environment because their metabolites are less biodegradable, more lipophilic and toxic than their precursors and mimic hormones. 4-n-Nonylphenol (NP) is identified as the most critical metabolite of APEOs. Monitoring the types and quantities of toxic substances in the environment, especially in complex mixtures, is an exhausting and challenging task. Integrative effect-based tools such as biomarkers are recommended for environmental quality monitoring. In this study, *Poecilia vivipara* fish were exposed to raw untreated sewage 33% (v/v) for 24 and 96 hours for identification of molecular biomarkers by a de novo transcriptome assembly of liver via next generation sequencers Ion Proton and MiSeq. 120,277 sequences were assembled via Ion Proton and 54,285 via Illumina MiSeq. Sanitary sewage was able to alter liver transcriptional levels of fish, especially after 96 h of exposure, in which 14 interaction effects were observed on the receptor genes: *Aryl hydrocarbon receptor (AhR)*, *Pregnane X receptor (PXR)*; phase I biotransformation genes: *Cytochrome P450 family 1A (CYP1A)*, *Cytochrome P450 family 2K1 (CYP2K1)*, *Cytochrome P450 family 3A30 (CYP3A30)*, *NAD(P)H dehydrogenase [quinone]1 (NQO1)*; phase II biotransformation genes: *UDP glycosyltransferase 1A1 (UGT1A1)*, *Glutathione S-transferase A3 (GSTa3)*, *Glutathione S-transferase Mu 3 (GSTmu)*, *Sulfotransferase 1C1 (ST1C1)*; antioxidant enzymes: *Superoxide dismutase (SOD)*; ABC transporter genes: *ATP Binding Cassette Subfamily C Member 1 (ABCC1)*, *Multidrug resistance protein 1 (MDR-1)*, and related to endocrine disruption: *SRY-Box9 (SOX9)*, measured by qPCR. In addition to transcriptional responses, changes in gills and liver enzymatic activities such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), total and selenium-dependent glutathione peroxidase (GPx and Se-GPx), glutathione reductase (GR), glutathione-S-transferase (GST), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) and ethoxy resorufin O-deethylase (EROD) were observed. All enzymes studied in the present study in liver showed some difference in both exposure times, while in the gills there was a prevalence of significant results after 96 h. However, most of the differences observed were regarding animal gender and not sewage exposure. The transcriptional levels of the same genes from the sewage experiment were evaluated by qPCR in liver of *P. vivipara* injected intraperitoneal with NP (15 µg/g and 150 µg/g). Four genes showed significant differences in female livers: *AhR*, *PXR*, *GSTa3*, and *SOX9*, all induced at the lower dose of 15 µg/g NP. In males, only three were significantly altered at the lowest dose, one induced gene: *ABCC1*, and two suppressed genes: *GSTa3* and *MRP2*. At the highest dose of 150 µg/g NP, only *GSTa3* was repressed in male liver. Regarding the gonads, significant changes were observed only in *ABCC1* and *SOX9* of females exposed to the highest dose of NP. The results of this study demonstrate that sanitary sewage and NP directly affected the fish organism presenting alterations in several metabolic pathways identified in the hepatic transcriptome produced here. Alterations in liver transcription and enzymatic activities in *P. vivipara* fish demonstrated the importance of the liver metabolic role

in maintaining homeostasis against xenobiotic insults. The information generated in this work is a great advance in the maintenance of the species as a promising model of sentinel organism in ecotoxicology studies, and in the nucleotide information for the species. The first studies of *P. vivipara* exposure to xenobiotics considering factors such as gender was also presented. This knowledge about how biomarkers respond to gender is critical to avoid misinterpretation in biomarker evaluation.

Keywords: *Poecilia vivipara*. Sanitary sewage. 4-n-Nonylphenol. Transcriptome. Biotransformation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Densidade populacional da Zona Costeira brasileira.	30
Figura 2. Proposta das rotas de degradação dos alquilfenóis etoxilados e formação dos metabólitos de APEO.	33
Figura 3. Estrutura química do 4-n-Nonilfenol. (A) Estrutura em 2D, (B) Modelo da estrutura em 3D. Oxigênio em vermelho, (C) NP ramificado e (D) Estrutura do 17 β -estradiol.	34
Figura 4. Peixe barrigudinho macho e descrição da filogenia de <i>Poecilia vivipara</i>	42
Figura 5. Representação esquemática do delineamento experimental 2. Exposição de peixes <i>P.vivipara</i> ao esgoto sanitário 33 % (v/v) por 96 horas.	54
Figura 6. Plano de trabalho da montagem <i>de novo</i> e análise do transcriptoma hepático de <i>P. vivipara</i> expostos ao esgoto sanitário 33 % (v/v) por 24 h via Ion Proton. Nos detalhes estão descritos os processos de construção das bibliotecas de cDNA, amplificação, sequenciamento e análises de bioinformática.	58
Figura 7. Plano de trabalho da montagem <i>de novo</i> e análise do transcriptoma hepático de <i>P. vivipara</i> expostos ao esgoto sanitário 33 % por 24 h via Illumina MiSeq. Nos detalhes estão descritos os processos de construção das bibliotecas de cDNA, clusterização, sequenciamento e análises de bioinformática.	60
Figura 8. Perfil da Expressão Ex contra N50.	92
Figura 9. Classificação da ontologia gênica dos unigenes e distribuição das categorias GO atribuídas ao transcriptoma de <i>Poecilia vivipara</i> . Os transcritos foram classificados em três categorias: componentes celulares, funções moleculares e processos biológicos.	94
Figura 10. Análise da estabilidade da transcrição gênica dos genes referência <i>fator de alongação 2 (EF2)</i> , <i>proteína ribossomal 40S S2 (40S2)</i> e <i>proteína ribossomal 40S S11 (40S11)</i> após 24 h de exposição ao esgoto sanitário 33 %. Os valores de estabilidade dos genes candidatos foram calculados pelo método ΔCq (A), normFinder (B), BestKeeper (C), Genorm (D) e RefFinder (E). Valores menores indicam maior estabilidade da transcrição.	104
Figura 11. Análise da estabilidade da transcrição gênica dos genes referência <i>fator de alongação 2 (EF2)</i> , <i>proteína ribossomal 40S S2 (40S2)</i> e <i>proteína ribossomal 40S S11 (40S11)</i> após 96 h de exposição ao esgoto sanitário 33 %. Os valores de estabilidade dos genes candidatos foram calculados pelo método ΔCq (A), normFinder (B), BestKeeper (C), Genorm (D) e RefFinder (E). Valores menores indicam maior estabilidade da transcrição.	105
Figura 12. Transcrição gênica dos receptores nucleares e fase I de biotransformação em fígados de peixes <i>P. vivipara</i> machos e fêmeas expostos ao esgoto sanitário 33 % por 24 h e 96 h e os	

seus respectivos grupos controle. Os níveis dos transcritos dos genes *AhR*, *PXR*, *ER*, *CYP1A1*, *CYP2K1* e *CYP3A30* estão normalizados pelo gene referência *EF2* e relativizados pelo grupo controle machos do seu respectivo período de exposição. Os dados estão apresentados em média \pm desvio padrão. Letras maiúsculas diferentes representam diferença significativa para o fator sexo. Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa entre os grupos no mesmo sexo ($p < 0,05$). 107

Figura 13. Transcrição dos genes de fase I e II de biotransformação e defesa antioxidante em fígados de peixes *P. vivipara* machos e fêmeas expostos ao esgoto sanitário 33 % por 24 h e 96 h e os seus respectivos grupos controle. Os níveis dos transcritos dos genes *NQO1*, *UGT1A1*, *GSTa3*, *GSTmu*, *STIC1* e *SOD* estão normalizados pelo gene referência *EF2* e relativizados pelo grupo controle machos do seu respectivo período de exposição. Os dados estão apresentados em média \pm desvio padrão. Letras maiúsculas diferentes representam diferença significativa para o fator sexo. Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa entre os grupos no mesmo sexo ($p < 0,05$). 110

Figura 14. Transcrição dos genes transportadores e relacionados a disruptores endócrinos em fígados de peixes *P. vivipara* machos e fêmeas expostos ao esgoto sanitário 33 % por 24 h e 96 h e os seus respectivos grupos controle. Os níveis dos transcritos dos genes *ABCC1*, *MDR1*, *MRP2*, *SOX9* e *VIT* estão normalizados pelo gene referência *EF2* e relativizados pelo grupo controle machos do seu respectivo período de exposição. Os dados estão apresentados em média \pm desvio padrão. Letras maiúsculas diferentes representam diferença significativa para o fator sexo. Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa entre os grupos no mesmo sexo ($p < 0,05$). 113

Figura 15. Compilado dos efeitos observados na transcrição gênica em fígados de *P. vivipara* expostos por 24 e 96 h ao esgoto sanitário. Setas verdes indicam aumento da transcrição, setas vermelhas indicam diminuição da transcrição..... 114

Figura 16. Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPx), glutathiona peroxidase selênio dependente (Se-GPx), glutathiona redutase (GR), glutathiona S-transferase (GST), glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) e etóxi-resorufina O-deetilase (EROD) em fígados de peixes *Poecilia vivipara* expostos ao esgoto sanitário 33 % por 24 e 96 h. Os dados estão apresentados em média \pm desvio padrão. Letras maiúsculas diferentes representam diferença significativa para o fator sexo. Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa entre os grupos no mesmo sexo ($p < 0,05$). .. 122

Figura 17. Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutational peroxidase total (GPx) e selênio dependente (Se-GPx), glutational redutase (GR), glutational S-transferase (GST), glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) e etóxi-resorufina O-deetilase (EROD) em brânquias de peixes <i>Poecilia vivipara</i> expostos ao esgoto sanitário 33 % por 24 e 96 h. Os dados estão apresentados em média ± desvio padrão. Letras maiúsculas diferentes representam diferença significativa para o fator sexo. Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa entre os grupos no mesmo sexo ($p < 0,05$).	125
Figura 18. Atividade das enzimas acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BuChE) em cérebros de peixes <i>Poecilia vivipara</i> expostos ao esgoto sanitário 33 % por 24 e 96 h. Os dados estão apresentados em média ± desvio padrão. Letras maiúsculas diferentes representam diferença significativa para o fator sexo. Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa entre os grupos no mesmo sexo ($p < 0,05$).	127
Figura 19. Delineamento experimental da exposição de peixes <i>P. vivipara</i> a duas doses de 4-n-Nonilfenol via intraperitoneal por 24 horas. A) Exposição de machos; B) Exposição de fêmeas.	145
Figura 20. Transcrição dos genes candidatos a referência em fígado de <i>P. vivipara</i> fêmeas expostas ao 4-n-Nonilfenol em doses de 15 µg/g e 150 µg/g por 24 h e o seu respectivo grupo controle. (A) fator de alongação 2 (EF2), (B) proteína ribossomal 40S S11 (40S11) e (C) proteína ribossomal 40S S2 (40S2). Os dados estão apresentados em média ± desvio padrão.	149
Figura 21. Transcrição dos genes candidatos a referência em fígado de <i>P. vivipara</i> machos expostos ao 4-n-Nonilfenol em doses de 15 µg/g e 150 µg/g por 24 h e o seu respectivo grupo controle. (A) fator de alongação 2 (EF2), (B) proteína ribossomal 40S S11 (40S11) e (C) proteína ribossomal 40S S2 (40S2). O asterisco (*) significa diferença significativa ($p < 0,05$). Os dados estão apresentados em média ± desvio padrão.	150
Figura 22. Análise da estabilidade da transcrição gênica dos genes referência fator de alongação 2 (EF2), proteína ribossomal 40S S2 (40S2) e proteína ribossomal 40S S11 (40S11) em fígados de <i>P. vivipara</i> machos, após 24 h de exposição ao 4-n-Nonilfenol em doses de 15 µg/g e 150 µg/g. Os valores de estabilidade dos genes candidatos foram calculados pelo método ΔCq (A), normFinder (B), BestKeeper (C), Genorm (D) e RefFinder (E). Valores menores indicam maior estabilidade da transcrição.	151
Figura 23. Transcrição gênica dos receptores nucleares e fase I de biotransformação em fígados de peixes <i>P. vivipara</i> fêmeas expostas ao 4-n-Nonilfenol em doses de 15 µg/g e 150 µg/g por 24 h e o seu respectivo grupo controle. Os níveis dos transcritos dos genes <i>AhR</i> , <i>PXR</i> , <i>ER</i> ,	

CYP1A1, *CYP2K1* e *CYP3A30* estão normalizados pela média geométrica dos genes referência *EF2*, *40S11* e *40S2*, e relativizados pelo grupo controle. Os dados estão apresentados em média \pm desvio padrão. Letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$)..... 153

Figura 24. Transcrição dos genes de biotransformação de fase II, transportadores e relacionados à desregulação endócrina em fígados de peixes *P. vivipara* fêmeas expostas ao 4-n-Nonilfenol em doses de 15 $\mu\text{g/g}$ e 150 $\mu\text{g/g}$ por 24 h e o seu respectivo grupo controle. Os níveis dos transcritos dos genes *UGT1a1*, *GSTa3*, *ABCC1*, *MRP2*, *SOX9* e *VIT* estão normalizados pela média geométrica dos genes referência *EF2*, *40S11* e *40S2*, e relativizados pelo grupo controle. Os dados estão apresentados em média \pm desvio padrão. Letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$)..... 154

Figura 25. Transcrição gênica dos receptores nucleares e fase I de biotransformação em fígados de peixes *P. vivipara* machos expostos ao 4-n-Nonilfenol em doses de 15 $\mu\text{g/g}$ e 150 $\mu\text{g/g}$ por 24 h e o seu respectivo grupo controle. Os níveis dos transcritos dos genes *AhR*, *PXR*, *ER*, *CYP1A1*, *CYP2K1* e *CYP3A30* estão normalizados pelo gene referência *EF2* e relativizados pelo grupo controle. Os dados estão apresentados em média \pm desvio padrão. Letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$)..... 156

Figura 26. Transcrição dos genes de biotransformação de fase II, transportadores e relacionados à desregulação endócrina em fígados de peixes *P. vivipara* machos expostos ao 4-n-Nonilfenol em doses de 15 $\mu\text{g/g}$ e 150 $\mu\text{g/g}$ por 24 h e o seu respectivo grupo controle. Os níveis dos transcritos dos genes *UGT1a1*, *GSTa3*, *ABCC1*, *MRP2* e *SOX9* estão normalizados pelo gene referência *EF2* e relativizados pelo grupo controle. Os dados estão apresentados em média \pm desvio padrão. Letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$)..... 157

Figura 27. Transcrição dos genes candidatos a referência em gônadas de *P. vivipara* fêmeas expostas ao 4-n-Nonilfenol em doses de 15 $\mu\text{g/g}$ e 150 $\mu\text{g/g}$ por 24 h e o seu respectivo grupo controle. (A) fator de alongação 2 (*EF2*), (B) proteína ribossomal 40S S11 (*40S11*) e (C) proteína ribossomal 40S S2 (*40S2*). O asterisco (*) significa diferença significativa ($p < 0,05$). Os dados estão apresentados em média \pm desvio padrão. 158

Figura 28. Análise da estabilidade da transcrição gênica dos genes referência fator de alongação 2 (*EF2*), proteína ribossomal 40S S2 (*40S2*) e proteína ribossomal 40S S11 (*40S11*) em gônadas de *P. vivipara* fêmeas, após 24 h de exposição ao 4-n-Nonilfenol em doses de 15 $\mu\text{g/g}$ e 150 $\mu\text{g/g}$. Os valores de estabilidade dos genes candidatos foram calculados pelo método

ΔCq (A), normFinder (B), BestKeeper (C), Genorm (D) e RefFinder (E). Valores menores indicam maior estabilidade da transcrição..... 159

Figura 29. Transcrição dos genes candidatos a referência em gônadas de *P. vivipara* machos expostos ao 4-n-Nonilfenol em doses de 15 $\mu\text{g/g}$ e 150 $\mu\text{g/g}$ por 24 h e o seu respectivo grupo controle. (A) fator de alongação 2 (*EF2*), (B) proteína ribossomal 40S S11 (*40S11*) e (C) proteína ribossomal 40S S2 (*40S2*). Os dados estão apresentados em média \pm desvio padrão. 160

Figura 30. Transcrição gênica dos receptores nucleares e biotransformação de fase I e II em gônadas de peixes *P. vivipara* fêmeas expostas ao 4-n-Nonilfenol em doses de 15 $\mu\text{g/g}$ e 150 $\mu\text{g/g}$ por 24 h e o seu respectivo grupo controle. Os níveis dos transcritos dos genes *AhR*, *PXR*, *ER*, *CYP3A30* e *GSTa3* estão normalizados pelo gene referência *EF2* e relativizados pelo grupo controle. Os dados estão apresentados em média \pm desvio padrão. 161

Figura 31. Transcrição dos genes transportadores e relacionados a disruptores endócrinos em gônadas de peixes *P. vivipara* fêmeas expostas ao 4-n-Nonilfenol em doses de 15 $\mu\text{g/g}$ e 150 $\mu\text{g/g}$ por 24 h e o seu respectivo grupo controle. Os níveis dos transcritos dos genes *ABCC1*, *MRP2*, *SOX9*, *ZP* e *VIT* estão normalizados pelo gene referência *EF2* e relativizados pelo grupo controle. Os dados estão apresentados em média \pm desvio padrão. Letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$). 163

Figura 32. Transcrição gênica dos receptores nucleares e biotransformação de fase II em gônadas de peixes *P. vivipara* machos expostos ao 4-n-Nonilfenol em doses de 15 $\mu\text{g/g}$ e 150 $\mu\text{g/g}$ por 24 h e o seu respectivo grupo controle. Os níveis dos transcritos dos genes *AhR*, *PXR*, *ER*, *UGT1a1* e *GSTa3* estão normalizados pela média geométrica dos genes referência *EF2*, *40S11* e *40S2*, e relativizados pelo grupo controle. Os dados estão apresentados em média \pm desvio padrão. 164

Figura 33. Transcrição dos genes transportadores e relacionados a desreguladores endócrinos em gônadas de peixes *P. vivipara* machos expostos ao 4-n-Nonilfenol em doses de 15 $\mu\text{g/g}$ e 150 $\mu\text{g/g}$ por 24 h e o seu respectivo grupo controle. Os níveis dos transcritos dos genes *ABCC1*, *MRP2*, *SOX9* e *VIT* estão normalizados pela média geométrica dos genes referência *EF2*, *40S11* e *40S2*, e relativizados pelo grupo controle. 165

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência de iniciadores senso (F) e antissenso (R) dos genes de <i>Poecilia vivipara</i> selecionados: Citocromo P450 família 1A (CYP1A), Citocromo P450 família 3A30 (CYP3A30), Citocromo P450 família 2K1 (CYP2K1), Superóxido dismutase (SOD), Receptor para aril hidrocarboneto (AhR), Receptor pregnano X (PXR), Glutaciona S-transferase A3 (GSTa3), Glutaciona S-transferase Mu 3 (GSTMu), Fator de transcrição SOX9 (SOX9), Receptor de estrogênio alfa (ER), Vitelogenina-1 (VIT), Zona pelúcida glicoproteína 4 (ZP4), Proteína associada a multirresistência 1 (ABCC1), Resistência a múltiplas drogas (MDR-1), Proteína associada a multirresistência 2 (MRP2), Sulfotransferase 1C1 (ST1C1), Uridina difosfato glicuronosiltransferase 1A1 (UGT1A1), NADPH-quinona oxidorreductase-1 (NQO1), Fator de alongação 2 (EF2), Proteína ribossomal 40S S2 (40S2) e Proteína ribossomal 40S S11 (40S11).	61
Tabela 2. Níveis de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (ng.g ⁻¹) por peso seco detectados em tecido de peixes <i>P.vivipara</i> nos grupos controle e expostos após 24 h e 96 h de exposição ao esgoto sanitário 33 % (v/v).	70
Tabela 3. Níveis de bifenilas policloradas (ng.g ⁻¹) por peso seco detectado em peixes <i>P.vivipara</i> nos grupos controle e exposto após 24 h e 96 h de exposição ao esgoto sanitário 33 % (v/v).	72
Tabela 4. Níveis de alquilbenzenos lineares (ng.g ⁻¹) por peso seco detectado em peixes <i>P.vivipara</i> nos grupos controle e exposto após 24 h e 96 h de exposição ao esgoto sanitário 33 % (v/v).	74
Tabela 5. Propriedades químicas e biológicas do esgoto sanitário bruto, água do mar filtrada dos grupos controle e esgoto sanitário 33 % (v/v) dos grupos expostos pré-exposição (tempo 0 h) e renovação dos aquários após 48 h.	76
Tabela 6. Total de <i>reads</i> das bibliotecas hepáticas de <i>P. vivipara</i> dos grupos controle e exposto ao esgoto sanitário 33 % (v/v) sequenciadas na plataforma Ion Proton após verificação da qualidade e limpeza de dados.	77
Tabela 7. Comparação das métricas do sequenciamento e montagem <i>de novo</i> do transcriptoma hepático de <i>P. vivipara</i> expostos ao esgoto sanitário 33 % (v/v) por 24 h utilizando os montadores Trinity e Velvet-Oases, com diferentes valores de k-mer.....	78
Tabela 8. Sumário dos transcritos e unigenes de <i>P. vivipara</i> montados <i>de novo</i> pelo software Trinity.	80

Tabela 9. Lista das fases de leitura abertas - ORFs completas com pelo menos 80 % de identidade e descrição da família proteica putativa do banco de dados Pfam analisadas no transcriptoma hepático de <i>P. vivipara</i> montado <i>de novo</i>	80
Tabela 10. Controle de qualidade dos dados sequenciados brutos e após a limpeza e filtragem por nota <i>phred</i>	88
Tabela 11. Métrica de avaliação da qualidade de montagem do transcriptoma relacionando o número de sequências com o percentual de correspondências únicas identificadas em proteínas conhecidas de bancos de dados públicos.....	89
Tabela 12. Identificação das ORFs completas, parciais 3' e 5', e internas do transcriptoma hepático de <i>P. vivipara</i> expostos ao esgoto sanitário 33 % (v/v) via Illumina MiSeq.....	89
Tabela 13. Sumário dos transcritos e unigenes de <i>P. vivipara</i> montados <i>de novo</i> pelo software Trinity.....	90
Tabela 14. Estatística ExN50 da montagem <i>de novo</i> do transcriptoma hepático de <i>P. vivipara</i>	91
Tabela 15. Resultados da anotação funcional do transcriptoma hepático de <i>P. vivipara</i> via Illumina MiSeq obtidos no programa Trinotate.....	93
Tabela 16. Transcritos anotados pertencentes aos processos de biotransformação de fase I e II, transportadores nucleares do tipo ABC, receptores nucleares e com atividades antioxidantes.....	96
Tabela 17. Comparação das métricas dos transcritos e unigenes de <i>P. vivipara</i> montados <i>de novo</i> pelo software Trinity via Ion Proton e Illumina MiSeq.....	100
Tabela 18. Sumário dos níveis de biomarcadores em fígado e brânquias de <i>P. vivipara</i> expostas ao esgoto sanitário 33 % por 24 h e 96 h. Letras diferentes representam diferenças estatísticas para os fatores sexo ou exposição. Letra acompanhada de seta indicam níveis maiores (↑) ou menores (↓) de transcritos ou atividade enzimática. Setas na coluna Interação indicam o tipo de efeito no sexo específico.....	215

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

®	Marca comercial registrada, do inglês " <i>Registered Trademark</i> "
12S	RNA ribossomal mitocondrial 12S
16S	RNA ribossomal 16S
18S	RNA ribossomal 18S
28S	RNA ribossomal 28S
40S11	Proteína ribossomal 40S S11
40S2	Proteína ribossomal 40S S2
5.8S	RNA ribossomal 5.8S
5S	RNA ribossomal 5S
ABC	<i>ATP binding cassette</i>
ABCC1	Proteína associada a multirresistência 1
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AChE	Acetilcolinesterase
AhR	Receptor para aril hidrocarboneto
ANDR	Receptor de andrógeno
ANF	Fator atrial natriurético
ANOVA	Análise de variância
AP	Alquilfenol
APEO	Alquilfenol etoxilado
ARNT	Translocador nuclear AhR
ATP	Trifosfato de adenosina
BLAST	Ferramenta de busca por alinhamento local, do inglês " <i>Basic Local Alignment Search Tool</i> "
BSA	Albumina sérica bovina
BUChE	Butirilcolinesterase
C2H2	Domínio Cis2-His2
CASAN	Companhia Catarinense de Águas e Saneamento
CAT	Catalase
cDNA	DNA complementar
CDNB	1-Cloro-2,4-dinitrobenzeno
CEPA	Ato Canadense de Proteção Ambiental
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais da UFSC
CID	Número de identidade do composto químico
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
Cq	Ciclo da reação que atinge a fluorescência limiar
CT	Controle
CYP	Citocromo P450 monoxigenase
CYP1A	Citocromo P450 família 1A
CYP2K1	Citocromo P450 família 2K1
CYP3A30	Citocromo P450 família 3A30
DBO	Demanda bioquímica de oxigênio
DDT	diclorodifeniltricloroetano
DNA	Ácido desoxirribonucleico

dNTP	mistura equimolar de desoxirribonucleotídeos fosfatados (dATP, dCTP, dGTP e dTTP)
DOEO	Dodecilfenol etoxilado
DQO	Demanda química de oxigênio
DRE	Elemento de resposta a dioxina
DTT	DL-Ditiotreitol
E₂	17 β -estradiol
EDC	Composto desregulador endócrino
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EE₂	17 α -etinilestradiol
EF2	Fator de alongação 2
eggNOG	banco de dados de grupos ortólogos e anotações funcionais
ER	Receptor de estrógeno
EROD	7-etóxi-resorufina O-deetilase
EROS	Espécies reativas de oxigênio
ESR1	Receptor de estrogênio alfa
EST	<i>Expressed sequence tags</i>
ETA	Estação de tratamento de esgoto
EX	Exposto
EX90N50	Métrica N50 da montagem considerando 90 % da expressão total
ExN50	Métrica N50 da montagem considerando "X" % da expressão total
FMO	Flavina contendo dimetilanilina monoxigenase 2
G6PDH	Glicose-6-fosfato desidrogenase
GC-ECD	Cromatógrafo a gás equipado com detector de captura de elétrons
GCL	Glutamato cisteína ligase
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
GHR	Receptor do hormônio de crescimento
GO	Ontologia gênica, do inglês " <i>Gene Ontology</i> "
GPx	Glutaciona peroxidase
GR	Glutaciona redutase
GSH	Glutaciona reduzida
GSHR	Glutaciona redutase
GSSG	Glutaciona dissulfídica
GST	Glutaciona S-transferase
GSTa3	Glutaciona S-transferase A3
GSTmu	Glutaciona S-transferase mu
h	Hora
HMG	Grupo de alta mobilidade, do inglês " <i>High mobility group</i> "
HMMER	Modelo oculto de Markov
HPA	Hidrocarboneto policíclico aromático
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICMBio	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
IO USP	Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo
IP	Intraperitoneal

JEA	Agência do Meio Ambiente do Japão
KEGG	Enciclopédia de Genes e Genoma de Kioto
KH1	Domínio de homologia K
Kow	coeficiente de partição octanol água
LAB	Alquilbenzeno linear
LABCAI	Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica
LabQOM	Laboratório de Química Orgânica Marinha do IO USP
LAPMAR	Laboratório de Psicultura Marinha da UFSC
LPO	Peroxidação lipídica
MDR1	Proteína de resistência a multidrogas 1
MRP2	Proteína associada a resistência multidrogas 2
N25	Métrica estatística do comprimento médio dos transcritos em 25 % da montagem
N50	Métrica estatística do comprimento médio dos transcritos em 50 % da montagem
N75	Métrica estatística do comprimento médio dos transcritos em 75 % da montagem
N90	Métrica estatística do comprimento médio dos transcritos em 90 % da montagem
N95	Métrica estatística do comprimento médio dos transcritos em 95 % da montagem
NADPH	β -nicotinamida adenina dinucleotídeo 2'fostato
NCBI	Centro Nacional de Informação Biotecnológica
NGS	Sequenciamento de próxima geração
nm	parâmetro não medido
NMP	Número mais provável
NP	4-n-Nonilfenol
NP1EO	Nonilfenol monoetoxilado
NP2EO	Nonilfenol dietoxilado
NPEO	Nonilfenol etoxilado
NQO1	NADPH-quinona oxidorreductase 1
NR	Receptores nucleares
NR1H3	Receptor de oxiesteroides LXR-alfa
NTU	Unidade nefelométrica de turbidez
OATP	Polipeptídio transportador de ânion orgânico
OCP	Pesticidas organoclorados
OPEO	Octilfenol etoxilado
ORF	Fase de leitura aberta
OSPAR	Comissão de Oslo Paris
p	Probabilidade de significância
pb	Par de bases
PCB	bifenilas policloradas
PCDD	Dibenzo-p-dioxinas
PCDF	Dibenzofuranos policlorados
PE	<i>Paired end</i> - Leituras pareadas
Pfam	Base de dados de família de proteínas
PLANSAB	Plano Nacional de Saneamento Básico
PMSF	Fluoreto de fenilmetasulfonil
PNSB	Pesquisa Nacional de Saneamento Básico

POP	Poluentes Orgânicos Persistentes
PPAR	Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma alfa
PPCP	Fármacos e produtos de cuidado pessoal
PRDX	Peroxirredoxina-1
PXR	Receptor de pregnano X
Q20	Escore de qualidade de <i>base-calling</i>
qPCR	PCR quantitativo em tempo real
R²	Coefficiente de determinação
RNA	Ácido ribonucleico
RNA_m	RNA mensageiro
RNA-Seq	Sequenciamento de RNA
RORB	Receptor nuclear ROR-beta
RRM	Motivo de reconhecimento de RNA
RXR	Receptor de ácido retinóico RXR
Se-GPx	Glutathione peroxidase dependente de selênio
signalP	Peptídeo sinal
SLC	Superfamília transportadora de solutos
SM	Método Padrão
SMRT	Sequenciamento de molécula única em tempo real
SNIS	Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento
SNP	Polimorfismo de único nucleotídeo
SOD	Superóxido dismutase
SOX9	Fator de transcrição SOX9
SQLite	Base de dados baseada em Linguagem de Consulta Estruturada
SRA	Banco de dados <i>Sequence read archive</i>
SRCR	Domínio receptor scavenger rico em cisteína
SRY	Gene determinador sexual da região Y
ST1C1	Sulfotransferase 1
SULT	Sulfotransferases
TH	Receptor do hormônio da tireoide
tmHMM	ferramenta de busca de domínios transmembrana
TRIS	2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3diol
TRXR	Tiorredoxina redutase
™	Marca comercial registrada, do inglês " <i>Registered Trademark</i> "
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
UGT	Uridina difosfato glicuronosil transferase
UGT1A1	UDP-glicuronosiltransferase 1A1
UKEA	Agência Ambiental do Reino Unido
USEPA	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos
USP	Universidade de São Paulo
VIT	Vitelogenina
WWF	Fundação Mundial de Animais Silvestres
XR	Receptores de xenobióticos
XRE	Elemento de resposta a xenobiótico
ZP4	Zona Pelucida

$\Delta\Delta C_q$ Método do C_q comparativo ou Delta delta C_q

PADROES UTILIZADOS:

Nomenclatura Orgânica e Inorgânica, Aminoácidos e Nucleotídeos: União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) para abreviaturas e siglas.

Simbolos métricos: Sistema Internacional de Unidades.

SUMÁRIO

1	CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO GERAL	29
1.1	CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL.....	29
1.2	BIOMARCADORES DE CONTAMINAÇÃO AQUÁTICA	35
1.3	ECOTOXICOGENÔMICA	38
1.4	PEIXES COMO ORGANISMOS SENTINELA DE CONTAMINAÇÃO.....	40
1.5	OBJETIVOS E CONSIDERAÇÕES SOBRE A ESTRUTURA DO TEXTO.....	44
1.5.1	Objetivo Geral	44
1.5.2	Objetivos Específicos	44
1.5.3	Considerações sobre a estrutura do texto	44
2	CAPÍTULO II: ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS E MOLECULARES EM PEIXES <i>Poecilia vivipara</i> (Bloch e Schneider, 1801) EXPOSTOS AO ESGOTO SANITÁRIO	46
3	INTRODUÇÃO	47
4	OBJETIVOS	50
5	METODOLOGIA	52
5.1	COLETA E ACLIMATAÇÃO DOS ANIMAIS	52
5.2	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL 1	52
5.3	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL 2.....	53
5.4	ANÁLISES QUÍMICAS.....	54
5.4.1	Análise de contaminantes orgânicos em tecidos	54
5.4.2	Caracterização da água marinha e esgoto sanitário utilizado nas exposições	55
5.5	ANÁLISES MOLECULARES	56
5.5.1	Preparação das bibliotecas para NGS Ion Proton	56
5.5.2	Preparação das bibliotecas para NGS Illumina MiSeq	56
5.5.3	Análises de bioinformática	57
5.5.4	Análise da transcrição gênica por PCR quantitativo em tempo real (qPCR)	60
5.5.4.1	Seleção dos genes e desenho de iniciadores	60

5.5.4.2	Extração de RNA total e síntese de cDNA.....	62
5.5.4.3	Padronização das reações e análise de qPCR.....	63
5.6	ANÁLISES BIOQUÍMICAS	64
5.6.1	Homogeneização	64
5.6.2	Determinação da concentração de proteínas	65
5.6.3	Análise da atividade das enzimas de biotransformação de fases I e II	65
5.6.4	Análise da atividade da glutathiona peroxidase (GPx)	66
5.6.5	Análise da atividade glutathiona redutase (GR)	66
5.6.6	Análise da atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH)	66
5.6.7	Análise da atividade da catalase (CAT)	67
5.6.8	Análise da atividade da superóxido dismutase (SOD)	67
5.6.9	Análise da acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BuChE)	67
5.6.10	Análise estatística	67
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
6.1	CONTAMINANTES ORGÂNICOS DELINEAMENTO EXPERIMENTAL 1	68
6.1.1	Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs)	68
6.1.2	Bifenilas policloradas (PCBs)	71
6.1.3	Alquilbenzenos lineares (LABs)	74
6.2	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO ESGOTO BRUTO, ÁGUA MARINHA E ESGOTO SANITÁRIO 33 %	75
6.3	TRANSCRIPTOMA VIA ION PROTON	77
6.3.1	Montagem <i>de novo</i> do transcriptoma	77
6.3.2	Anotação do transcriptoma	80
6.4	TRANSCRIPTOMA VIA MiSEQ	87
6.4.1	Montagem <i>de novo</i> do transcriptoma	87
6.4.2	Anotação do transcriptoma	92
6.5	COMPARATIVO ENTRE OS TRANSCRIPTOMAS	99

6.6	TRANSCRIÇÃO GÊNICA qPCR	102
6.6.1	Teste dos genes normalizadores	102
6.6.2	Transcrição dos genes de interesse	106
6.6.3	Correlações transcricionais	115
6.7	ATIVIDADE ENZIMÁTICA	121
7	CONCLUSÃO	136
8	CAPÍTULO III: ALTERAÇÕES MOLECULARES EM PEIXES <i>Poecilia vivipara</i> (Bloch e Schneider, 1801) EXPOSTOS AO 4-n-NONILFENOL	138
9	INTRODUÇÃO	139
10	OBJETIVOS	143
10.1	Objetivo geral	143
10.2	Objetivos específicos.....	143
11	METODOLOGIA	144
11.1	COLETA E ACLIMATAÇÃO DOS ANIMAIS	144
11.2	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL 3 e 4.....	144
11.2.1	Preparação das doses e exposição dos peixes ao 4-n-Nonilfenol	144
11.3	EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL	146
11.4	SÍNTESE DE cDNA	146
11.5	ANÁLISE DE qPCR.....	146
11.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	148
12	RESULTADOS.....	149
13	DISCUSSÃO	165
14	CONCLUSÕES	170
15	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	171
	REFERÊNCIAS	172
	APÊNDICE A – Sumário dos biomarcadores avaliados em fígados e brânquias de <i>Poecilia vivipara</i> expostos ao esgoto sanitário 33 % (v/v) por 24 h e 96 h.	215

1 CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO GERAL

1.1 CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL

Nas últimas décadas, tem sido observado um aumento crescente no lançamento de diversas substâncias químicas de origem natural ou antrópica potencialmente tóxicas no ambiente, promovendo a contaminação dos ecossistemas terrestres e aquáticos (ADAM et al., 2010; CAJARAVILLE et al., 2000; NAIDU et al., 2016). Atualmente a poluição ambiental constitui-se em um dos maiores problemas enfrentados no mundo, e vem piorando a cada ano, representando uma ameaça à saúde pública em escala global (NERIS et al., 2019).

Ambientes aquáticos, incluindo ecossistemas de água doce, estuarina e marinha, estão sujeitos ao impacto de múltiplas atividades humanas, tais como sua utilização como fontes de alimento e matéria-prima, transporte, recreação, entre outros (BORGWARDT et al., 2019), convertendo-se, em última análise, em uma espécie de sumidouro de contaminantes (CAMARGO et al., 2017). A alta taxa de ocupação urbana e a expansão dos centros industriais têm progressivamente aumentado o risco de contaminação dos ambientes aquáticos situados próximos a estas áreas, gerando discussões aprofundadas sobre o assunto e fomentando novos estudos relacionados à influência e as consequências das atividades antrópicas na degradação dos recursos hídricos (DE MELO GURGEL et al., 2016; MARTÍN-POZO et al., 2019; VERAS et al., 2019). A preocupação com a qualidade da água torna-se cada vez mais prioritária, visto que as projeções de aumento da população estimam que até 2050 sejam ultrapassados os nove bilhões de habitantes (BARRIOS-ESTRADA et al., 2018), e aumentando a demanda de água para irrigação, para uso industrial e também doméstico (ABBASPOUR et al., 2015). Outro fator importante é que uma porção significativa da população mundial habita as zonas costeiras e depende, direta ou indiretamente, dos recursos ambientais oriundos destes ecossistemas (COSTA; PESSOA; CARREIRA, 2018; DE ANDRÉS; BARRAGÁN; SCHERER, 2018). Essas áreas são de grande importância em termos ecológicos, econômicos e sociais e desempenham um papel importante na diminuição dos impactos dos fenômenos meteorológicos, contribuindo para a resiliência das populações marinhas e costeiras. Entretanto, estas áreas apresentam alta vulnerabilidade aos efeitos das mudanças ambientais e aos estressores antropogênicos (FERRO-AZCONA et al., 2019; ROBERTS et al., 2017), como o

lançamento de esgoto sanitário não tratado, que é considerado a principal fonte de contaminantes de ambientes costeiros (CARREIRA et al., 2015; KENNISH, 1991).

Com uma das maiores densidades populacionais costeiras na América do Sul (**Figura 1**), muitas cidades brasileiras não dispõem de estações de coleta, tratamento e descarte de esgoto no ambiente de maneira sustentável (ABESSA et al., 2005; ROTH et al., 2016). Este problema crescente está geralmente associado a uma má gestão do tratamento de efluentes em plantas antigas, com pouca infraestrutura, e estratégias de descarte e tratamento limitados ou mesmo inexistentes (BARRIOS-ESTRADA et al., 2018; MARTÍN-POZO et al., 2019). Deste modo, a constante pressão antrópica nos ecossistemas aquáticos resultam na contínua e intensa perda de biodiversidade, que se apresenta superior ao observado nos ecossistemas terrestres (BORGWARDT et al., 2019).

Figura 1. Densidade populacional da Zona Costeira brasileira.



Fonte: Adaptada de De Andrés; Barragán; Scherer (2018).

De acordo com o Diagnóstico dos Serviços de Água e Esgotos de 2016 do Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento (SNIS, 2018), 51,9 % dos municípios brasileiros possuíam rede coletora, onde somente 44,9 % de todo esgoto gerado foi coletado. De todo o esgoto coletado no Brasil no ano de 2016, aproximadamente 74,9 % passou por algum tipo de tratamento. Em Santa Catarina, o índice médio de atendimento urbano com rede coletora de esgotos aponta valores entre 20 e 40 % de todo o esgoto gerado no estado. De acordo com a Agenda 2030 para o desenvolvimento sustentável, o 6º dentre seus 17 objetivos propõe: “Assegurar a disponibilidade e a gestão sustentável da água e saneamento para todos” (UN, 2018). Considerando a atual conjuntura e projetando até o ano de 2030, esses dados ainda estão longe dos ideais. O resultado da falta de investimento público em saneamento são os despejos clandestinos de esgoto sanitário bruto diretamente nos corpos d’água e solo.

Descargas de esgoto não tratado representam importantes fontes de nutrientes e matéria orgânica particulada em ambientes aquáticos e seus impactos não se limitam apenas a eutrofização. O esgoto sanitário é uma matriz complexa e sua composição varia de acordo com as atividades humanas realizadas em cada área urbana (FERNANDEZ-CASSI et al., 2018; KENNISH, 1991). De modo geral, além de matéria orgânica, nitrogênio, enxofre, grande quantidade de vírus, bactérias e protozoários patogênicos (ABESSA et al., 2005; DI PROFIO et al., 2019; FUMIAN et al., 2019), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), bifenilas policloradas (PCBs), hidrocarbonetos halogenados e metais traços (BOUTET; TANGUY; MORAGA, 2004; KENNISH, 2002; VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003; WASSMUR et al., 2010), o esgoto sanitário pode apresentar uma numerosa família de compostos naturais ou sintéticos usualmente referida como “contaminantes emergentes” (DE LA CRUZ et al., 2012; JIMÉNEZ-DÍAZ et al., 2015; MARTÍN-POZO et al., 2019). Este grupo compreende as drogas ilícitas, os fármacos (humanos e veterinários) e produtos de cuidado pessoal (PPCPs), pesticidas organoclorados (OCPs), dibenzofuranos policlorados (PCDFs), dibenzo-p-dioxinas (PCDDs), herbicidas, ftalatos, surfactantes e seus metabólitos, plastificantes, retardantes de chama, nanopartículas, produtos com capacidade de desregulação endócrina (EDCs), fragrâncias, dentre outras tantas substâncias e aditivos industriais (AZZOUZ; BALLESTEROS, 2016; BARRIOS-ESTRADA et al., 2018; BEIJER et al., 2017; CARMALIN; LIMA, 2018; DE LA CRUZ et al., 2012, 2013; DU et al., 2018; FEITOSA; SODRÉ; MALDANER, 2013; GAGNÉ et al., 2007; GIL et al., 2017; JIMÉNEZ-DÍAZ et al.,

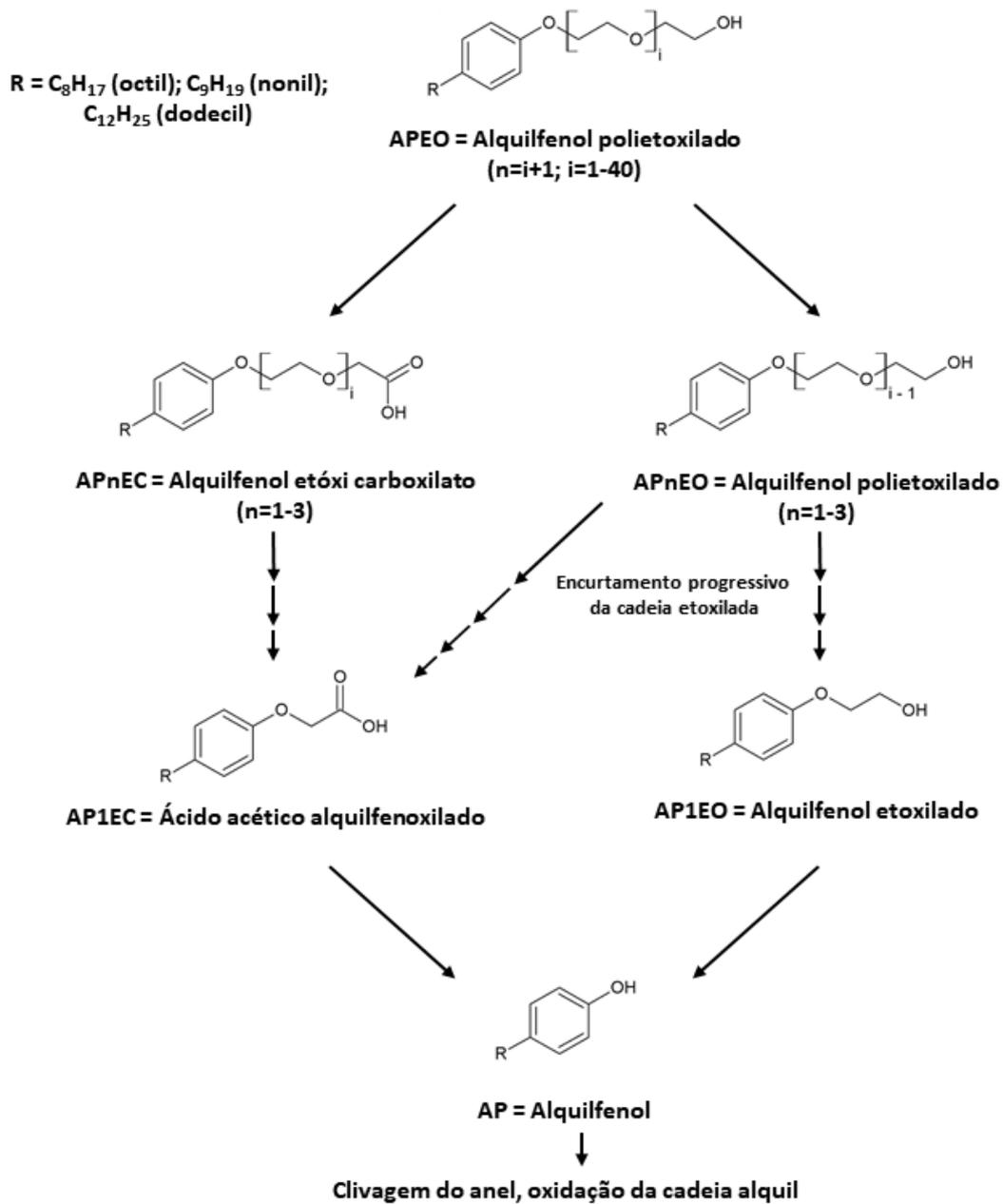
2015; KLAPER; WELCH, 2011; MANZETTI; VAN DER SPOEL, 2015; MARTÍN-POZO et al., 2019; MASUO; ISHIDO, 2011; NAIDU et al., 2016; PEREIRA et al., 2016; PESCI PEREIRA et al., 2018; PETROVIĆ; GONZALEZ; BARCELÓ, 2003; RUAN et al., 2019; SANCHEZ et al., 2011; VITA et al., 2018). Contaminantes emergentes podem ser definidos como uma nova classe de substâncias químicas que não estão sujeitas a nenhuma regulação vigente quanto aos limites de liberação ou *status* regulatório e cujos efeitos na saúde humana ou ao meio ambiente ainda não são suficientemente conhecidos (GIL et al., 2017; MARTÍN-POZO et al., 2019).

O esgoto bruto pode induzir mudanças significantes na qualidade da água afetando a saúde das comunidades marinhas e a cadeia trófica da biota aquática, potencialmente suprimindo a produção primária de fitoplâncton, macroalgas e plantas aquáticas submersas. Dentre os problemas causados pelo despejo de esgoto, além da liberação de poluentes orgânicos e químicos citados anteriormente, podem ser destacados a perda de habitat (AGUILAR-BETANCOURT et al., 2016; BONIN-FONT et al., 2018) e as contaminações microbiológicas diretas e indiretas, através do contato com a água ou consumo de alimentos oriundos destes locais, tais como peixes e moluscos (CRAVO et al., 2015).

Dentre os compostos químicos presentes no esgoto há uma classe de surfactantes não iônicos altamente tóxicos aos organismos aquáticos: os alquilfenóis etoxilados (APEOs) (NIMROD; BENSON, 1996). Os APEOs são amplamente utilizados na produção de detergentes, produtos plásticos para uso industrial e doméstico, lubrificantes, tintas, aditivos em praguicidas, processamento de metais e refino de petróleo (ACIR; GUENTHER, 2018; AHEL; GIGER; KOCH, 1994; BENNIE, 1999; METCALFE; HOOVER; SANG, 1996; MEUCCI; ARUKWE, 2006; PRIAC et al., 2014).

No ambiente ou nas estações de tratamento de esgoto, os APEOs podem passar por complexos processos de biodegradação nos quais diversos microrganismos metabolizam-nos pela sua cadeia etóxi, reduzindo-as formando cadeias menores, além de diversos outros produtos de degradação, incluindo alquilfenóis (AP) (nonilfenol e octilfenol) e outros metabólitos carboxilados intermediários (ACIR; GUENTHER, 2018). O processo de degradação dos APEOs está apresentado na **Figura 2**.

Figura 2. Proposta das rotas de degradação dos alquilfenóis etoxilados e formação dos metabólitos de APEO.

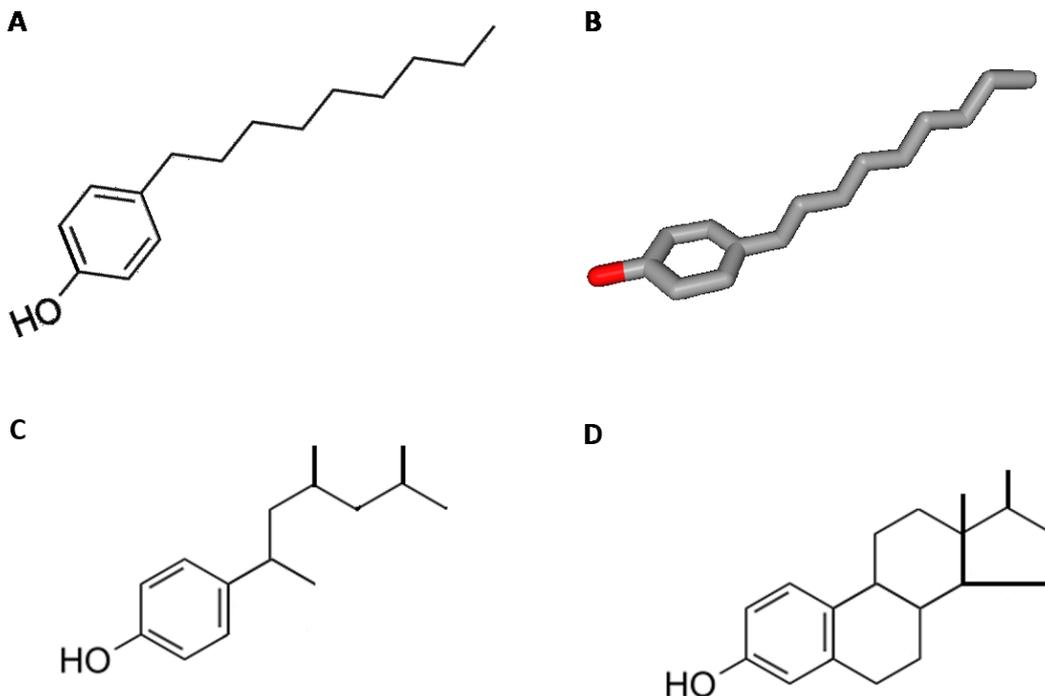


Fonte: Adaptado de Acir; Guenther (2018).

Há uma crescente preocupação quanto à presença dos APEOs no ambiente devido ao fato de seus metabólitos serem menos biodegradáveis, mais lipofílicos e tóxicos que seus precursores, além de exibirem propriedades estrogênicas mimetizando hormônios (ACIR; GUENTHER, 2018; AHEL; GIGER; KOCH, 1994; BENNIE, 1999; PRIAC et al., 2014;

WARHURST, 1995). O 4-n-Nonilfenol (NP) é um dos produtos de degradação dos APEOs e é bastante comum em ambientes aquáticos próximos aos locais de lançamento de esgoto sanitário (EKELUND et al., 1990). Na **Figura 3** podem ser observadas as estruturas químicas do NP, em **A**, a estrutura em 2D, em **B**, a estrutura em 3D, em **C**, a estrutura ramificada, e uma comparação da similaridade com o 17 β -estradiol em **D**.

Figura 3. Estrutura química do 4-n-Nonilfenol. **(A)** Estrutura em 2D, **(B)** Modelo da estrutura em 3D. Oxigênio em vermelho, **(C)** NP ramificado e **(D)** Estrutura do 17 β -estradiol.



Fonte: Adaptado de Ömeroğlu; Kara Murdoch; Dilek Sanin (2015) e do banco de dados PubChem (2018). 4-Nonylphenol, CID=1752.

Nesses locais, a concentração de NP encontrada varia desde baixas concentrações como < 15 ng/L, a casos mais extremos ultrapassando 600 μ g/L (PRIAC et al., 2014). O NP é apontado como o metabólito mais crítico dos APEOs devido a suas características como resistência à biodegradação, alta toxicidade, efeitos estrogênicos e bioacumulação em organismos aquáticos (log Kow = 4,48) (AHEL; GIGER; KOCH, 1994; BENNIE, 1999; MEUCCI; ARUKWE, 2006). É importante ressaltar que o estudo sistemático da toxicidade do NP é essencial não somente sob a perspectiva da proteção do meio ambiente e efeito na biota aquática, mas também para fornecer informações essenciais sobre os potenciais efeitos do NP à saúde humana (MAO et al., 2012).

1.2 BIOMARCADORES DE CONTAMINAÇÃO AQUÁTICA

Todas as avaliações de risco ecológico assumem que, para cada comunidade ou ecossistema, existe uma variedade de condições associadas ao seu funcionamento normal e sustentável (análogo à homeostase de um indivíduo), e que existe um risco quantificável de que a comunidade ou ecossistema se afaste das condições normais quando produtos químicos poluentes são adicionados ao meio (DEPLEDGE; FOSSI, 1994). A quantidade em número e variedade destes compostos continua aumentando e como consequência do consumo e estilo de vida globais, grande parte destes materiais potencialmente tóxicos entram no ambiente aquático (HERNÁNDEZ et al., 2019; LIVINGSTONE, 1993; VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

Mesmo que inúmeros métodos analíticos estejam disponíveis, coletar amostras suficientes em tempo hábil é um grande obstáculo na avaliação de danos ambientais. Medidas de rotina na coluna d'água não podem ser feitas quando as concentrações estão muito próximas ou abaixo do limite de detecção, não obstante, essas análises, quando possíveis, requerem equipamentos dispendiosos e analistas qualificados (LAM; GRAY, 2003). Monitorar os tipos e as quantidades de substâncias tóxicas que entram constantemente no ambiente, principalmente misturas complexas, é uma tarefa exaustiva e desafiadora. Ferramentas integrativas baseadas em efeito, como biomarcadores, são recomendadas para o monitoramento da qualidade ambiental, sendo particularmente úteis na relação entre a contaminação química e o status ambiental (HERNÁNDEZ et al., 2019).

A partir de meados da década de 80, diversos estudos desenvolveram, descreveram e recomendaram a análise de um grande número de biomarcadores para o monitoramento ambiental, visando à detecção precoce dos efeitos dos contaminantes nos organismos aquáticos (CAJARAVILLE et al., 2000; LIVINGSTONE, 1993; SANTANA et al., 2018; SEABRA PEREIRA et al., 2014; VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003; VIARENGO et al., 2007). Desta forma, os biomarcadores podem ser definidos como alterações celulares, bioquímicas, moleculares ou fisiológicas medidas em células, fluidos corporais, tecidos ou órgãos dentro de um organismo servindo como indicativos de exposição e/ou efeito de xenobióticos e outros compostos (LAM; GRAY, 2003; LIVINGSTONE, 1993; WALKER,

1995). Biomarcadores são capazes de fornecer avisos prévios dos efeitos da contaminação em menores níveis biológicos organizacionais, que podem tornar-se deletérios em níveis superiores de organização, como em populações e comunidade (CAJARAVILLE et al., 2000; VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

Os biomarcadores podem ser divididos em duas classes: biomarcadores de exposição e biomarcadores de efeito. Os biomarcadores de exposição indicam a exposição do organismo aos contaminantes, mas não são capazes de revelar os efeitos nocivos ocasionados. Os biomarcadores de efeito são aqueles que demonstram algum tipo de dano ou alteração no organismo (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003; WALKER, 1995). A presença de misturas complexas de xenobióticos no ambiente somados a outros fatores como, por exemplo, o estágio de vida, sexo e variabilidade abiótica natural, podem resultar em dificuldades de interpretação dos padrões de respostas dos biomarcadores (FONSECA et al., 2011a). Dessa forma, uma abordagem multibiomarcadores, que consiste no uso combinado de diferentes biomarcadores capazes de sinalizar a exposição aos contaminantes e quantificar seus efeitos na saúde dos organismos, permite uma avaliação mais abrangente e integrativa da qualidade ambiental. Além disso, minimiza a possibilidade de uma má interpretação em situações de poluição complexas, e fornecem um diagnóstico ecotoxicológico necessário para o gerenciamento ambiental (FONSECA et al., 2011a, 2011b; LINDE-ARIAS et al., 2008; VIEIRA et al., 2019).

Os efeitos biológicos dos poluentes ambientais são rotineiramente avaliados através de vários biomarcadores moleculares e bioquímicos e refletem a indução de sistemas específicos de biotransformação ou o início de várias alterações celulares (CAJARAVILLE et al., 2000; PEREIRA et al., 2011; REGOLI et al., 2011; VIARENGO et al., 2007). O uso de biomarcadores em espécies sentinelas facilitou a implementação dessa metodologia em vários programas de monitoramento ambiental em áreas de água doce, marinha e estuarina (SANNI et al., 2017a, 2017b).

Os biomarcadores bioquímicos de efeito ou exposição mais comumente utilizados em organismos aquáticos são as enzimas envolvidas na detoxificação de xenobióticos e seus metabólitos, como as enzimas de biotransformação de fase I, II e III, e as enzimas antioxidantes (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). A metabolização e biotransformação de xenobióticos ocorrem em etapas. Inicialmente os xenobióticos passam por um processo de exposição ou adição de algum grupo funcional reativo através de reações como oxidação, redução ou hidrólise (KLOTZ; STEINBRENNER, 2017), sendo que as principais enzimas que

catalisam esse processo de fase I são enzimas citocromo P450 monooxigenase (CYP), flavinas monooxigenase (FMO) e NADPH-quinona oxidoreductase (NQO) ou DT diáforases (SCHLENK et al., 2008). O sistema enzimático mais dominante nos processos de oxidação da biotransformação de fase I são os CYPs. Os CYPs constituem uma superfamília de hemoproteínas que catalisam as reações de oxidação e redução biológica SCHLENK et al., 2008). Na fase II de biotransformação, ocorre a conjugação do xenobiótico parental, ou mais comumente, o seu metabólito, a um ligante endógeno (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Os principais compostos endógenos utilizados na conjugação são as glutationas em reações catalisadas pelas enzimas glutatona *S*-transferases (GSTs), o ácido glicurônico, através das uridina difosfato glicuronosil transferases (UGTs) e os sulfonatos, catalisados pelas sulfotransferase (SULTs) (REGOLI et al., 2011; SCHLENK et al., 2008). Por fim, as enzimas de fase III, como as peptidases, hidrolases e β -liase, catalisam o catabolismo dos metabolitos conjugados para formar produtos mais facilmente excretáveis (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

Além das enzimas de biotransformação, as enzimas do sistema de defesa antioxidante mais comumente utilizadas são: as superóxido dismutases (SODs), catalases (CATs), glutatona peroxidase (GPx), glutatona redutase (GR), entre outras (LIVINGSTONE, 2001; REGOLI et al., 2011; VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). SOD, CAT e GPx são criticamente importantes na detoxificação de radicais e moléculas não-reativas (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

Dentre os biomarcadores moleculares, as avaliações mais utilizadas são as técnicas genômicas, como o sequenciamento do genoma e do transcriptoma dos organismos, porém a técnica mais empregada, é a análise da transcrição gênica por PCR quantitativo em tempo real (qPCR). As respostas moleculares são geralmente consideradas efeitos similares paralelos a níveis funcionais, e as variações nos níveis de mRNA são frequentemente discutidos em termos de regulação (aumento ou diminuição) gênica de complexos bioquímicos ou mesmo vias metabólicas (REGOLI et al., 2011).

1.3 ECOTOXICOGENÔMICA

A toxicogenômica é resultado da junção das disciplinas de genômica e toxicologia, e auxilia na elucidação dos mecanismos envolvidos na resposta aos xenobióticos e na padronização de assinaturas metabólicas que possam diferenciar os distintos tipos de agentes estressores. Originalmente, a toxicogenômica foi concebida para ser utilizada na avaliação dos riscos dos xenobióticos aos humanos, mas o recente e contínuo aumento da informação genômica nos bancos de dados acerca das mais variadas espécies permitiu que esse campo fosse estendido a outros organismos. A ecotoxicogenômica pode ser definida como a aplicação da toxicogenômica a organismos que são representativos do ecossistema e utilizados no estudo dos efeitos nocivos dos compostos químicos no ecossistema e nos indivíduos (IGUCHI; WATANABE; KATSU, 2007; MIRACLE; ANKLEY, 2005; SNAPE et al., 2004). Paralelamente à utilização de biomarcadores bioquímicos, técnicas disponibilizadas pela ecotoxicogenômica estão sendo padronizadas e aplicadas em estudos ecotoxicológicos (CHAPMAN et al., 2011). A ecotoxicogenômica visa determinar as respostas transcricionais de um organismo após a exposição a uma substância tóxica, gerando informações sobre o mecanismo de ação dos xenobióticos e seus possíveis efeitos nos organismos (WILLIAMS; MIRBAHAI; CHIPMAN, 2014).

Diversos estudos foram desenvolvidos com a técnica de *microarray* (ASKER et al., 2013; CHAPMAN et al., 2011; IGUCHI; WATANABE; KATSU, 2007; MARTYNIUK; HOULAHAN, 2013; ROBERTSON; MCCORMICK, 2012; RUGGERI et al., 2008; SHELLEY et al., 2012; WILLIAMS et al., 2003). Essa técnica permite aferir a expressão de uma grande quantidade de genes simultaneamente e, uma vez que os efeitos dos xenobióticos podem envolver alterações em diversas vias metabólicas, o *microarray* permitiu um avanço considerável em relação ao PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR), que permite avaliar apenas poucos genes. Uma desvantagem crucial das técnicas de *microarray* e qPCR é a necessidade de se conhecer previamente a sequência nucleotídica dos genes de interesse para avaliar as alterações na transcrição gênica (FENT; SUMPTER, 2011). Essas informações geralmente eram obtidas por meio das técnicas de hibridação subtrativa supressiva (DIATCHENKO et al., 1996) e das bibliotecas de EST (*expressed sequence tags*) obtidas por sequenciamento Sanger (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977), ou disponíveis em bancos de dados. Ou seja, a aplicação das técnicas de *microarray* e qPCR é limitada pela informação

a priori disponível sobre os genes da espécie (FENT; SUMPTER, 2011; MEHINTO et al., 2012).

Ao longo dos últimos anos, o tradicional método de sequenciamento Sanger (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977) foi parcialmente substituído por tecnologias de sequenciamento de próxima geração (*next-generation sequencing* ou NGS). O surgimento das plataformas de NGS possibilitou um aumento expressivo na capacidade de gerar sequências, proporcionando uma alta relação custo-benefício (MOROZOVA; MARRA, 2008). Esse novo paradigma possibilitou uma mudança na escala e no escopo dos projetos de sequenciamento, em consequência de um menor tempo de execução e custo por análise e maior volume de dados produzidos por experimento, permitindo um sequenciamento rápido e de alta resolução (MARTIN et al., 2013).

Além das aplicações genômicas, as plataformas de NGS também revolucionaram a transcriptômica através do sequenciamento paralelo massivo de RNA (RNA-Seq). Nesta abordagem, o objetivo é descrever todos os genes que são transcritos em determinado tecido, estágio de vida ou no organismo como um todo (EKBLUM; GALINDO, 2011). Até o surgimento das metodologias de NGS, a presença de RNA mensageiro (RNAm) era mensurada inicialmente por técnicas de sequenciamento Sanger e ESTs, sendo em seguida mais comumente utilizadas técnicas de *microarray* ou qPCR. O primeiro método não possui grande sensibilidade, e apresenta limitações quanto às quantidades de RNA iniciais, quantificação dos níveis de transcritos e a necessidade de informação prévia sobre as sequências, enquanto o segundo é de relativo alto custo inviabilizando uma análise global da transcrição gênica (MARDIS, 2008). Em contraste, as metodologias de NGS oferecem a análise em larga escala de perfis de expressão gênica, anotação genômica ou identificação/descoberta de RNA não-codificante (MUTZ et al., 2013). A metodologia de RNA-Seq está se tornando altamente atrativa para estudos em espécies não-modelo, onde geralmente existe pouca ou nenhuma informação genômica disponível (HORNETT; WHEAT, 2012).

Se por um lado o surgimento das plataformas de NGS possibilitou aumentos expressivos na geração de sequências, proporcionando uma favorável relação custo-benefício quando comparados com o método Sanger, por outro lado, existe a perda em relação ao tamanho das sequências geradas (*reads*) em algumas das principais plataformas (MOROZOVA; MARRA, 2008), proporcionando novos desafios para as análises de bioinformática. O principal

obstáculo é a reconstrução ou montagem dos *short reads* em sequências que representem os transcritos originais. Dependendo da existência ou não de um genoma que sirva de referência, as estratégias atuais de montagem de transcriptoma dividem-se em três categorias principais: montagem baseada em referência, montagem *de novo*, e uma estratégia híbrida combinando as duas últimas (MARTIN; WANG, 2011). A estratégia de montagem *de novo* não utiliza um genoma referência, ao invés disso, são identificadas sobreposições entre as sequências curtas, de tamanho definido a partir dos *reads* (*k-mers*), resultando na reconstrução do transcrito original (GRABHERR et al., 2011; MARTIN; WANG, 2011).

Muitos estudos que caracterizam transcriptomas são descritivos e proporcionam recursos valiosos para estudos posteriores. Porém, a metodologia de RNA-Seq também pode ser utilizada na caracterização de perfis de expressão gênica, sendo que o objetivo não é somente identificar quais genes são transcritos, mas também o nível específico (absoluto ou relativo) da transcrição dos genes encontrados (EKBLÖM; GALINDO, 2011). Em síntese, o processo de análise de expressão gênica diferencial por RNA-Seq inicia-se com os *reads* gerados pelo sequenciamento sendo alinhados a um genoma ou transcriptoma referência. Nos organismos que não possuem tais referências, uma montagem *de novo* pode solucionar o problema oferecendo um conjunto inicial de transcritos (MARTIN; WANG, 2011). A quantidade de *reads* mapeados é contada e o nível de expressão gênica calculado por algoritmos especializados, e então testes estatísticos apropriados são aplicados buscando a inferência de expressão gênica diferencial (MUTZ et al., 2013).

Até o início da década a técnica de RNA-Seq encontrava-se subutilizada em pesquisas relacionadas à biologia e ecotoxicologia de peixes (MEHINTO et al., 2012). Contudo, a análise da transcrição gênica global através da técnica de RNA-Seq possibilitou avanços significativos nessa área (CAI et al., 2018; RENAUD et al., 2019; YEBRA-PIMENTEL et al., 2019), permitindo a descoberta de novos biomarcadores e a caracterização de vias metabólicas alteradas pela exposição a xenobióticos (BRINKMANN et al., 2016; FENT; SUMPTER, 2011; HAHN et al., 2016; KONG et al., 2015; MEHINTO et al., 2012).

1.4 PEIXES COMO ORGANISMOS SENTINELA DE CONTAMINAÇÃO

Várias espécies de peixes têm sido utilizadas para avaliar parâmetros biológicos e bioquímicos em resposta a contaminantes ambientais. Peixes são encontrados virtualmente em qualquer ambiente aquático exercendo um importante papel ecológico nesse ecossistema (VAN

DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Devido à sensibilidade aos impactos antropogênicos, peixes usualmente são utilizados como espécies sentinelas no ambiente aquático (BURGOS-ACEVES et al., 2018).

O uso de peixes em estudos toxicológicos foi revisado por Hinton e colaboradores (2009) que apontaram duas principais vertentes: (1) peixes como alvo em estudos ambientais utilizando biomarcadores de contaminação; e (2) peixes como modelo para estudos mecanísticos em toxicologia e doenças humanas. A primeira vertente vem sendo abordada pela ecotoxicologia aquática para a análise de risco de substâncias tóxicas liberadas no ambiente (HINTON et al., 2009). A segunda vertente é mais recente, e utiliza peixes como um “modelo” para compreensão de mecanismos gerais de toxicidade no grupo dos vertebrados. Portanto, o conhecimento gerado por esses estudos em peixes também são aplicáveis para compreensão dos efeitos de contaminantes ambientais e outras substâncias para aplicações nos campos da medicina, aquicultura, ecologia, dentre outros (BURNETT et al., 2007; DI BELLO et al., 2007; FREIRE et al., 2009; PETITJEAN et al., 2019).

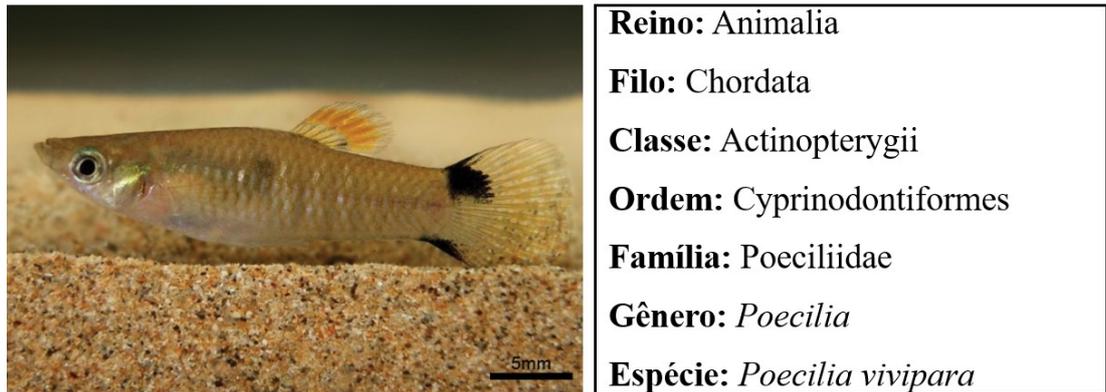
O peixe teleósteo *Fundulus heteroclitus*, conhecido popularmente como *killifish*, é um exemplo de peixe que tem sido amplamente utilizado como organismo modelo em estudos ambientais no hemisfério Norte-Americano por ser uma das espécies mais abundantes em regiões estuarinas da Costa Atlântica nesta região (BURNETT et al., 2007; MATSON et al., 2008; STEGEMAN, 1978). O fato do *killifish* sobreviver às condições agudas de contaminação química por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) (WILLS et al., 2009) e bifenilas policlorados (PCBs) (NASCI et al., 1991) em certas regiões costeiras, tornou a espécie um modelo para estudos ambientais e de adaptação à contaminação (BURNETT et al., 2007).

As características de *F. heteroclitus*, como pequeno tamanho, desenvolvimento rápido, tolerância para condições diversas e resistência para sobreviver em locais com altos níveis de contaminação, classificam essa espécie como organismos-alvo para estudos deste tipo. O *killifish* também é frequentemente utilizado em estudos toxicológicos, incluindo estudos de toxicologia no desenvolvimento embrionário e de carcinogênese, e principalmente em estudos para compreensão de mecanismos moleculares de resistência para sobreviver em locais altamente poluídos (BURNETT et al., 2007).

Na região costeira da América do Sul, uma das espécies que possui características etológicas semelhantes ao *F. heteroclitus*, são os guarus, especialmente da espécie *Poecilia*

vivipara (Bloch & Schneider, 1801). Os espécimes de *P. vivipara*, também conhecidos popularmente como barrigudinhos, são peixes da família *Poeciliidae* caracterizados por possuírem corpo alongado e comprimido posteriormente, sendo o macho menor que a fêmea (MENDONÇA; ANDREATA, 2001) (**Figura 4**).

Figura 4. Peixe barrigudinho macho e descrição da filogenia de *Poecilia vivipara*.



Fonte: Adaptado de Berbel-Filho et al., (2018).

Dentro do gênero *Poecilia*, aproximadamente 150 espécies estão descritas, das quais apenas uma não é vivipara, representando uma linhagem distinta (MEREDITH et al., 2010; THIBAUT; SCHULTZ, 1978). Os peixes *P. vivipara* são capazes de se adaptar a condições ambientais extremas, com alta tolerância à salinidade e temperatura da água, possui populações não migratórias e está amplamente distribuída em ambientes lânticos salinos na América do Sul, Costa Atlântica (FROESE; PAULY, 2018), representando um modelo potencial para estudos ambientais (BIZERRIL; PRIMO, 2001; BOLASINA; DE AZEVEDO; PETRY, 2017; GOMES; MONTEIRO, 2007), além de considerado um organismo-modelo para estudos de biologia reprodutiva e desenvolvimento (PARENTI; RAUCHEMBERGER, 1989).

A espécie *P. vivipara* foi utilizada em diversos trabalhos de toxicologia aquática. Entre esses estudos destacam-se: a avaliação da alteração no nível de transcritos de genes e/ou biomarcadores de contaminação aquática em peixes expostos ao cobre (ANNI et al., 2019a, 2019b; DA SILVA et al., 2014; MACHADO et al., 2013; ZEBRAL et al., 2019a, 2019b; ZIMMER et al., 2012), a contaminantes orgânicos (FERREIRA et al., 2012) ao Roundup® (HARAYASHIKI et al., 2013), ao fenantreno (MACHADO et al., 2014), ao triclosan (ESCARRONE et al., 2016), à fração acomodada do óleo diesel em água (MATTOS et al., 2010), anestésicos (BOLASINA; DE AZEVEDO; PETRY, 2017) e toxinas (LOPES et al.,

2017). Adicionalmente, há estudos avaliando a alteração do comportamento em peixes expostos ao fenantreno (TORREIRO-MELO et al., 2015), a modulação gênica dos *citocromos P450 família 1A, 1B e 1C (CYP1A, CYP1B e CYP1C)* por 3-metilcolantreno e a contaminação ambiental na área urbana de Florianópolis com o uso de biomarcadores moleculares (DORRINGTON et al., 2012).

Tendo em vista o grande potencial que a espécie *P. vivipara* tem como um organismo modelo para estudos ecotoxicológicos (ADAM et al., 2010; DA SILVA et al., 2014; DORRINGTON et al., 2012; ESCARRONE et al., 2016; FERREIRA et al., 2012; HARAYASHIKI et al., 2013; LOPES et al., 2017; MACHADO et al., 2013, 2014; MATTOS et al., 2010; PIAZZA, 2012; TORREIRO-MELO et al., 2015; ZIMMER et al., 2012), e como organismo sentinela ao longo de toda a costa brasileira, bem como a facilidade de obtenção de exemplares em campo e fácil manejo em laboratório, no presente estudo buscou-se ampliar o conhecimento sobre as sequências gênicas dessa espécie a fim de expandir as possibilidades de pesquisas científicas futuras nos mais diversos campos de conhecimento da biologia. Essa busca por uma montagem e anotação de um transcriptoma com viés ecotoxicológico não apenas aumenta o conhecimento sobre a fisiologia da espécie, mas também proporciona o estabelecimento de novos alvos como biomarcadores de contaminação ambiental.

Ressalta-se ainda a importância de estudar não só as sequências obtidas do transcriptoma, mas também seus efeitos na transcrição dos organismos expostos a contaminantes bem como as atividades enzimáticas do sistema de biotransformação e antioxidantes, relacionando os efeitos nos diferentes sexos. Dessa forma, no presente estudo, além da montagem do transcriptoma hepático da espécie *P. vivipara*, também foram avaliados os níveis de transcritos em fígado e gônadas de peixes expostos ao esgoto sanitário e ao 4-n-Nonilfenol. Por fim, foram analisadas as atividades das enzimas dos sistemas de biotransformação e antioxidantes em fígados e brânquias dos peixes expostos ao esgoto, em ambos os sexos, sedimentando cada vez mais a espécie como um organismo modelo.

1.5 OBJETIVOS E CONSIDERAÇÕES SOBRE A ESTRUTURA DO TEXTO

1.5.1 Objetivo Geral

Caracterizar o transcriptoma hepático e avaliar as alterações bioquímicas e transcricionais nas vias de biotransformação, antioxidantes e relacionadas à desregulação endócrina, de peixes *Poecilia vivipara* expostos ao esgoto sanitário e ao 4-n-nonilfenol.

1.5.2 Objetivos Específicos

- 1- Produzir o primeiro transcriptoma, via RNA-Seq, do fígado do peixe *P. vivipara*;
- 2- Avaliar os níveis de transcritos hepáticos em genes envolvidos nas vias de biotransformação, antioxidantes e relacionadas à desregulação endócrina de *P. vivipara* expostos ao esgoto sanitário;
- 3- Avaliar a atividade de enzimas pertencentes ao sistema de biotransformação de fase I e II, e sistema antioxidante em fígados e brânquias de peixes *P. vivipara* expostos ao esgoto sanitário;
- 4- Quantificar a bioacumulação de contaminantes orgânicos HPAs, PCBs e LABs em tecido de *P. vivipara* expostos ao esgoto sanitário;
- 5- Avaliar os níveis de transcritos hepáticos e gonadais em genes envolvidos nas vias de biotransformação, antioxidantes e relacionadas à desregulação endócrina de *P. vivipara* expostos ao 4-n-nonilfenol.

1.5.3 Considerações sobre a estrutura do texto

O presente documento está organizado em três capítulos. No capítulo I, que finaliza nessa seção, uma introdução geral apresentou uma revisão sobre os principais temas abordados nessa tese de doutorado. O capítulo II apresenta os resultados obtidos da montagem e anotação do transcriptoma hepático de *P. vivipara* através de duas metodologias de sequenciamento. Na

primeira, via Ion Proton, os resultados encontram-se publicados na revista científica *Ecotoxicology and Environmental Safety* (PIAZZA et al., 2019). Na segunda, o transcriptoma hepático obtido via Illumina MiSeq, juntamente com as análises dos níveis de transcritos e atividades enzimáticas dos peixes expostos ao esgoto sanitário, foram preparados e submetidos à publicação na revista *Aquatic Toxicology*.

No terceiro capítulo (III) estão apresentados os resultados das análises dos níveis de transcritos envolvidos com o sistema de biotransformação, atividades antioxidantes e desregulação endócrina em fígado e gônadas de peixes machos e fêmeas expostos ao 4-n-nonilfenol.

2 CAPÍTULO II: ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS E MOLECULARES EM PEIXES

Poecilia vivipara (Bloch e Schneider, 1801) **EXPOSTOS AO ESGOTO SANITÁRIO**

3 INTRODUÇÃO

Várias perturbações ocasionadas pelo homem vêm afetando o ambiente aquático, contribuindo para alteração do habitat e mudando a estrutura e dinâmica das comunidades bióticas. Problemas ambientais encontrados nestes sistemas invariavelmente resultam do crescimento exponencial humano e desenvolvimento descontrolado das bacias hidrográficas costeiras, bem como as atividades antrópicas nas próprias enseadas (BONIN-FONT et al., 2018; KENNISH, 2002; MONTESDEOCA-ESPONDA et al., 2019). Como consequência de uma superpopulação, houve o aumento das indústrias e uso de milhares de produtos químicos que por sua vez, apresentam efeitos diretos e indiretos no ambiente aquático. Estas substâncias alcançam o ambiente natural geralmente via descargas de efluentes, tais como esgotos, despejos de barcos, rios, deposição atmosférica e fontes não específicas de escoamento urbano (ADAM et al., 2010; AZZURRO et al., 2010; DE LOS RÍOS et al., 2012; MONTESDEOCA-ESPONDA et al., 2019).

Devido à vasta natureza dos químicos despejados no ambiente com efeitos variados e complexos, sendo alguns de mecanismos de toxicidade antagônicos, a resposta integrada em peixes expostos é praticamente imprevisível e deve ser testada (SOLÉ et al., 2003). Logo, há a necessidade de determinar o status ambiental, a fim de fornecer uma indicação das mudanças induzidas por atividades antropogênicas e sua influência nos organismos aquáticos (SEDEÑO-DÍAZ; LÓPEZ-LÓPEZ, 2012).

Os estressores ambientais raramente atuam como compostos individuais. A pressão antropogênica geralmente resulta na introdução de uma mistura de compostos químicos e seus efeitos no ambiente devem ser considerados como o resultado da interação destes químicos ao invés de substâncias isoladas (TARNAWSKA et al., 2019). Sendo o esgoto sanitário considerado uma matriz de alta complexidade (DAUGHTON, 2018) e com riscos potenciais, a sua introdução no ambiente é considerada um dos maiores problemas de poluição a nível mundial (MAHMOUD et al., 2016; MDEGELA et al., 2010). Dentre seus impactos à saúde humana e vida selvagem podem ser citados a contaminação microbiológica (CRAVO et al., 2015; MAHMOUD et al., 2016), aumento do risco de contração de doenças infecciosas (BONIN-FONT et al., 2018), inclusive com a possibilidade de contaminação por bactérias

selecionadas no ambiente para tolerância e resistência a biocidas e antibióticos (ÖSTMAN et al., 2017).

Além da grande quantidade de matéria orgânica, diversos tipos de contaminantes persistentes ou não persistentes, PPCPs, surfactantes, plastificantes, HPAs, PCBs, metais traço, entre outros, são continuamente introduzidos no ambiente aquático (AGUILAR-BETANCOURT et al., 2016; BONOMO et al., 2016; GWOREK et al., 2019; MEDEIROS et al., 2008; PETROVIĆ; GONZALEZ; BARCELÓ, 2003; RIZZI; TANIGUCHI; MARTINS, 2017). Para diminuir a poluição ambiental e os riscos de disseminação de doenças epidêmicas, o esgoto deveria ser tratado antes de o efluente ser liberado no ambiente. Entretanto, sabe-se que os métodos tradicionais de tratamento de esgoto não são seguros e eficazes o suficiente para garantir que o efluente reintroduzido seja livre de xenobióticos e seus metabólitos (DU et al., 2018).

Nas últimas décadas, houve um aumento na quantidade de trabalhos na literatura acerca da ocorrência ambiental, destino, efeitos, e avaliação de risco destes compostos (BEIJER et al., 2017; BOEHM et al., 2016; BOIX et al., 2016; GRUNG et al., 2016; HUERTA et al., 2018; LV et al., 2019). O monitoramento qualitativo do ambiente é essencial para o desenvolvimento do manejo sustentável dos recursos naturais, e para a redução dos riscos relacionados aos múltiplos estressores antropogênicos (MONTESDEOCA-ESPONDA et al., 2019). Desta forma, o monitoramento biológico é cada vez mais importante na investigação do estado de qualidade do ecossistema, sendo aplicado sem modificar as condições naturais do ambiente e com o objetivo de relatar a ocorrência de um composto químico ou estressor com um impacto ecológico em organismos vivos. O biomonitoramento é baseado no uso de bioindicadores, que são organismos particularmente representativos em determinado habitat e que podem acumular poluentes. A exposição e a interação entre bioindicadores e contaminantes ambientais causam modificações fisiológicas, chamadas biomarcadores, que podem ser analisados e quantificados em diferentes níveis biológicos (REBOA et al., 2019; VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003; WALKER, 1995), portanto, é possível utilizar esse método com o objetivo de associar o estado de saúde comprometido de um bioindicador ao grau de poluição do ambiente que eles representam (REBOA et al., 2019).

Peixes são bons bioindicadores da poluição aquática pela capacidade de captar os poluentes presentes na água através das suas brânquias, bem como pela ingestão de organismos forrageiros contaminados (HUERTA et al., 2018), além de integrarem os efeitos das misturas químicas as quais estão continuamente expostos, servindo como sentinelas para avaliação dos

impactos dos contaminantes no ambiente aquático (HAHN et al., 2016). Organismos utilizados como sentinelas têm inúmeras vantagens sobre as análises químicas dos compartimentos abióticos por bioacumular apenas as formas de contaminantes biodisponíveis na água (AGUILAR-BETANCOURT et al., 2016).

Os biomarcadores moleculares de exposição química em peixes têm sido utilizados efetivamente há muitos anos. A recente disponibilidade de extensas informações de sequência em peixes, no entanto, facilitou a aplicação de abordagens moleculares mais abrangentes (incluindo todo o genoma) à toxicologia de peixes (TYLER et al., 2008). Infelizmente, grande parte da informação genética disponível para espécies de peixes é proveniente de organismos modelo, como o *fathead minnow* *Pimephales promelas*, o peixe zebra *Danio rerio*, e a medaka *Oryzias latipes*. Embora essas informações tenham contribuído bastante para o entendimento de mecanismos moleculares, faltam informações semelhantes para espécies de peixes selvagens comumente usadas em estudos ambientais (HAHN et al., 2016). Desta forma, o uso de plataformas NGS para o sequenciamento e montagem *de novo* de transcriptomas tem sido repetidamente demonstradas adequadas para a descoberta de genes e marcadores, análises comparativas, análises de expressão gênica, SNPs e localizações precisas dos limites de transcrição (BRINKMANN et al., 2016; EKBLÖM; GALINDO, 2011; FOX et al., 2014; HAHN et al., 2016; KONG et al., 2015; MACHADO et al., 2018, 2019; QU et al., 2018).

Nesse estudo buscou-se a montagem do transcriptoma hepático de peixes da espécie *P. vivipara*, expostos ao esgoto sanitário através da técnica de RNA-Seq nas plataformas Ion Proton e Illumina MiSeq, visando a identificação de biomarcadores moleculares, sensíveis e eficientes para o biomonitoramento ambiental. Ainda nos biomarcadores moleculares, foram avaliadas a transcrição diferencial em genes pertencentes aos sistemas de biotransformação, defesa antioxidante e transportadores do tipo ABC, além de receptores nucleares e de xenobióticos identificados na montagem do transcriptoma.

Conjuntamente com os biomarcadores moleculares, biomarcadores bioquímicos foram avaliados em fígado, brânquias e cérebro para verificar os efeitos biológicos do esgoto sanitário nos peixes expostos.

4 OBJETIVOS

- 1- Realizar a montagem *de novo* do transcriptoma hepático do peixe *P. vivipara*, via Ion Proton;
- 2- Obter o transcriptoma montado *de novo* dos fígados de peixe *P. vivipara*, via Illumina MiSeq;
- 3- Identificar transcritos de genes envolvidos em processos de biotransformação de xenobióticos e transcritos utilizados tradicionalmente como biomarcadores, através de anotação a partir de diversos bancos de dados públicos;
- 4- Avaliar os níveis de transcritos hepáticos dos genes: *Proteína associada a multirresistência 1 (ABCC1)*, *Receptor para aril hidrocarboneto (AhR)*, *Citocromo P450 família 1A (CYP1A)*, *Citocromo P450 família 2K1 (CYP2K1)*, *Citocromo P450 família 3A30 (CYP3A30)*, *Receptor de estrogênio alfa (ER)*, *Glutaciona S-Transferase A3 (GSTa3)*, *Glutaciona S-Transferase Mu 3 (GSTMu)*, *Resistência a múltiplas drogas (MDR1)*, *Proteína associada a multirrestência 2 (MRP2)*, *NADPH-quinona oxidoreductase-1 (NQO1)*, *Receptor pregnano X (PXR)*, *Superóxido dismutase (SOD)*, *Fator de transcrição SOX9 (SOX9)*, *Sulfotransferase 1C1 (ST1C1)*, *Uridina difosfato glicuronosiltransferase 1A1 (UGT1A1)*, *Vitelogenina-1 (VIT)* e *Zona pelúcida glicoproteína 4 (ZP4)* em peixes machos e fêmeas da espécie *P. vivipara* expostos ao esgoto sanitário 33 % por 24 h e 96 h;
- 5- Avaliar a atividade de enzimas pertencentes ao sistema de biotransformação de fase I e II e sistema antioxidante em fígados e brânquias de peixes *P. vivipara* de ambos os sexos expostos ao esgoto sanitário após 24 h e 96 h;
- 6- Quantificar a atividade de enzimas acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BUChE) em cérebros de peixes *P. vivipara* machos e fêmeas expostos ao esgoto sanitário após 24 h e 96 h;

- 7- Quantificar contaminantes orgânicos como HPAs, HAs, PCBs, DDTs e LABs bioacumulados nos peixes controle e expostos ao esgoto sanitário 33 % por 24 h e 96 h;
- 8- Avaliar as propriedades químicas e biológicas do esgoto sanitário bruto, esgoto sanitário 33 % e água marinha a salinidade de 24.

5 METODOLOGIA

5.1 COLETA E ACLIMATAÇÃO DOS ANIMAIS

Exemplares adultos de *P. vivipara*, provenientes do entorno dos tanques de cultivo de peixes do Laboratório de Piscicultura Marinha (LAPMAR) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), situado na Barra da Lagoa, Florianópolis, Santa Catarina, foram coletados utilizando armadilhas de captura (**Minnowtrap™**) com ração para peixes como atrativo. As armadilhas foram montadas em locais onde foi observada uma maior atividade dos cardumes de barrigudinhos. Os aparatos foram mantidos com 75 % da área submersa junto a estruturas do ambiente como galhos e pedras. A cada 15 minutos as armadilhas foram revisadas para identificar a presença de peixes capturados. Os exemplares de *P. vivipara* capturados foram transferidos para um tanque de transporte com aeração constante enquanto os animais de outras espécies identificadas foram libertados.

Ao final da coleta, os animais foram transportados até o Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica (LABCAI) onde foram aclimatados por no mínimo 30 dias em água do mar filtrada (0,45 µm) a temperatura de 21 °C e salinidade 24, com aeração constante, alimentação *ad libitum* e fotoperíodo de 12/12 horas (claro/escuro). Os procedimentos de captura, manutenção e exposição dos peixes foram previamente autorizados pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade ICMBio/SISBIO nº 56408-1 e pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina CEUA-UFSC nº 4613161116.

5.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL 1

Visando a montagem do transcriptoma hepático de *P. vivipara* amostras provenientes de um estudo anterior (PIAZZA, 2012) foram utilizadas para a obtenção das sequências de RNA. Neste experimento, os animais foram coletados e aclimatados conforme descrito no item 5.1.

Após a aclimação, os peixes (n = 50, 1:1 machos:fêmeas) foram expostos ao esgoto sanitário não tratado proveniente da estação de tratamento de esgotos da Companhia Catarinense de Águas e Saneamento de Florianópolis (ETA/CASAN) em concentração definida de 33 % (v/v) durante um período de 24h, de acordo com Medeiros e colaboradores (2008). A concentração de 33 % (v/v) consistiu na diluição de esgoto sanitário bruto e água marinha

filtrada, garantindo a salinidade de 24 ao efluente. Paralelamente um grupo controle foi exposto por 24 horas à água do mar filtrada (0,45 µm) e salinidade de 24 (n = 50, 1:1 machos:fêmeas).

Após as 24 horas de exposição, os animais foram eutanasiados, seus fígados coletados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido em *pools* de 3 fígados por tubo (n = 15) para a realização de análises moleculares. As carcaças dos animais foram separadas e congeladas para análise de contaminantes orgânicos.

5.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL 2

Após a aclimação, os peixes (n = 72, 1:1 machos:fêmeas) foram expostos ao esgoto sanitário não tratado proveniente da estação de tratamento de esgotos ETA/CASAN de Florianópolis em concentração definida de acordo com Medeiros e colaboradores (2008) e semelhante ao delineamento experimental 1, na proporção 33 % (v/v), durante 24 e 96 horas. Paralelamente um grupo controle foi exposto por 24 e 96 horas à água do mar filtrada (0,45 µm) e salinidade de 24 (n = 72, 1:1 machos:fêmeas). O experimento foi realizado em triplicata experimental.

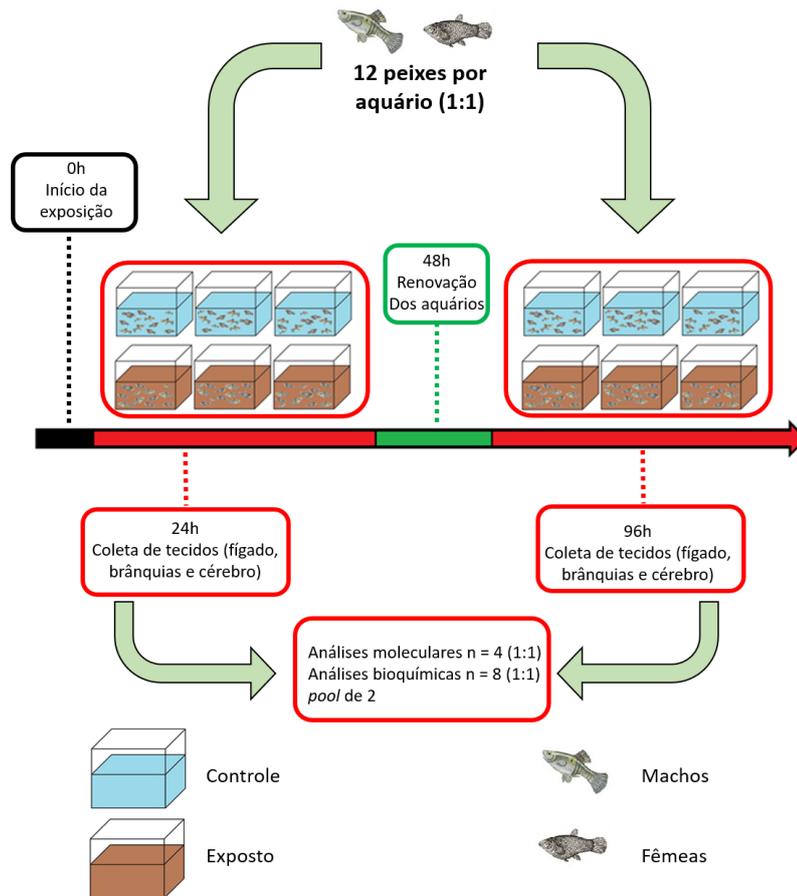
Para as análises moleculares, após 24 h de exposição, quatro animais de cada aquário do grupo controle (n = 12, 6 machos e 6 fêmeas) e quatro animais do grupo exposto (n = 12, 6 machos e 6 fêmeas) foram eutanasiados para coleta de fígado, cérebro e brânquias em tubos individuais que foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido. Para as análises bioquímicas, amostras de fígado, brânquias e cérebro foram agrupadas em *pools* de 2 por tubo para o grupo controle (n = 12, 6 *pools* de machos e 6 *pools* de fêmeas) e para o grupo exposto (n = 12, 6 *pools* de machos e 6 *pools* de fêmeas). Todas as carcaças dos animais foram coletadas e congeladas para análises de contaminantes orgânicos.

Após 48 h de exposição todos os aquários foram renovados substituindo o conteúdo por nova mistura de esgoto 33 % no caso dos aquários do grupo exposto e água do mar filtrada nos aquários do grupo controle.

Ao final de 96 horas de exposição, os animais foram eutanasiados e as coletas de tecidos para análises bioquímicas e moleculares foram similares ao processo descrito para 24 horas. As carcaças também foram separadas e congeladas como relatado no procedimento de coleta de 24 horas (**Figura 5**).

Duas amostras de fígado do grupo controle (um macho e uma fêmea) e do grupo exposto (um macho e uma fêmea), ambos após 24 horas de exposição, foram utilizados para o sequenciamento *paired end* de RNA na plataforma MiSeq para obtenção de um transcriptoma hepático.

Figura 5. Representação esquemática do delineamento experimental 2. Exposição de peixes *P.vivipara* ao esgoto sanitário 33 % (v/v) por 96 horas.



Fonte: Acervo do Autor.

5.4 ANÁLISES QUÍMICAS

5.4.1 Análise de contaminantes orgânicos em tecidos

As amostras de tecidos dos peixes coletados foram preservadas em freezer -80 °C até o processamento e análise dos contaminantes orgânicos (HPAs, HAs, PCBs, DDTs e LABs). As análises foram realizadas para a avaliação das respostas bioquímicas e moleculares frente aos contaminantes bioacumulados. Estas análises foram realizadas em colaboração com o grupo

do Laboratório de Química Orgânica Marinha do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo (LabQOM, IO, USP).

As amostras das carcaças de *P. vivipara* foram desidratadas durante 72 horas em liofilizador (Thermo Savant, módulo D), maceradas, homogeneizadas em almofariz com pistilo e armazenadas em frascos de vidro previamente limpos com solvente para posteriores análises. As análises de bioacumulação em peixes *P. vivipara* foram baseadas em MacLeod e colaboradores (1985) com algumas modificações, e realizadas por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) (modelo X, Perkin Elmer). Para os DDTs foi utilizado um cromatógrafo a gás equipado com detector de captura de elétrons (GC-ECD). Os demais grupos de compostos (HPAs, HAs, PCBs, LABs) foram analisados no cromatógrafo a gás equipado com espectrômetro de massas (GC-MS) 6890/5973N (Agilent Technologies).

5.4.2 Caracterização da água marinha e esgoto sanitário utilizado nas exposições

A análise do esgoto bruto, da água marinha utilizada nos grupos controle e nas diluições dos grupos expostos foi realizada pela empresa QMC Saneamento de Florianópolis, SC, nos tempos: anterior ao início da exposição (tempo 0 h), e renovação pós 48 h de exposição. A execução das coletas foi seguida conforme orientação prévia da empresa, baseando-se nos protocolos *Standard Methods* 1060, NBR 9898 e NBR 9897 (ABNT, 1987, 2003).

As amostras foram preparadas de acordo com o protocolo *Standard Methods for the Examination of Water & Wastewater*, Edição 22, (APHA, 2005) com método padronizado para alcalinidade total (SM 2320B), nitrato (SM 4110 B), nitrito (SM 4500-NO₂ B), nitrogênio amoniacal total (EPA 350.2-1974), nitrogênio total (SM 4500 N C), sólido total seco a 104 °C (SM 2540 B), turbidez (SM 2130 B), coliformes fecais (SM 9221 E), coliformes totais (SM 9221 B), demanda bioquímica de oxigênio – DBO (SM 5210 B), demanda química de oxigênio - DQO (SM 5220 D), detergente (SM 5540 C), fenóis totais (SM 5530 D), P (SM 4500-P E), Cd, Pb, Cu, Cr, Ni e Zn (SM 3111 B), Hg (SM 3112 B), óleos e graxas (SM 5520 D).

Durante todo o período de exposição os níveis de O₂ dissolvido e o pH da água foram monitorados.

5.5 ANÁLISES MOLECULARES

5.5.1 Preparação das bibliotecas para NGS Ion Proton

O RNA total dos fígados de *P. vivipara* expostos ao esgoto sanitário 33 % foi extraído com o protocolo do reagente Qiazol (Qiagen®). Após a extração o RNA foi quantificado em espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Fisher Scientific®) e em seguida tratado com DNaseI RiboPure™ RNA purification kit (Ambion for Life Technologies) e purificado em colunas do kit RNeasy® MinElute® Cleanup (Qiagen®) para remoção de contaminantes como fenol, sais e DNA genômico.

Para remoção do RNA ribossomal citosólico (5S, 5.8S, 18S e 28S) e mitocondrial (12S e 16S), o RNA total foi processado utilizando o kit RiboMinus Eukaryote kit for RNA-Seq (Invitrogen). A qualidade foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 2 % e no instrumento Bioanalyzer 2100 (Agilent). A concentração foi quantificada em fluorímetro Qubit 2.0 (Invitrogen). As três amostras de melhor qualidade e concentração de cada tratamento foram escolhidas para a construção das bibliotecas de cDNA utilizando o Ion Total RNA-Seq kit v2 juntamente com os marcadores Ion Xpress™ Barcode 1-16 kit (Life Technologies), seguidos pelo enriquecimento e emulsão em larga escala utilizando Ion PI™ Template OT2 200 Kit v2 (Life Technologies) de acordo com as recomendações do fabricante. As três bibliotecas obtidas de cada grupo experimental foram sequenciadas com Ion Proton™ System via Ion PI™ Sequencing 200 Kit v2 (Life Technologies), no Núcleo de Fixação Biológica de Nitrogênio do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná (UFPR) em Curitiba, PR.

5.5.2 Preparação das bibliotecas para NGS Illumina MiSeq

O RNA hepático total foi extraído com o reagente Qiazol (Qiagen®) seguindo as recomendações do fabricante. Após a extração o RNA foi quantificado em espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Fisher Scientific®) e em seguida tratado com DNaseI (Qiagen®) e purificado em colunas do kit RNeasy® MinElute® Cleanup (Qiagen®) para remoção de contaminantes como fenol, sais e DNA genômico.

As quatro bibliotecas de cDNA, sendo uma biblioteca por sexo para cada grupo (controle e exposto), foram preparadas seguindo o protocolo dos kits TruSeq Stranded Total RNA LT Ribozero gold (Illumina®, EUA). Os mRNAs foram enriquecidos com o kit

Dynabeads mRNA DIRECT Purification (Invitrogen) e sequenciados pela metodologia *paired-end* (PE) com o kit - MiSeq Reagent Kit 150v3 (2X de 75 bases) (Illumina®, EUA). Mais uma vez, o sequenciamento das bibliotecas foi realizado no Núcleo de Fixação Biológica de Nitrogênio Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná (UFPR) em Curitiba, PR.

5.5.3 Análises de bioinformática

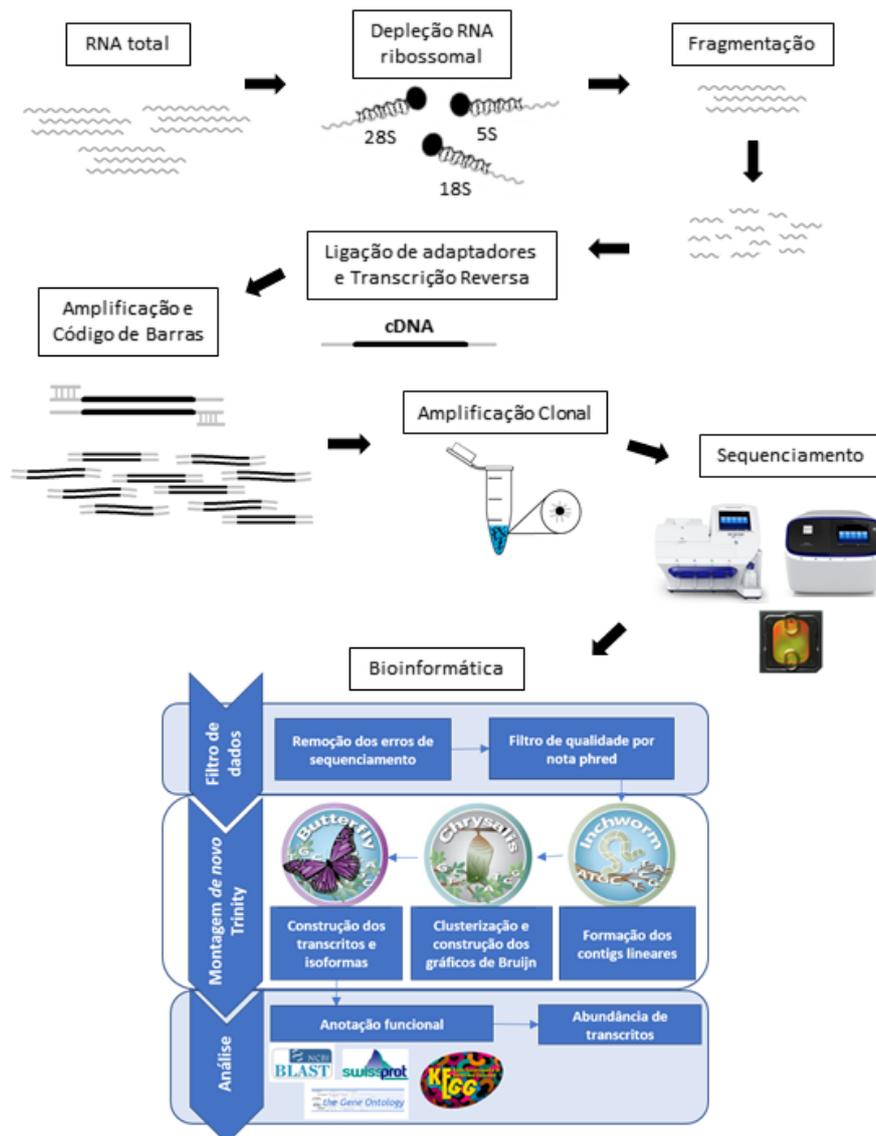
Após o sequenciamento, as sequências obtidas em formato *fastq* foram analisadas no software NGS QC *toolkit* (PATEL; JAIN, 2012), filtrando as sequências de baixa qualidade (nota phred menor que 20 em 75 % do tamanho do *read*) e tamanho inferior a 25 pares de base (pb) para a plataforma Ion Proton. Para a plataforma Illumina MiSeq, a nota phred de corte foi de 30 (nota menor que 30 em 75 % do tamanho do *read*) e tamanho inferior a 50 pb. Posteriormente foram removidas as bases com nota phred menor que 30 na extremidade 3' dos *reads*.

O processo de reconstrução dos *short reads* em informação correspondente aos fragmentos de cDNA originais sequenciados foram realizados através da metodologia *de novo*, visto que não existe genoma referência para a espécie *P. vivipara*. Foram testados três diferentes montadores buscando uma montagem que melhor representasse o transcriptoma da espécie, sendo a seleção baseada em critérios previamente estabelecidos e reconhecidos pela literatura vigente, como valores de tamanho do *contig* N50 e outras métricas, porcentagem de pares de *reads* mapeados corretamente e análise de homologia via BLASTx (CAMACHO et al., 2009), comparando com o transcriptoma descrito da espécie *Poecilia reticulata* (FRASER et al., 2011). Os seguintes programas de montagem foram testados nesta proposta de projeto: Trinity RNA-Seq (GRABHERR et al., 2011), Velvet-Oases (SCHULZ et al., 2012; ZERBINO; BIRNEY, 2008) e MIRA Assembler (CHEVREUX; WETTER; SUHAI, 1999). Em todos os casos, foram testadas montagens com os valores básicos (*default*) e alterando parâmetros como tamanho do *k-mer* utilizado, entre outras opções disponíveis em cada montador.

Os transcritos provenientes do sequenciamento via Ion Proton foram anotados utilizando diversas estratégias, como a busca por homologia no banco de proteínas não-redundantes do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), Swiss-Prot

(BOECKMANN et al., 2003), Ontologia gênica (Gene Ontology - GO) (ASHBURNER et al., 2000), classificação de vias metabólicas via KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) (KANEHISA; GOTO, 2000). A **Figura 6** representa o *pipeline* da construção das bibliotecas até a montagem *de novo* e anotação do transcriptoma hepático de *P. vivipara* via Ion Proton.

Figura 6. Plano de trabalho da montagem *de novo* e análise do transcriptoma hepático de *P. vivipara* expostos ao esgoto sanitário 33 % (v/v) por 24 h via Ion Proton. Nos detalhes estão descritos os processos de construção das bibliotecas de cDNA, amplificação, sequenciamento e análises de bioinformática.



Fonte: Acervo do Autor.

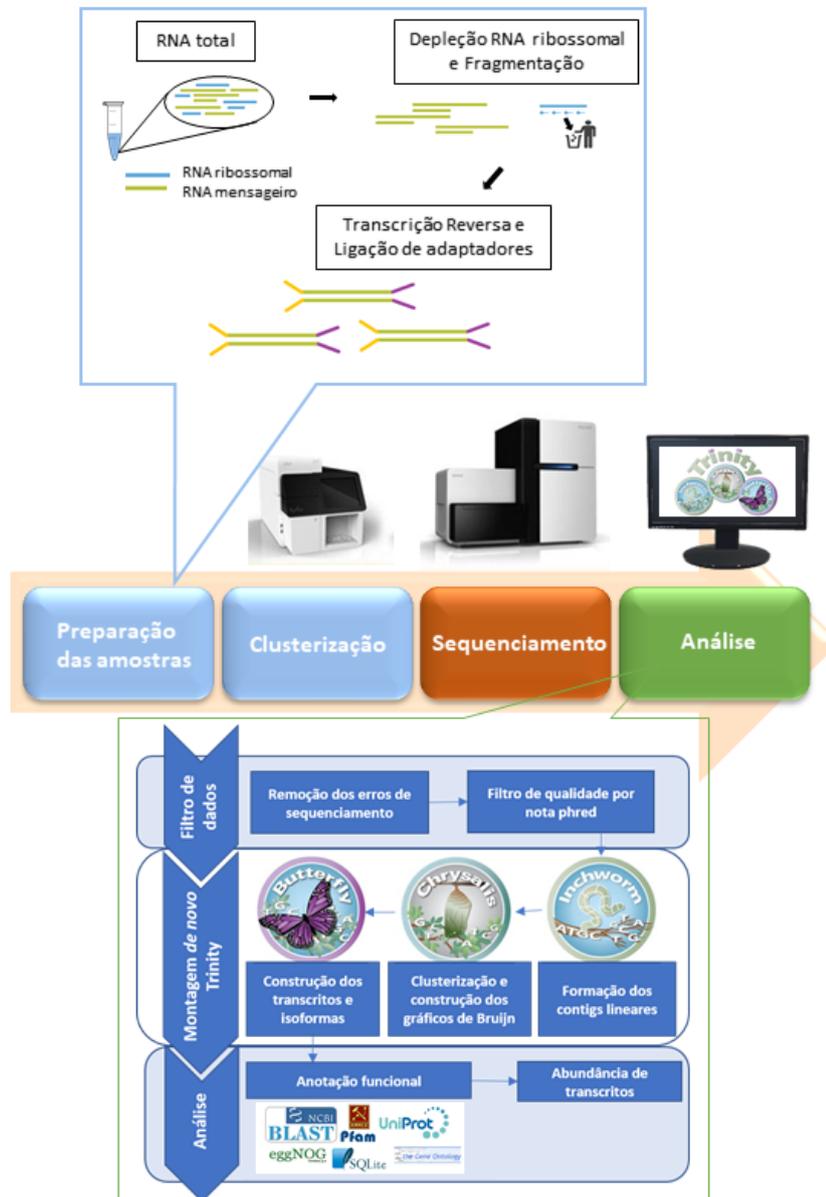
A abundância de transcritos foi estimada utilizando o método Kallisto (BRAY et al., 2016) disponível no pacote Trinity (GRABHERR et al., 2011). Os transcritos altamente expressos foram analisados pela estatística Ex90N50 (Trinity *tool kit*) e as regiões codificantes

dos transcritos foram identificadas utilizando o programa TransDecoder (v 2.1.0). As maiores fases de leitura aberta (ORFs) foram anotadas combinando as sequências com a base de dados do TrEMBL (BOECKMANN et al., 2003) por meio do programa BLAST+ (blastx, e-value crítico = $1e-6$) (CAMACHO et al., 2009). Todos os resultados obtidos foram depositados para acesso público no banco SRA (*Sequence read archive*) do NCBI.

Para a montagem do transcriptoma via Illumina MiSeq, o conjunto de transcritos mais altamente expressos foram analisados pela estatística ExN50 (Trinity *tool kit*). As regiões codificantes dentro dos transcritos foram identificadas utilizando o programa TransDecoder (v 2.1.0). As maiores fases de leitura aberta (ORFs) foram anotadas combinando as sequências com a base de dados do TrEMBL por meio do programa BLAST+ (blastx, e-value crítico = $1e-6$) (CAMACHO et al., 2009).

A anotação funcional do transcriptoma foi realizada utilizando o programa Trinotate (BRYANT et al., 2017). Trinotate é uma ferramenta de anotação funcional automática de transcriptomas, particularmente os montados *de novo*, tanto para organismos modelo ou não. O programa utiliza vários métodos referenciados para anotação funcional como a busca por homologias de sequência conhecida (BLAST+/Swiss-Prot) (BOECKMANN et al., 2003; CAMACHO et al., 2009), identificação de domínios de proteína (HMMER/Pfam) (FINN; CLEMENTS; EDDY, 2011; PUNTA et al., 2012), identificação de peptídeo sinal e domínios transmembrana (signalP/tmHMM) (KROGH et al., 2001; PETERSEN et al., 2011) além de utilizar diversos bancos de dados para anotação como o GO, KEGG e eggNOG (ASHBURNER et al., 2000; KANEHISA; GOTO, 2000; POWELL et al., 2012). Todos os dados de anotação funcional derivados desta análise de transcritos está integrada a um banco de dados SQLite que permite uma rápida e eficiente busca por termos específicos relacionados a uma hipótese científica, ou como um meio de criar a anotação geral de todo o transcriptoma. Para a representação gráfica das anotações GO, foi utilizado o programa WEGO (YE et al., 2006). Na **Figura 7** está representado o *pipeline* da construção das bibliotecas até a montagem *de novo* e anotação do transcriptoma hepático de *P. vivipara* via Illumina MiSeq.

Figura 7. Plano de trabalho da montagem *de novo* e análise do transcriptoma hepático de *P. vivipara* expostos ao esgoto sanitário 33 % por 24 h via Illumina MiSeq. Nos detalhes estão descritos os processos de construção das bibliotecas de cDNA, clusterização, sequenciamento e análises de bioinformática.



Fonte: Acervo do Autor.

5.5.4 Análise da transcrição gênica por PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

5.5.4.1 Seleção dos genes e desenho de iniciadores

A partir das anotações de ambos os transcriptomas hepáticos, genes de interesse foram selecionados para utilização na técnica de qPCR. As sequências escolhidas codificam para os genes dos receptores nucleares: *Receptor para aril hidrocarboneto (AhR)*, *Receptor de*

estrogênio alfa (ER), Receptor pregnano X (PXR) e para genes possivelmente modulados por estes receptores como: Citocromo P450 família 1A (CYP1A), Citocromo P450 família 2K1 (CYP2K1), Citocromo P450 família 3A30 (CYP3A30), Superóxido dismutase (SOD), Glutathione S-transferase A3 (GSTA3), Glutathione S-transferase Mu 3 (GSTMu), Fator de transcrição SOX9 (SOX9), Vitelogenina-1 (VIT), Zona pelúcida glicoproteína 4 (ZP4), Proteína associada a multirresistência 1 (ABCC1), Resistência a múltiplas drogas (MDR-1), Proteína associada a multirresistência 2 (MRP2), Sulfotransferase 1C1 (ST1C1), Uridina difosfato glicuronosiltransferase 1A1 (UGT1A1), NADPH-quinona oxidoreductase-1 (NQO1). Como normalizadores foram escolhidos os genes Fator de alongação 2 (EF2), Proteína ribossomal 40S S2 (40S2) e Proteína ribossomal 40S S11 (40S11) (PIAZZA, 2012).

Os iniciadores específicos foram desenhados e analisados com o auxílio dos softwares PrimerQuest e OligoAnalyzer (Integrated DNA Technology) e a lista encontra-se na **Tabela 1**.

Tabela 1. Sequência de iniciadores senso (F) e antisseno (R) dos genes de *Poecilia vivipara* selecionados: Citocromo P450 família 1A (CYP1A), Citocromo P450 família 3A30 (CYP3A30), Citocromo P450 família 2K1 (CYP2K1), Superóxido dismutase (SOD), Receptor para aril hidrocarboneto (AhR), Receptor pregnano X (PXR), Glutathione S-transferase A3 (GSTA3), Glutathione S-transferase Mu 3 (GSTMu), Fator de transcrição SOX9 (SOX9), Receptor de estrogênio alfa (ER), Vitelogenina-1 (VIT), Zona pelúcida glicoproteína 4 (ZP4), Proteína associada a multirresistência 1 (ABCC1), Resistência a múltiplas drogas (MDR-1), Proteína associada a multirresistência 2 (MRP2), Sulfotransferase 1C1 (ST1C1), Uridina difosfato glicuronosiltransferase 1A1 (UGT1A1), NADPH-quinona oxidoreductase-1 (NQO1), Fator de alongação 2 (EF2), Proteína ribossomal 40S S2 (40S2) e Proteína ribossomal 40S S11 (40S11).

Gene	Sequência (5'-3')	Produto (pb)
CYP1A	F - ACACAAACGCTGCTACCTGGGAGT	102
	R - CACAGTCAACACAGGCCACCTTCAGA	
CYP3A30	F - CTTCTCAAACACTCCGTATG	93
	R - CCTTTCGTCTCCTCTGAA	
CYP2K1	F - CCACAGAGAGATGAAGGATGAAT	100
	R - TGAATCGTTGAGGGTTGAGG	
SOD	F - CAGAGTGGCTAAACTATCAAA	98
	R - CCAAGGCACTTAATGAGAC	
AhR	F - ATGATAAAGACGGGAGAGAG	124
	R - CGATGATGTAGTCTGGTTTG	
PXR	F - GTCGGAAGAACATCTGTAAA	125
	R - CCTCATCTCCATCACCA	
GSTMu	F - CATGGACTTTAGAAACGGCTTTG	100
	R - GAAGTGTCTTCAGCGTACCTT	
GSTA3	F - TTCGTCACAGACACCAAACC	101
	R - AGGTACACGGGTCCAGTAAG	

continuação tabela 1

Gene	Sequência (5'-3')	Produto (pb)
<i>SOX9</i>	F - TGACATTTCTCCTGTTCTTC R - GCGAGCAGATAGTCTTTAAT	100
<i>ER</i>	F - GAGCGTTGTAGGTCAAAC ACAGACAGCAGTGGATAA	113
<i>VIT</i>	F - TTTCTAATGACCCGATGTTG R - GGTACTCCTGTCTGATTTCT	107
<i>ZP4</i>	F - AACCCCTCAAAGTGTACCACAG R - GAAGAGCCATCCAGAGGAATC	98
<i>ABCC1</i>	F - CAGAACTTGGGTCCATCTGT R - CTGAGCCACCTGGTATGTTT	105
<i>MDR1</i>	F - GGGATGTTGATTCAGAGTTTCAG R - GGATGACGAGGGTGAGTTTC	85
<i>MRP2</i>	F - GCCCTCAATGTAACCTAACC R - CAGCGTATTCACTCACTCTTT	97
<i>ST1C1</i>	F - ATGTGGATGAGAGGGAAG R - GCAGAGGAGAAGGAGTTAT	80
<i>UGT1A1</i>	F - CAAGGTTGGGAATGTCCTACTC R - CAGCGTGGGAGAACATCTTT	102
<i>NQO1</i>	F - AAGTGAAGGAGGAGCAGAAG R - GCAGGAAGTGATGGAGATAAAG	149
<i>EF2</i>	F - ACTGTAAGCGAGGAATCAGAGGTG R - TACTTGTGTCAGCGAGGTAACGGG	102
<i>40S2</i>	F - GGAAGGAACAGATGAGCAGGTAGAAG R - GCGAATGTCTTTGGATGAGCCC	100
<i>40S11</i>	F - CTATCTCTACTCTCTGCCCATC R - ATCTTCAGGACCTCGTCTTT	84

Fonte: Acervo do Autor.

5.5.4.2 Extração de RNA total e síntese de cDNA

O RNA total foi extraído das amostras de fígado provenientes da exposição realizada no delineamento experimental 2. O método utilizado foi o do reagente Qiazol (Qiagen®). Foram verificadas a concentração e pureza das amostras de RNA em espectrofotômetro Nanodrop (Nanodrop®), a 260, 280 e 320 nm. As amostras resultantes foram utilizadas para a reação de transcrição reversa.

A síntese de DNA complementar (cDNA) pela ação da transcriptase reversa foi realizada utilizando o kit QuantiTect Reverse Transcription (Qiagen®) com um µg de RNA de cada amostra. Novamente a concentração e pureza das amostras de cDNA foram verificadas em Nanodrop (Thermo Fisher Scientific®) e em seguida as amostras foram diluídas para a

concentração de 100 ng, aliquotadas e armazenadas em freezer -20 °C para utilização na técnica de qPCR.

5.5.4.3 Padronização das reações e análise de qPCR

As reações de qPCR foram realizadas em rotor de 72 poços, Rotor-Disc 72 (Qiagen) no termociclador Rotor Gene 6000 (Qiagen). O kit utilizado foi *QuantiFastTMSYBR[®] Green PCR* (Qiagen) com protocolo de ciclagem de dois passos. Após a ativação inicial da enzima (HotStarTaq *Plus* DNA Polimerase) por cinco minutos a 95 °C, ciclos de desnaturação por 10 s a 95 °C seguidos por 30 s a 60 °C de anelamento/extensão com aquisição de fluorescência foram repetidos 40 vezes. Após a ciclagem foi realizada uma curva de dissociação elevando-se 1 °C a cada 5 s iniciando em 55 °C até 95 °C.

A padronização da eficiência da reação para cada par de iniciadores foi realizada utilizando-se uma curva seriada de um *pool* de cDNA de todas as amostras em concentrações de 500 ng, 250 ng, 125 ng, 62,5 ng e 31,25 ng por reação de qPCR pipetadas em duplicata. Uma reação considerada ótima duplicaria sua quantidade de cDNA a cada ciclo, correspondendo a uma eficiência de 100 %. Ao final das reações de qPCR, foram observadas as curvas de dissociação para especificidade dos iniciadores nas quais os genes com um único produto (único pico de Temperatura de *melting*) foram considerados específicos. Os genes que apresentaram eficiências entre 95 e 105 %, coeficiente de correlação (R^2) maior que 0,97 e um único ponto de dissociação foram considerados adequados para as análises. Estes valores foram calculados diretamente no programa Rotor-Gene Q – Series Software (v 2.3.1).

Após a padronização das reações, 100 ng de cDNA por reação foram utilizados sempre com uma curva padrão em paralelo. Os valores brutos de fluorescência foram transformados em uma escala logarítmica, tornando possível a delimitação do ciclo limiar (C_q) com base no coeficiente de correlação (R^2) e eficiência da curva.

Foram testados como normalizadores os genes *EF2*, *40S2* e *40S11* que serão chamados como genes referência (BUSTIN et al., 2009), para utilização no método do C_q comparativo ou $\Delta\Delta C_q$ (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008).

Os testes de estabilidade transcricional dos genes candidatos foram realizados pela ferramenta RefFinder (XIE et al., 2012) que foi desenvolvida para avaliar e triar genes

referência com base nos conjuntos de dados experimentais. Esta ferramenta utiliza uma abordagem que integra a maioria dos principais programas computacionais disponíveis como: geNorm, que calcula uma medida para cada gene baseado na variação média pareada entre um gene em particular e todos os outros genes controle (VANDESOMPELE et al., 2002), Normfinder, que permite não apenas estimar a variação geral dos genes candidatos, mas também a variação entre subgrupos de amostras do conjunto de amostras (ANDERSEN; JENSEN; ØRNTOFT, 2004), BestKeeper, que utiliza correlações pareadas (PFAFFL et al., 2004), além do método Delta-Cq comparativo (SILVER et al., 2006), para ranquear e comparar os genes testados como candidatos a referência. Baseado nos ranqueamentos de cada programa, o RefFinder atribuiu um peso apropriado a cada gene individual e calculou a média geométrica destes pesos resultando em uma classificação geral final.

Os dados de qPCR foram normalizados pelo gene referência e relativizados pelo grupo machos controle de cada período de exposição. Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. Os dados paramétricos foram testados pela análise de variância ANOVA de duas vias para avaliar os efeitos do tratamento (exposição ao esgoto sanitário 33% (v/v) e do sexo, e a interação entre estes dois fatores, seguidos pelo pós-teste de Bonferroni para indicar quaisquer diferenças significativas entre os grupos. Os dados não paramétricos foram avaliados pelo teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn's. Todos os testes assumiram nível de significância para $p \leq 0,05$ e foram calculados utilizando-se o programa GraphPad Prism 7.0.

5.6 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

5.6.1 Homogeneização

Para as análises bioquímicas, os fígados e brânquias dos animais expostos ao esgoto sanitário 33 % (v/v) provenientes do delineamento experimental 2, foram homogeneizados em tampão (Tris 50 mM, KCl 0,15 M, PMSF 100 μ M, pH 7,4) na proporção de 1:5 (peso/volume) com pistilo de teflon. O homogenato foi centrifugado a 9.000 x g por 30 minutos a 4 °C, posteriormente foi realizada uma centrifugação do sobrenadante a 100.000 x g por 70 minutos a 4 °C para obtenção da fração citosólica. O precipitado (fração microsomal) foi ressuspensionado em tampão (Tris 50 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, KCl 0,1 M, glicerol 20 %, pH 7,4). A partir das frações citosólicas foram medidas as atividades das enzimas (GST, CAT, GR, SOD,

G6PDH, GPx total e Selênio dependente) e com a fração microsomal, foi realizada a análise da atividade EROD (CYP1A).

Os cérebros foram homogeneizados utilizando o mesmo tampão de homogeneização sem PMSF. Os homogenatos foram centrifugadas a 9.000 x g por 30 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi utilizado para medir as atividades de (AChE e BuChE).

5.6.2 Determinação da concentração de proteínas

A quantificação das proteínas citosólicas e microsomais das amostras de fígados, brânquias e cérebro foi realizada por meio do método de Bradford (BRADFORD, 1976). O método utiliza o corante Coomassie Brilliant Blue (G-250), que reage com os aminoácidos das proteínas, mostrando uma coloração que varia da cor marrom para o azul. A coloração da amostra varia de acordo com a massa de proteínas (sendo o aumento de intensidade da cor azul relacionada diretamente com maiores concentrações de proteínas).

A determinação de proteínas totais foi realizada com o kit Bio-Rad Protein Assay® (Bio-Rad®) de acordo com instruções do fabricante. Em uma microplaca com 96 poços foram adicionados, em duplicata a amostra e o reagente de Bradford. Após incubação de cinco minutos, foi realizada uma leitura simples das amostras a 595 nm utilizando o espectrofotômetro de placas SpectraMax® M5 (Molecular Devices®). As absorbâncias das amostras foram comparadas a uma curva padrão de albumina sérica bovina (BSA) produzida no mesmo ensaio das amostras. A concentração de proteínas totais nas amostras foi expressa em $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ e utilizada para normalizar os dados de atividade enzimática.

5.6.3 Análise da atividade das enzimas de biotransformação de fases I e II

A atividade da Etoxiresorufina-O-deetilase (EROD) foi analisada na fração microsomal por fluorimetria medindo o aumento da fluorescência da resorufina (Ex/Em 530/585 nm) (BURKE; MAYER, 1974). As concentrações no ensaio foram: NADPH 1,67 mM; Etoxiresorufina 2 μM ; TRIS 50 mM, pH 7,8.

A análise da GST foi realizada segundo o método de Keen, Habig e Jakoby (1976). A amostra foi adicionada em um meio de reação contendo tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH

7,0 e CDNB 2,22 mM, como substrato, e glutathiona reduzida (GSH) 2,22 mM, e o aumento de absorvância devido à formação do produto DNB-SG foi acompanhado a 340 nm por espectrofotômetro. A condição final da reação é GSH 1mM e CDNB 1mM.

5.6.4 Análise da atividade da glutathiona peroxidase (GPx)

A atividade total da enzima glutathiona peroxidase (GPx) foi acompanhada indiretamente pela oxidação do NADPH. A GPx utiliza glutathiona reduzida (GSH) para reduzir um peróxido orgânico, como o peróxido de cumeno (Cu-OOH), originando glutathiona dissulfídica (GSSG) no final da reação. A GSSG, por sua vez, é reduzida pela enzima glutathiona redutase (GR) utilizando elétrons doados pelo NADPH. A taxa de oxidação de NADPH foi acompanhada espectrofotometricamente a 340 nm (WENDEL, 1981). As concentrações no ensaio foram: tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,0; EDTA 0,005 M; GR 1 U/mL; GSH 1 mM; NADPH 0,22 mM e a reação foi iniciada com a adição de Cu-OOH 10 mM. A atividade de GPx selênio dependente (Se-GPx) foi mensurada nas mesmas condições do ensaio acima com exceção do Cu-OOH que foi substituído pelo terc-Butil-hidroperóxido (*t*-B-OOH) 6 mM.

5.6.5 Análise da atividade glutathiona redutase (GR)

A atividade da enzima glutathiona redutase (GR) foi baseada no método descrito por Carlberg e Mannervik (1985). Ao reduzir o substrato glutathiona dissulfídica (GSSG), a GR oxida NADPH, que pode ser monitorado pelo decréscimo de absorvância no comprimento de onda de 340 nm. Desta forma, a velocidade de consumo de NADPH expressa a atividade da glutathiona redutase. As concentrações no ensaio foram de tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0; EDTA 0,005 M; GSSG 2 mM; GR 0,0046 g/mL e NADPH 0,6 mM.

5.6.6 Análise da atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH)

A atividade da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) foi determinada através do aumento de absorvância em 340 nm provocado pela redução de NADP⁺ a NADPH (GLOCK; MCLEAN, 1953). As concentrações do ensaio foram: tampão Tris.HCl 0,1 M, pH 7,4; MgCl₂ 0,2 M; G6P 2 mM e NADP 0,13 mM.

5.6.7 Análise da atividade da catalase (CAT)

A atividade da catalase (CAT) foi determinada de acordo com o método de Beutler (1975). Nesta metodologia, o decréscimo de absorvância em 240 nm está associado à velocidade de degradação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água e oxigênio. A amostra foi adicionada a um meio de reação contendo TRIS 1 M; EDTA 5 mM, pH 8,0 e H_2O_2 10,4 mM.

5.6.8 Análise da atividade da superóxido dismutase (SOD)

O método utilizado para determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD) foi descrito por McCord e Fridovich (1969), baseado na inibição da redução do citocromo c pelo O_2^- (ânion superóxido), produzido pelo sistema xantina / xantina oxidase. A redução do citocromo c é monitorado em 550 nm a 25 °C. A concentração final da reação foi: tampão fosfato de potássio 0,05 M, pH 7,8; EDTA 100 μ M; Xantina 50 μ M; KCN 20 μ M; Citocromo c 10 μ M.

5.6.9 Análise da acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BuChE)

A taxa de atividade da acetilcolinesterase (AChE) foi medida espectrofotometricamente na reação contendo acetilcolina e DTNB através do monitoramento da formação do complexo tiocolina-DTNB a 412 nm (ELLMAN et al., 1961). As concentrações do ensaio foram: tampão fosfato 0,1 M, pH 8,0; DTNB 0,455 mM e ACh 2,6 mM. Para a atividade butirilcolinesterase (BuChE), o mesmo protocolo foi seguido substituindo-se o substrato acetilcolina por butirilcolina (14 mM).

5.6.10 Análise estatística

Para os testes estatísticos, os dados precisam cumprir dois pressupostos básicos: apresentar distribuição normal e serem homoscedásticos (para testes paramétricos) ou apenas

serem homoscedásticos (testes não-paramétricos). Sendo que, os testes paramétricos são preferíveis por serem mais robustos.

Dessa forma, os resultados obtidos foram analisados quanto a normalidade pelo teste de D'Agostino e Pearson e a distribuição foi considerada normal para $p > 0,05$. Foram verificados a presença de valores discrepantes pelo Teste de Grubbs e Teste de ROUT. Após a identificação desses valores, eles foram excluídos das análises e a normalidade foi novamente testada. Em casos em que os dados não apresentem distribuição normal, mesmo com a remoção de *outliers*, todo o grupo de dados foi transformado em $Y = \log Y$ e a normalidade novamente testada.

Após a verificação da normalidade dos dados, foi testada a homogeneidade das variâncias (homoscedasticidade) utilizando o teste de Levene. Os dados foram considerados homoscedásticos para $p > 0,05$. Os dados que não apresentaram homoscedasticidade, foram transformados em $Y = \log Y$ e o teste foi refeito.

Após cumprirem os requisitos para as análises estatísticas, foi realizado teste ANOVA de duas vias para avaliar os efeitos do tratamento (exposição ao esgoto sanitário 33 % (v/v)) e do sexo, e a interação destes dois fatores, seguidos pelo pós-teste de Bonferroni. As análises estatísticas foram realizadas com os *softwares* STATISTICA 7.0 e GraphPad Prism 7.0. Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 CONTAMINANTES ORGÂNICOS DELINEAMENTO EXPERIMENTAL 1

Os resultados das análises químicas em tecidos indicam que os peixes foram capazes de bioacumular contaminantes orgânicos em seus tecidos diretamente do efluente ao qual foram expostos. Apesar de compostos como hidrocarbonetos alifáticos (HAs) e DDTs não serem detectados, os HPAs, PCBs e LABs foram quantificados e estão apresentados logo abaixo.

6.1.1 Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs)

Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são uma classe de poluentes orgânicos persistentes (POPs) hidrofóbicos formados pela fusão de dois ou mais anéis aromáticos (BEHERA et al., 2018; ELIE et al., 2015; FRANCO; LAVADO, 2019). Basicamente são formados por átomos de carbono e hidrogênio, mas podem apresentar

derivados com substituições com alquila, nitrogênio ou oxigênio (ELIE et al., 2015). Estes compostos podem ser de origem natural, porém, sua principal fonte é antropogênica através dos processos de combustão incompleta de madeira, óleos, produtos derivados do petróleo e escapamento de veículos automotores (BEHERA et al., 2018; DELLA TORRE et al., 2010; ELIE et al., 2015; FRANCO; LAVADO, 2019; KOENIG et al., 2013; SANTANA et al., 2018; VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003; WANG et al., 2010). Os HPAs entram nas estações de tratamento de esgoto e no ambiente aquático, principalmente através do escoamento urbano, e nesses locais podem passar por processos de degradação. Seus metabólitos são altamente tóxicos, mutagênicos, citotóxicos e potencialmente carcinogênicos, sendo considerados contaminantes ubíquos do ambiente aquático, principalmente em áreas marinhas costeiras (FRANCO; LAVADO, 2019; KANNAN et al., 2003). Devido a sua alta hidrofobicidade, os HPAs tendem a ser adsorvidos na matéria particulada permanecendo por longos períodos tanto em sedimento quanto na coluna d'água causando uma série de efeitos nocivos à biota incluindo dano genético, desregulação endócrina e disfunção do sistema imune, malformação, fibrose e câncer, levando a uma diminuição da sobrevivência de espécies residentes e redução da biodiversidade (BEHERA et al., 2018; DELLA TORRE et al., 2010; SANTANA et al., 2018; WANG et al., 2010). De acordo com suas características, os HPAs são considerados contaminantes prioritários para o monitoramento ambiental. Enquanto as concentrações em água e sedimento podem ser utilizados para descrever a contaminação, a quantificação dos compostos parentais podem levar a uma subestimação dos níveis de exposição visto que a biotransformação em peixes e outros vertebrados é bastante rápida (KAMMANN et al., 2017). Os HPAs são reconhecidos agonistas do receptor aril hidrocarboneto (AhR) em peixes baseado na sua capacidade de induzir CYP1A e ligar-se ao AhR dos teleósteos (BARRON; HEINTZ; RICE, 2004).

Neste estudo foram medidos os níveis dos 16 HPAs considerados prioritários pela Agência de Proteção Ambiental Americana (USEPA). Os níveis de HPAs totais acumulados no tecido de peixes *P. vivipara* foram maiores no grupo exposto por 96 h ao esgoto sanitário com 115 ng.g^{-1} , enquanto no grupo controle 96 h foram de 56 ng.g^{-1} (**Tabela 2**). Os HPAs acumulados nos tecidos dos peixes são oriundos de efluentes urbanos e correspondem ao fenantreno, naftaleno e seus substituintes alquilados metilnaftaleno e dimetilnaftaleno (CENNAMO et al., 2019; JIA; BATTERMAN, 2010).

Tabela 2. Níveis de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (ng.g⁻¹) por peso seco detectados em tecido de peixes *P.vivipara* nos grupos controle e expostos após 24 h e 96 h de exposição ao esgoto sanitário 33 % (v/v).

	Grupos Experimentais			
	CT 24 h	EX 24 h	CT 96 h	EX 96 h
Naftaleno	<5.80	<5.80	33.7	48.5
Metilnaftaleno	18.13	<4.71	16.8	28.2
Bifenil	<4.75	<4.75	<4.75	<4.75
Etilnaftaleno	<4.71	<4.71	<4.71	<4.71
Dimetilnaftaleno	<9.25	<9.25	<9.25	20.1
Acenaftileno	<3.83	<3.83	<3.83	<3.83
Acenafteno	<5.87	<5.87	<5.87	<5.87
Trimetilnaftaleno	<7.27	<7.27	<7.27	<7.27
Fluoreno	<5.16	<5.16	<5.16	<5.16
Metilfluoreno	<10.3	<10.3	<10.3	<10.3
Dibenzotiofeno	<1.41	<1.41	<1.41	<1.41
Fenantreno	5.24	17.1	5.50	18.6
Antraceno	<3.46	<3.46	<3.46	<3.46
Dimetilfluoreno	<10.3	<10.3	<10.3	<10.3
Metildibenzotiofeno	<2.81	<2.81	<2.81	<2.81
Metilfenantreno	<5.85	<5.85	<5.85	<5.85
Dimetildibenzotiofeno	<2.81	<2.81	<2.81	<2.81
Dimetilfenantreno	<5.85	<5.85	<5.85	<5.85
Fluoranteno	<2.63	<2.63	<2.63	<2.63
Pireno	<2.45	<2.45	<2.45	<2.45
Metilfluoranteno	<5.08	<5.08	<5.08	<5.08
Reteno	<5.08	<5.08	<5.08	<5.08
Metilpireno	<5.08	<5.08	<5.08	<5.08
Benzo[c]fenantreno	<5.08	<5.08	<5.08	<5.08
Benzo[a]antraceno	<3.71	<3.71	<3.71	<3.71
Criseno	<3.52	<3.52	<3.52	<3.52
Metilcriseno	<7.04	<7.04	<7.04	<7.04
Dimetilcriseno	<7.04	<7.04	<7.04	<7.04
Benzo[b]fluoranteno	<2.31	<2.31	<2.31	<2.31
Benzo[j]fluoranteno	<2.53	<2.53	<2.53	<2.53
Benzo[k]fluoranteno	<2.53	<2.53	<2.53	<2.53
Benzo[e]pireno	<2.40	<2.40	<2.40	<2.40
Benzo[a]pireno	<2.56	<2.56	<2.56	<2.56
Perileno	<2.03	<2.03	<2.03	<2.03
Indeno[1,2,3-c,d]pireno	<1.21	<1.21	<1.21	<1.21
Dibenzo[a,h]antraceno	<1.14	<1.14	<1.14	<1.14
Benzo[b]criseno	<1.14	<1.14	<1.14	<1.14
Benzo[g,h,i]perileno	<1.58	<1.58	<1.58	<1.58
Coroneno	<1.58	<1.58	<1.58	<1.58
ΣHPA	23.4	17.1	56.0	115

CT - Grupo controle; EX - grupo exposto ao esgoto sanitário 33 %; ΣHPA – Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos totais. "<" indica abaixo do nível de detecção para o método.

Fonte: Piazza et al., (2019).

Fenantreno é um HPA com três anéis benzeno fusionados e facilmente bioacumulável em organismos marinhos ativando os mecanismos de biotransformação e detoxificação (BOUTET; TANGUY; MORAGA, 2004; LIMA et al., 2019; PIAZZA et al., 2016). O Naftaleno possui um par de anéis benzeno fusionados e é considerado um composto orgânico semivolátil (CENNAMO et al., 2019; JIA; BATTERMAN, 2010).

Em estudos de campo em Florianópolis foram encontradas concentrações de HPAs entre 6,5 e 140 ng.g⁻¹ em sedimento marinho compostos majoritariamente por naftaleno, fenantreno, benzo[a]pireno e pirelino (PESSATTI et al., 2016) e em ambiente estuarino desde níveis abaixo do limite de detecção para áreas pristinas até 154,8 ng.g⁻¹ em áreas urbanas contaminadas por esgoto sanitário (PIAZZA et al., 2019).

6.1.2 Bifenilas policloradas (PCBs)

As bifenilas policloradas (PCBs) são um grupo de poluentes persistentes ubíquos no ambiente como resultado de emissões e deposição atmosférica (LICATA et al., 2019). Esses compostos são lipossolúveis e resistentes à biotransformação podendo bioacumular nos ambientes terrestres e aquáticos e na biota, a sua afinidade por lipídeos garante aos PCBs a biomagnificação através da cadeia trófica tornando-os um dos principais motivos de alertas quanto ao consumo de peixes nos Estados Unidos (KOENIG; FERNÁNDEZ; SOLÉ, 2012; NEEDHAM; GHOSH, 2019; RADICE et al., 2008). Os PCBs compreendem uma família de 209 congêneres resultantes da substituição de um a 10 átomos de hidrogênio por um átomo de cloro em um núcleo comum (ALFONSO et al., 2019; MCFARLAND; CLARKE, 1989). Devido ao seu largo uso industrial e doméstico até sua proibição em 1979, alta estabilidade química e persistência no meio ambiente, muitos ambientes urbanos são considerados hotspots de contaminação do solo e sedimentos tornando os PCBs claros indicadores de poluição antropogênica (LICATA et al., 2019; NEEDHAM; GHOSH, 2019; RADICE et al., 2008). As fontes de PCBs no esgoto são majoritariamente resultantes de escoamento urbano. Estudos *in vivo* e *in vitro* apontam que alguns PCBs e seus metabólitos podem mimetizar a ação de estrógenos como os congêneres PCB101, 153 e 138 que possuem padrões de cloração associados com a afinidade ao ER: cloração *orto-para*, onde os cloros na posição *para*

assemelham-se aos grupos hidroxila do 17 β - estradiol, e os cloros na posição *orto* conferem rigidez rotacional (DECASTRO et al., 2006; RADICE et al., 2008).

Neste estudo, foram quantificados níveis acima do limite de detecção apenas nos animais do grupo exposto por 96 h, com um total de 14,15 ng.g⁻¹ de PCB por peso seco. Deste somatório, 2,25 ng.g⁻¹ são do congênere PCB101; 2,61 ng.g⁻¹ do PCB149; 4,0 ng.g⁻¹ do PCB153 e 5,29 ng.g⁻¹ do PCB138 (**Tabela 3**). O PCB149 faz parte dos PCBs quirais que juntamente com o congênere 95 perfazem 6 % do total de PCBs (HE et al., 2018; KANIA-KORWEL; LEHMLER, 2016). Apesar de os PCBs serem persistentes, muitos congêneres, incluindo os quirais, podem ser biotransformados por hidroxilação, metilsulfonação, sulfatação, glucuronidação entre outros metabólitos (KANIA-KORWEL; LEHMLER, 2016).

No Brasil, a produção e uso de PCBs (mais conhecido como Ascarel) foram banidos, porém, quantidades consideráveis ainda são encontradas no ambiente como nos sedimentos da Baía da Babitonga em Santa Catarina, desde níveis abaixo do limite de detecção até 19,1ng.g⁻¹ com predominância dos congêneres PCB138 e 153 (RIZZI; TANIGUCHI; MARTINS, 2017). No trabalho de Piazza e colaboradores (2019) com *P. vivipara* expostos *in situ*, apesar de não encontrar PCBs acima do limite de detecção no sedimento, foram encontrados um total de 7,38 e 11,96 ng.g⁻¹ nos tecidos dos peixes mantidos no mangue do Itacorubi, Florianópolis, SC, sabidamente contaminado por esgoto sanitário bruto.

Tabela 3. Níveis de bifenilas policloradas (ng.g⁻¹) por peso seco detectado em peixes *P.vivipara* nos grupos controle e exposto após 24 h e 96 h de exposição ao esgoto sanitário 33 % (v/v).

	Grupos Experimentais			
	CT 24 h	EX 24 h	CT 96 h	EX 96 h
PCB8	<1.69	<1.69	<1.69	<1.69
PCB18	<1.92	<1.92	<1.92	<1.92
PCB31	<2.13	<2.13	<2.13	<2.13
PCB28	<2.20	<2.20	<2.20	<2.20
PCB33	<1.83	<1.83	<1.83	<1.83
PCB52	<2.43	<2.43	<2.43	<2.43
PCB49	<2.13	<2.13	<2.13	<2.13
PCB44	<2.59	<2.59	<2.59	<2.59
PCB74	<2.20	<2.20	<2.20	<2.20
PCB70	<2.31	<2.31	<2.31	<2.31
PCB66	<2.55	<2.55	<2.55	<2.55
PCB95	<2.43	<2.43	<2.43	<2.43
PCB56/60	<1.85	<1.85	<1.85	<1.85
PCB101	<1.36	<1.36	<1.36	2.25
PCB99	<2.62	<2.62	<2.62	<2.62
PCB97	<2.05	<2.05	<2.05	<2.05

Continuação Tabela 3.

	Grupos Experimentais			
	CT 24 h	EX 24 h	CT 96 h	EX 96 h
PCB81	<2.31	<2.31	<2.31	<2.31
PCB87	<1.85	<1.85	<1.85	<1.85
PCB77	<2.30	<2.30	<2.30	<2.30
PCB110	<2.17	<2.17	<2.17	<2.17
PCB151	<2.67	<2.67	<2.67	<2.67
PCB123	<2.25	<2.25	<2.25	<2.25
PCB149	<2.59	<2.59	<2.59	2.61
PCB118	<2.50	<2.50	<2.50	<2.50
PCB114	<1.91	<1.91	<1.91	<1.91
PCB153	<1.69	<1.69	<1.69	4.00
PCB132	<2.60	<2.60	<2.60	<2.60
PCB105	<2.27	<2.27	<2.27	<2.27
PCB141	<1.98	<1.98	<1.98	<1.98
PCB138	<2.05	<2.05	<2.05	5.29
PCB158	<2.39	<2.39	<2.39	<2.39
PCB126	<2.98	<2.98	<2.98	<2.98
PCB187	<3.45	<3.45	<3.45	<3.45
PCB183	<3.37	<3.37	<3.37	<3.37
PCB128	<2.00	<2.00	<2.00	<2.00
PCB167	<3.23	<3.23	<3.23	<3.23
PCB174	<3.16	<3.16	<3.16	<3.16
PCB177	<2.50	<2.50	<2.50	<2.50
PCB156	<2.66	<2.66	<2.66	<2.66
PCB157	<3.28	<3.28	<3.28	<3.28
PCB180	<2.76	<2.76	<2.76	<2.76
PCB169	<2.38	<2.38	<2.38	<2.38
PCB170	<2.39	<2.39	<2.39	<2.39
PCB199	<2.62	<2.62	<2.62	<2.62
PCB203	<2.83	<2.83	<2.83	<2.83
PCB189	<2.71	<2.71	<2.71	<2.71
PCB195	<4.53	<4.53	<4.53	<4.53
PCB194	<4.89	<4.89	<4.89	<4.89
PCB206	<4.59	<4.59	<4.59	<4.59
PCB209	<3.31	<3.31	<3.31	<3.31
PCBs TOTAIS	<1.36	<1.36	<1.36	14.2

CT - Grupo controle; EX - grupo exposto ao esgoto sanitário 33 %; PCB – Bifenilas policloradas. "<" indica abaixo do nível de detecção para o método.

Fonte: (PIAZZA et al., 2019).

6.1.3 Alquilbenzenos lineares (LABs)

Marcadores orgânicos como os esteróis fecais (coprostanol e epicoprostanol) e os alquilbenzenos lineares (LABs) têm sido aplicados com sucesso no estudo da contaminação por esgoto em sedimentos de áreas costeiras. Estes compostos acumulam no sedimento, onde estão predominantemente associados a material particulado e menos suscetíveis a degradação (MARTINS et al., 2014).

Os LABs são produzidos industrialmente para a síntese de alquilbenzenos lineares sulfonados (LAS) que é o surfactante aniônico mais utilizado na produção de detergentes (EGANHOUSE; SHERBLOM, 2001; EGANHOUSE et al., 1988; EGANHOUSE; BLUMFIELD; KAPLAN, 1983; ISOBE et al., 2004; MARTINS et al., 2010, 2014). Durante o processo de sulfonação, de 1 a 3 % aproximadamente dos LABS não reagem, permanecendo o composto parental no produto (EGANHOUSE; BLUMFIELD; KAPLAN, 1983). Estes traços de LAB estão presentes nos detergentes de uso industrial e doméstico que por consequência são introduzidos nos esgotos. Desta forma, a identificação de LABs foi proposta como um marcador para a contaminação do ambiente aquático por esgoto (EGANHOUSE; SHERBLOM, 2001; ISOBE et al., 2004; MARTINS et al., 2014). De fato, os LABs têm sido utilizados como marcadores de contaminação em diversas matrizes como sedimentos e biota (EGANHOUSE; BLUMFIELD; KAPLAN, 1983; FLORES-NUNES et al., 2015; PESSATTI et al., 2016; WEI et al., 2014; ZACCHI et al., 2018).

No presente estudo, os LABs quantificados no tecido dos peixes expostos foi maior em relação aos controles em ambos os períodos de exposição chegando a concentrações de 949 ng.g⁻¹ após 24 horas e 1195 ng.g⁻¹ após 96 horas (**Tabela 4**).

Tabela 4. Níveis de alquilbenzenos lineares (ng.g⁻¹) por peso seco detectado em peixes *P. vivipara* nos grupos controle e exposto após 24 h e 96 h de exposição ao esgoto sanitário 33 % (v/v).

LAB isômeros	Grupos Experimentais			
	CT 24 h	EX 24 h	CT 96 h	EX 96 h
5-C10 LAB	4.6	11.4	3.2	18.7
4-C10 LAB	3.2	8.4	1.8	13.4
3-C10 LAB	2.5	6.2	<0.98	8.4
2-C10 LAB	2.9	8.1	1.6	9.5
6-C11 LAB	7.2	19.2	5.7	32.5
5-C11 LAB	14.1	36.4	9.9	55.6
4-C11 LAB	8.2	25.6	5.8	38.3
3-C11 LAB	6.2	18.6	3.8	22.7
2-C11 LAB	10.5	28.1	8.2	28.3
6-C12 LAB	19.3	71.8	17.1	105.2

Continuação Tabela 4.

LAB isômeros	CT 24 h	Grupos Experimentais		
		EX 24 h	CT 96 h	EX 96 h
5-C12 LAB	16.9	61.2	12.2	87.9
4-C12 LAB	7.1	42.5	6.5	57.0
3-C12 LAB	12.6	35.2	9.6	39.3
2-C12 LAB	6.5	40.3	7.2	36.0
7-C13 LAB	43.5	104.1	33.5	127.1
6-C13 LAB	43.5	104.1	33.5	127.1
5-C13 LAB	8.1	85.2	7.6	116.8
4-C13 LAB	9.8	56.0	7.6	74.8
3-C13 LAB	47.8	81.5	35.1	89.0
2-C13 LAB	67.3	105.1	43.9	107.3
7-C14 LAB	<1.05	<1.05	<1.05	<1.05
6-C14 LAB	<1.05	<1.05	<1.05	<1.05
5-C14 LAB	<1.05	<1.05	<1.05	<1.05
4-C14 LAB	<1.05	<1.05	<1.05	<1.05
3-C14 LAB	<1.05	<1.05	<1.05	<1.05
2-C14 LAB	<1.05	<1.05	<1.05	<1.05
TOTAL LAB	342	949	254	1195

CT - Grupo controle; EX - grupo exposto ao esgoto sanitário 33 %; LAB – Alquilbenzenos lineares. "<" indica abaixo do nível de detecção para o método.

Fonte: Piazza et al., (2019).

A presença de LABs detectados nos animais dos grupos controle 24 e 96 h indicam que a água marinha utilizada como controle e para a diluição do esgoto sanitário bruto dos grupos expostos, está possivelmente contaminada por alguma fonte de efluente urbano. A água marinha utilizada nesse estudo é captada no ambiente, filtrada por mídias físicas como filtros de membrana e ultravioleta, e é utilizada em cultivos de peixes, camarões e moluscos bivalves.

6.2 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO ESGOTO BRUTO, ÁGUA MARINHA E ESGOTO SANITÁRIO 33 %

As principais propriedades químicas e biológicas analisados na água marinha, esgoto sanitário bruto, e diluído para 33 % estão apresentados na **Tabela 5**. As análises foram realizadas no esgoto bruto que serviu de contaminante para a exposição de 24 e 96 horas, e nas suas diluições com água marinha filtrada antes do início da exposição: tempo 0 h e renovação dos aquários pós 48 h, e na água marinha utilizada nos grupos controle tempo 0h e 48 h diluída

em água destilada para salinidade 24. Esta mesma água marinha foi utilizada para diluição do esgoto até a concentração de 33 %.

Tabela 5. Propriedades químicas e biológicas do esgoto sanitário bruto, água do mar filtrada dos grupos controle e esgoto sanitário 33 % (v/v) dos grupos expostos pré-exposição (tempo 0 h) e renovação dos aquários após 48 h.

Amostras:	Esgoto Bruto	Controle 0 h	Esgoto Sanitário 33 % 0 h	Controle 48 h	Esgoto Sanitário 33 % 48 h
Alcalinidade total (mg/L)	218,0	82,0	142,0	78,0	150,0
Cd total (mg/L)	<0,014	<0,014	<0,014	<0,014	<0,014
Pb total (mg/L)	<0,17	<0,17	<0,17	<0,17	<0,17
Cu total (mg/L)	<0,028	0,063	0,060	0,052	0,051
Coliformes fecais (NMP/100)	nm	ausente	1,6 x 10 ⁷	ausente	2,1 x 10 ⁵
Coliformes totais (NMP /100)	nm	ausente	3,0 x 10 ⁷	ausente	4,5 x 10 ⁵
Cr total (mg/L)	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
Demanda bioquímica de oxigênio (DBO) (mg/L)	nm	<2,0	42,0	<2,0	87,5
Demanda química de oxigênio (DQO) (mg/L)	nm	467	1625	566	616
Detergentes (mg/L)	3,03	0,59	2,81	<0,10	1,37
Fenóis totais (mg/L)	<0,13	<0,001	0,14	0,563	0,56
P total (mg/L)	12,97	0,180	3,17	0,031	1,16
Hg total (mg/L)	<0,0002	<0,0002	<0,0002	<0,0002	<0,0002
Ni total (mg/L)	<0,34	<0,34	<0,34	<0,34	<0,34
Nitrato (N-NO ₃) (mg/L)	nm	<0,12	<0,12	<0,12	27,99
Nitrito (N-NO ₂) (mg/L)	nm	<0,015	<0,015	<0,015	<0,015
Nitrogênio amoniacal (mg/L)	nm	0,46	20,55	0,77	28,12
N total (mg/L)	71,0	<1,52	22,0	2,10	30,0
Sólidos secos à 104 °C (mg/L)	656	24.708	24.256	30.148	28.472
Turbidez (NTU)	52,75	<1,00	38,82	<1,0	21,68
Zn total (mg/L)	<0,04	<0,04	<0,04	<0,04	<0,04
Óleos e graxas (mg/L)	5,6	nm	nm	nm	nm

nm – parâmetro não medido; NMP – número mais provável; NTU - unidade nefelométrica de turbidez.
Fonte: Acervo do Autor.

O esgoto bruto apresentou os maiores valores para alcalinidade total, detergentes, fósforo (P), nitrogênio (N) e turbidez. Os valores de coliformes fecais e totais, DBO, DQO, nitrato e nitrogênio amoniacal foram maiores nos grupos expostos (**Tabela 5**).

6.3 TRANSCRIPTOMA VIA ION PROTON

6.3.1 Montagem *de novo* do transcriptoma

Os peixes utilizados nas amostras sequenciadas são provenientes de populações naturais aclimatadas em laboratório e expostas sob condições controladas visando uma representação dos genes transcritos em animais de ambos os sexos em condições mais próximas do ideal e sob estresse (exposição ao esgoto sanitário 33 %). Após a extração do RNA total hepático dos *pools* de machos e fêmeas adultos, as amostras foram processadas visando a depleção dos RNAs ribossomais e enriquecimento do mRNA. Seis bibliotecas de cDNA foram construídas, normalizadas e sequenciadas em uma extremidade (*single-end*) na plataforma Ion Proton produzindo um total de 289.709.168 *reads*. Após a avaliação de qualidade e limpeza dos dados, um total de 237.601.956 *reads* (**Tabela 6**) foram montados de novo (*reads* brutos e *reads* normalizados) em contigs pelo Trinity (v.2.4.0) (GRABHERR et al., 2011) com tamanho mínimo de contig de 100 pb e k-mer de 25. Com o programa Velvet-Oases (v 0.2.08) (SCHULZ et al., 2012; ZERBINO; BIRNEY, 2008), apenas *reads* normalizados foram montados de novo em contigs com os k-mers de 19, 25, 37 e 45. O programa MIRA não foi capaz de rodar a quantidade total de dados obtidos, mesmo quando normalizado, portanto foi excluído das análises deste transcriptoma.

Tabela 6. Total de *reads* das bibliotecas hepáticas de *P. vivipara* dos grupos controle e exposto ao esgoto sanitário 33 % (v/v) sequenciadas na plataforma Ion Proton após verificação da qualidade e limpeza de dados.

	Controle		Exposto	
Sequências Totais	C1	54.853.305	E1	49.949.448
	C2	51.254.299	E2	20.584.243
	C3	17.498.243	E3	43.462.418
Total de reads		123.605.847		113.996.109
Somatório			237.601.956	

C1, C2 e C3 - amostra controle 1, 2 e 3; E1, E2 e E3 - amostra exposto 1, 2 e 3.

Fonte: Acervo do Autor.

A comparação das métricas obtidas pelos diferentes montadores com os diferentes tamanhos de k-mer podem ser conferidas na **Tabela 7**.

Tabela 7. Comparação das métricas do sequenciamento e montagem *de novo* do transcriptoma hepático de *P. vivipara* expostos ao esgoto sanitário 33 % (v/v) por 24 h utilizando os montadores Trinity e Velvet-Oases, com diferentes valores de k-mer.

Montador Reads K-mer	Trinity			Velvet-Oases		
	Brutos	Normalizados		Normalizados		
	25	25	19	25	37	45
Sequências totais	236.873	120.277	33.662	31.114	19.046	7707
Total de bases	36.757.764	17.876.789	5.208.253	4.867.661	3.380.942	1.724.297
Menor sequência	101	101	70	76	87	100
Maior sequência	2.112	2.398	2.331	1.649	1.242	1.990
Média	155	148	154	156	177	223
Mediana	133	129	134	132	143	173
N25	206	187	208	218	271	390
N50	150	141	152	153	175	222
N75	121	118	121	120	130	159
N90	108	107	107	107	115	139
N95	104	103	103	103	112	134
As	26,29 %	26,30 %	26,64 %	26,54 %	26,08 %	25,98 %
Ts	25,71 %	25,64 %	25,00 %	24,80 %	24,47 %	24,26 %
Gs	24,58 %	24,59 %	23,94 %	24,38 %	25,20 %	25,45 %
Cs	23,43 %	23,47 %	22,63 %	22,80 %	23,48 %	23,87 %
(A + T)s	51,99 %	51,94 %	51,64 %	51,34 %	50,56 %	50,24 %
(G + C)s	48,01 %	48,06 %	46,57 %	47,18 %	48,68 %	49,32 %
Ns	0,00 %	0,00 %	1,79 %	1,48 %	0,76 %	0,44 %

pb – Pares de base; A – adenina; T- timina; G- guanina; C-citosina; N- qualquer base.

N25 – estatísticas do comprimento médio dos transcritos em 25 % da montagem.

N50 – estatísticas do comprimento médio dos transcritos em 50 % da montagem.

N75 – estatísticas do comprimento médio dos transcritos em 75 % da montagem.

N95 – estatísticas do comprimento médio dos transcritos em 95 % da montagem.

Fonte: Acervo do Autor.

Com relação ao total de sequências, a montagem pelo Trinity com *reads* brutos obteve um maior conjunto de dados com 236.873 sequências com um tamanho médio de 155 pb. Utilizando o mesmo programa, mas com *reads* normalizados, observou-se um decaimento de praticamente 50 % no número total de sequências montadas, sem perda da qualidade dos dados obtidos. Houve uma ligeira melhora no tamanho da maior sequência com 2.398 pb e o tamanho médio observado foi de 148 pb.

As montagens realizadas pelo programa Velvet-Oases são muito vantajosas por permitirem ao pesquisador testar múltiplas montagens em pouquíssimo tempo. Uma vez normalizados os *reads*, a montagem de grandes quantidades de dados é bastante eficaz quando comparados ao Trinity, por exemplo, utilizando o mesmo poder computacional (número de processadores e memória RAM). Entretanto, a qualidade das montagens ficou um pouco abaixo

daquelas realizadas no Trinity, com exceção das métricas de tamanho médio de sequências, mediana e N50 nos k-mers de 37 e 45. Quando comparadas as montagens de mesmo k-mer de 25 entre Velvet-Oases e Trinity *reads* normalizados e Velvet-Oases e Trinity *reads* brutos, há uma diferença entre 89 e 205 mil sequências, respectivamente. Para os k-mers menores (19 e 25) não há diferenças significativas entre os resultados comparando-se ao Trinity em ambas montagens, exceto para o número de sequências e o total de bases utilizados para a montagem (Tabela 7).

Baseado no tamanho dos contigs dos transcritos montados, pode-se obter a estatística convencional do tamanho de contig N50. Essa métrica aponta que ao menos metade dos nucleotídeos montados está em contigs de transcritos com no mínimo o valor de tamanho do N50. Isto é, na métrica de N50 encontrada na montagem do Trinity com *reads* normalizados, temos um valor de 141, o que indica que metade das bases montadas estão em contigs de transcritos de um tamanho de pelo menos 141 bases. Apesar de as montagens no Velvet-Oases com k-mers de 37 e 45 apresentarem valores de N50 maiores, considerando-se as demais métricas, optou-se por seguir as análises subsequentes com a montagem do Trinity normalizada.

Ainda em relação ao valor de N50, mesmo com um sequenciamento exaustivo das bibliotecas, foram obtidos *reads* redundantes que não contribuíram para a profundidade do transcriptoma. Quando comparados a outros transcriptomas de espécies próximas, o valor de 141 pb ficou muito abaixo. Por exemplo, em *Poecilia reticulata*, foi encontrado um N50 de 846 pb para cérebros e músculos de machos e fêmeas sequenciados no sistema 454 GS FLX FLX (FRASER et al., 2011). Na mesma espécie, em cérebros de machos e fêmeas, o N50 foi de 832 pb sequenciados em Illumina MiSeq e 1.295 pb em Illumina HiSeq, ambos *paired-end* (SAARISTO et al., 2017). Schedina e colaboradores (2018) encontraram em gônadas de três poecilídeos valores de N50 de 1.764 pb para *Poecilia formosa*, 2.339 pb para *Poecilia latipinna*, e 2.569 pb para *Poecilia mexicana* em sequenciamento Illumina HiSeq 2000 *paired-end*. Utilizando o mesmo sequenciamento, Fraser e colaboradores (2014) encontraram um N50 de 2.548 pb em cérebros de machos de *P. latipinna*. É importante frisar que a maioria dos trabalhos comparados utilizaram tecnologias de sequenciamento pareadas (*paired-end*) com *reads* maiores e de tamanho fixo, enquanto nesse estudo os *reads* foram gerados em fragmentos pequenos, de diferentes tamanhos e *single-end*. Nos diversos sequenciamentos realizados, os *reads* gerados apresentavam distribuição de tamanho entre 15 e 250 pb, e as médias variaram

entre o mínimo de 38 e máximo de 139 pb sendo que a maior parte das bibliotecas sequenciadas (24 dos 35 sequenciamentos) apresentou médias abaixo de 54 pb.

Após a escolha do conjunto de dados, a montagem Trinity normalizada foi analisada com o programa TransDecoder (v 2.1.0) do pacote Trinity para identificação das fases de leitura aberta. O total de ORFs corresponde a 2.726 contigs dos quais 408 são completos (**Tabela 8**).

Tabela 8. Sumário dos transcritos e unigenes de *P. vivipara* montados *de novo* pelo software Trinity.

Métricas	Valores
Total de <i>reads</i> brutos	289.709.168
Total de <i>reads</i> filtrados	237.601.956
Q20 bases	237.601.956
Conteúdo GC	48,06 %
Total de sequências	120.277
Total de bases montadas	17.876.789
Tamanho médio dos transcritos	148 pb
N50	141 pb
Total de trinity 'genes':	91.478
Total trinity transcritos:	120.277
Maiores ORFs identificadas	2.726
ORFs completas	408

Q20 – Escore de qualidade de *base-calling*; ORFs – Fases de leitura aberta.

Fonte: Piazza et al., (2019).

6.3.2 Anotação do transcriptoma

As 2.726 sequências contendo as maiores ORFs identificadas foram investigadas contra o banco de dados TrEMBL resultando num total de 2.661 sequências (97,62 %) similares a proteínas. Da lista de ORFs completas, foram selecionadas sequências com pelo menos 80 % de identidade resultando em 72 sequências para análise no banco de dados Pfam (**Tabela 9**).

Tabela 9. Lista das fases de leitura abertas - ORFs completas com pelo menos 80 % de identidade e descrição da família proteica putativa do banco de dados Pfam analisadas no transcriptoma hepático de *P. vivipara* montado *de novo*.

Sequência	Correspondente ao Pfam-A
TRINITY_DN60840_c4_g1_i1	Aminotransferase classe III
TRINITY_DN60878_c0_g2_i6	Zinco carboxipeptidase
TRINITY_DN59370_c1_g1_i1	Frizzled/Smoothened
TRINITY_DN61339_c19_g5_i2	Aminotransferase classe V
TRINITY_DN61362_c4_g1_i1	SecY translocase
TRINITY_DN61410_c0_g1_i17	Tiorredoxina
TRINITY_DN61384_c1_g1_i14	Domínio Actina
TRINITY_DN61338_c4_g1_i10	Domínio tipo Ferritina

Continuação Tabela 9.

Sequência	Correspondente ao Pfam-A
TRINITY_DN61408_c11_g1_i11	Tripsina
TRINITY_DN61375_c17_g2_i9	Tripsina
TRINITY_DN61388_c7_g3_i7	Motivo de reconhecimento de RNA (e.g. RRM, RBD)
TRINITY_DN61388_c7_g1_i3	Motivo de reconhecimento de RNA (e.g. RRM, RBD)
TRINITY_DN61294_c1_g1_i8	ne
TRINITY_DN61234_c4_g1_i11	Superóxido dismutase Cu/Zn
TRINITY_DN61234_c4_g1_i16	Superóxido dismutase Cu/Zn
TRINITY_DN61280_c0_g2_i14	ne
TRINITY_DN61310_c58_g1_i4	Proteína de divisão celular 48
TRINITY_DN61281_c8_g1_i6	Receptor ANF
TRINITY_DN61091_c0_g1_i4	Catalase
TRINITY_DN61107_c4_g1_i26	ne
TRINITY_DN60312_c0_g1_i3	Fosfodiesterase/nucleotídeo Tipo I
TRINITY_DN61633_c9_g1_i14	ne
TRINITY_DN61633_c9_g1_i15	ne
TRINITY_DN61556_c26_g2_i2	Domínio BRICHOS
TRINITY_DN61556_c26_g2_i10	Domínio BRICHOS
TRINITY_DN61556_c26_g2_i11	Domínio BRICHOS
TRINITY_DN61588_c22_g2_i1	Domínio citocromo P450
TRINITY_DN61614_c3_g2_i1	Alfa-2-macroglobulina (A2M) e Tioéster
TRINITY_DN61591_c5_g3_i11	Domínio PCI
TRINITY_DN61615_c48_g1_i5	Fibrinogênio
TRINITY_DN61561_c21_g1_i14	ne
TRINITY_DN61561_c21_g1_i25	Resistência a Glioxalase/Bleomicina
TRINITY_DN61597_c13_g1_i1	Hydroximetilglutaril-coenzima A redutase
TRINITY_DN61597_c13_g1_i2	Hydroximetilglutaril-coenzima A redutase
TRINITY_DN61566_c0_g1_i11	Domínio KH 1
TRINITY_DN61571_c35_g3_i7	Hemopexina
TRINITY_DN60951_c0_g1_i4	Domínio Fosforribosil transferase
TRINITY_DN60951_c0_g1_i6	ne
TRINITY_DN61031_c5_g1_i4	ne
TRINITY_DN61190_c7_g2_i4	ne
TRINITY_DN61190_c7_g2_i10	ne
TRINITY_DN61185_c2_g1_i2	Aminotransferase classe V
TRINITY_DN61185_c2_g1_i11	Aminotransferase classe V
TRINITY_DN61222_c0_g1_i1	OATP
TRINITY_DN61202_c0_g1_i5	Tiorredoxina
TRINITY_DN61189_c0_g1_i8	Domínio SRCR
TRINITY_DN61169_c2_g1_i1	Ácido graxo desaturase
TRINITY_DN61169_c2_g1_i3	Ácido graxo desaturase
TRINITY_DN35675_c569_g1_i1	ne
TRINITY_DN60776_c4_g1_i4	Domínio de ligação RNA dupla fita da proteína DEAD END 1
TRINITY_DN60791_c1_g1_i5	ne

Continuação Tabela 9.

Sequência	Correspondente ao Pfam-A
TRINITY_DN60772_c11_g1_i2	ne
TRINITY_DN59965_c967_g1_i1	Domínio metiltransferase
TRINITY_DN59965_c967_g1_i2	Domínio metiltransferase
TRINITY_DN59965_c967_g1_i3	Domínio metiltransferase
TRINITY_DN61439_c4_g2_i3	Fator de acoplamento ATP sintase mitocondrial
TRINITY_DN61465_c2_g1_i4	Proteína induzida por insulina INSIG
TRINITY_DN61465_c2_g1_i6	Proteína induzida por insulina INSIG
TRINITY_DN61465_c2_g1_i10	Proteína induzida por insulina INSIG
TRINITY_DN61436_c6_g1_i12	Glutaciona S-Transferase
TRINITY_DN61526_c12_g1_i19	AdoHciase S-adenosil-L-homocisteína hidrolase
TRINITY_DN61527_c6_g1_i1	Homogentisato 1,2-dioxigenase
TRINITY_DN61467_c5_g1_i10	Família Aldeído desidrogenase
TRINITY_DN61434_c7_g1_i11	Família Carboxilesterase
TRINITY_DN61434_c7_g1_i14	Família Carboxilesterase
TRINITY_DN61514_c1_g2_i3	PEPCK Fosfoenolpiruvato carboxicinase
TRINITY_DN61500_c3_g2_i12	Astacina (Família peptidase M12A)
TRINITY_DN61533_c11_g3_i5	Triptofano 2,3-dioxigenase
TRINITY_DN51666_c0_g1_i2	UGT Uridina difosfato glicuronosil transferase
TRINITY_DN60515_c5_g1_i8	CENP-T Componente cinetócoro do centrômero

ne – Não encontrado. SecY - Componente do complexo da proteína SEC translocase. RRM - Motivo de reconhecimento de RNA. RBD - Domínio de ligação ao RNA. ANF - Fator atrial natriurético. BRICHOS – Variedade de proteínas relacionadas a doenças com provável função chaperona. KHI – Domínio de homologia K. OATP - Polipeptídio transportador de ânion orgânico. SRCR - Domínio receptor scavenger rico em cisteína. C2H2 – domínio Cis2-His2. ATP – Trifosfato de adenosina. Fonte: (PIAZZA et al., 2019).

Dentre as sequências analisadas, podemos destacar alguns domínios com grande interesse biológico como sistemas de transporte, ligação e reconhecimento de RNA, sistema imune, defesas antioxidantes e sistema de biotransformação de fase II.

Uma das ORFs apresentou homologia à translocase Sec Y. O transporte de proteínas até o retículo endoplasmático é essencial para todas as células eucarióticas, eubactérias e arqueas, estando evolutivamente relacionado ao transporte proteico para dentro e através da membrana citoplasmática. Estas proteínas são direcionadas à membrana por sequências sinais cliváveis ou por segmentos transmembrana das proteínas de membrana (LI et al., 2007). A translocação ocorre através de canais de proteínas condutoras conservadas que são formados por um complexo proteico de membrana chamado complexo Sec61 em eucariotos e complexo SecY em procariotos (DUDEK et al., 2015; LI et al., 2007).

Pelo menos quatro das sequências de ORFs têm similaridades com aminotransferases de classe III e V. Aminotransferases compartilham características com outras enzimas piridoxalfosfato dependentes, como a ligação covalente do grupo piridoxalfosfato a um resíduo de lisina (OUZOUNIS; SANDER, 1993). A função molecular destas enzimas é a atividade

transaminase, ou seja, catalisam a transferência de um grupo amino para um aceptor, geralmente um 2-oxoácido (SHEN et al., 1998; VEIGA-DA-CUNHA et al., 2012).

Dentre os domínios de famílias de proteínas identificadas no banco de dados Pfam, algumas sequências dos transcritos contendo ORFs completas podem ser agrupadas na categoria de sistema imune. Tanto transcritos que são diretamente ligados ao sistema imune inato e adaptativo, quanto transcritos com funções relacionadas. O sistema imunológico é uma rede complexa e essencial para a regulação da homeostase de um organismo hospedeiro contendo uma variedade de mecanismos efetivos envolvidos na detecção e processamento de patógenos, agentes tóxicos e alérgenos (PERERA et al., 2019; REYNAUD; RAVETON; RAVANEL, 2008; ZHU et al., 2012). Em uma das ORFs completas, o domínio carboxipeptidase foi identificado. Estas proteínas contendo um íon metálico zinco são um grupo de proteases conhecidas por clivar resíduos de arginina e lisina carboxi-terminais de peptídeos especialmente no sistema complemento, tornando-se importantes reguladoras deste sistema (GODAHEWA et al., 2014; PERERA et al., 2019). Além da atividade imunológica, as carboxipeptidases são cruciais para o desenvolvimento vascular e hepático em *Danio rerio*, e regulação dos sistemas hematopoiético, cardiovascular e nervoso através da atividade proteolítica no fator derivado de células do estroma 1 α (SDF1- α) e seu receptor de quimiocina tipo 4 (CXCR4) durante a embriogênese (WU et al., 2017).

Em duas sequências da lista de ORFs completas, foram encontradas similaridades com o domínio tripsina. Em teleósteos, a tripsina é a serino-protease mais estudada e está relacionada com a coordenação de vários processos fisiológicos como digestão, coagulação sanguínea, reprodução e resposta imune (FREITAS-JÚNIOR et al., 2012), desempenhando um papel significativo nas defesas naturais do peixe contra patógenos como vírus e bactérias (SANDHOLT et al., 2019). Outro domínio identificado foi o fibrinogênio, que é uma proteína plasmática heterogênea capaz de sofrer modificações como glicosilação, oxidação, *splicing*, polimorfismos de único nucleotídeo dentre outras variações (DUVAL; ARIËNS, 2017) que pode ser transformada em uma rede de fibrinas insolúveis pela ação da trombina e fator XIIIa (fator de estabilização da fibrina) nos estágios finais da cascata de coagulação sanguínea (MANSETH et al., 2004). Sendo uma proteína de fase aguda, o fibrinogênio pode aumentar sua expressão durante as respostas inflamatórias, desempenhando um papel na homeostase,

fornecendo substrato para a formação de fibrina e reparo tecidual (MAKRINOS; BOWDEN, 2016; TALBOT et al., 2009).

A ferritina é uma proteína de 450 kDa com um papel principal no metabolismo de ferro atuando como uma fonte de reserva e o mantendo em uma forma solúvel e não tóxica em eucariotos e procariotos (NEVES; WILSON; RODRIGUES, 2009). A síntese de ferritina ocorre em relação à presença de ferro em resposta à detoxificação, e a regulação positiva é observada em eventos de estresse oxidativo e condições inflamatórias, já que ferro em excesso catalisa a produção de radicais hidroxila prejudiciais aos componentes celulares, sugerindo sua ligação com a resposta imune (NEVES; WILSON; RODRIGUES, 2009; WANG; ZHANG; SUN, 2011). Wang e colaboradores (2011) encontraram atividade antimicrobiana contra uma grande variedade de patógenos bacterianos de peixes e que esta atividade é dependente da capacidade de ligação ao ferro da proteína. A regulação da expressão dos genes *ferritina* em peixes desafiados por padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e/ou infecções patogênicas também foi relatada e conseqüentemente, a ferritina foi proposta como uma proteína de fase aguda envolvida nas respostas do sistema imune inato (OH et al., 2016). Esta proteína foi mais uma das encontradas na lista que foram agrupadas na categoria de sistema imune. Outra proteína de fase aguda, também encontrada na lista de domínios das ORFs completas, é a hemopexina. Esta glicoproteína plasmática altamente expressa no fígado durante eventos inflamatórios tem alta afinidade de ligação ao grupo heme que quando liberado dos eritrócitos danificados, não só fornece uma fonte de ferro para as bactérias invasoras, mas também uma alta toxicidade devido a sua habilidade de catalisar a formação de radicais livres (DOOLEY et al., 2010; TOLOSANO; ALTRUDA, 2002).

Uma categoria que se destaca nas ORFs pesquisadas são os diferentes domínios de ligação ao RNA (RBDs). Proteínas ligantes de RNA podem ligar-se diretamente a RNA fita simples ou dupla através da interação direta dos seus domínios RBDs, incluindo os motivos de reconhecimento de RNA (RRM), domínio KH e domínios de dedos de zinco que permitem o reconhecimento específico e ligação de diferentes seqüências e estruturas de RNA. Muitas dessas proteínas geralmente são expressas de maneira tecido-específico conduzindo importantes processos de desenvolvimento tecidual (LIN et al., 2018).

Algumas seqüências apresentaram domínios relacionados com sistemas de defesa antioxidante. O domínio tiorredoxina aparece por duas vezes dentre as 72 seqüências de ORFs completas. O sistema tiorredoxina é um dos sistemas redutores antioxidantes centrais, expressos ubiquamente em todos os tipos celulares e formas de vida (desde arqueas, bactérias aos

humanos) capaz de fornecer elétrons para uma grande quantidade de enzimas, e crítico para a síntese de DNA e defesa contra o estresse oxidativo (BRANCO; CARVALHO, 2018; LU; HOLMGREN, 2013; PACITTI et al., 2014). Esse sistema dissulfeto redutase inclui a tiorredoxina (Trx), uma proteína contendo dissulfeto que reduz uma variedade de substratos através de sítios catalíticos conservados; a peroxirredoxina (Prx), que é uma enzima antioxidante ubíqua que neutraliza H_2O_2 com equivalentes redutores fornecidos pela Trx; e tiorredoxina redutase (TrxR), uma piridina nucleotídeo-dissulfeto oxidorredutase que reduz Trx oxidase utilizando NADPH (LU; HOLMGREN, 2013; PACITTI et al., 2014). Tiorredoxinas também podem ligar-se a diversas proteínas iniciando a maquinaria de inflamassomas (ZHOU et al., 2010), que podem ativar uma enorme gama de fatores de transcrição relacionados aos processos pró-inflamatórios e iniciação da resposta imune tornando esta molécula uma importante ligação entre estresse oxidativo e a resposta imune (PACITTI et al., 2014).

As carboxilesterases de mamíferos são membros essenciais da superfamília das serinas hidrolases, que catalisam a quebra de éster de substratos estruturalmente diversos contendo éster, amida, tioésteres e carbamatos (SOLÉ; SANCHEZ-HERNANDEZ, 2015; WANG et al., 2018). Sua atividade está ligada a uma grande variedade de compostos endo e xenobióticos como piretróides, organofosfatos, carbamatos, além de fármacos e produtos de cuidado pessoal (PPCPs), desta forma, as carboxilesterases têm um papel importante na proteção de outras enzimas como a acetilcolinesterase e pode participar do metabolismo de lipídios (NOS et al., 2017; WANG et al., 2018). Estas atividades bem estudadas em mamíferos começaram a ser testadas em organismos aquáticos devido ao seu interesse como biomarcador de poluição, visto que muitos compostos xenobióticos que mesmo não encontrados no sedimento e coluna d'água, foram encontrados em tecido animal (SOLÉ; SANCHEZ-HERNANDEZ, 2015). Neste estudo, duas sequências apresentaram este domínio.

As espécies reativas de oxigênio (EROS) resultantes do metabolismo celular são importantes moléculas de diversas vias sinalizadoras, sendo que em um nível ótimo fisiológico, regulam uma variedade de atividades celulares e expressão gênica (LIU et al., 2015; LIVINGSTONE, 2001). Entretanto, estressores ambientais como metais traço e patógenos podem desregular o balanço e promover um acúmulo excessivo de EROS nos organismos levando a danos macromoleculares, apoptose ou necrose (XIE et al., 2018). O sistema de defesa

antioxidante auxilia na eliminação e detoxificação de EROS excessivo, impedindo seus efeitos negativos nos organismos (LIU et al., 2015). Dentre as enzimas antioxidantes podemos citar as superóxido dismutases (SODs), catalases (CATs), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), entre outras (LIVINGSTONE, 2001; REGOLI et al., 2011; VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

As superóxido dismutases são enzimas antioxidantes que catalisam a conversão de ânions superóxido reativos em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular (HEINK et al., 2013; LIU et al., 2015; XIE et al., 2018). Correspondem a uma família multigênica de metaloenzimas ubíquas presentes em todos os vertebrados (HEINK et al., 2013) que podem ser categorizadas em quatro grupos, de acordo com seu grupamento metálico (íon metal coordenado): SOD ferro (SODFe), SOD manganês (SODMn), SOD cobre/zinco (SODCu/Zn) e SOD níquel (SODNi) (LIU et al., 2015). Consideravelmente, a SODCu/Zn tem sido apontada como uma das enzimas mais importantes da família SOD devido a sua função fisiológica e potencial terapêutico, além de ser um dos mais importantes sequestradores de ânion superóxido que respondem ao estresse oxidativo (LIU et al., 2015). Após a formação de peróxido de hidrogênio pela SOD, normalmente o sistema de defesa contra EROS tem sequência pela ação da catalase (CAT) e várias peroxidases. CATs são heme enzimas que facilitam a remoção do H₂O₂, que é degradado em oxigênio molecular e água (SELLATHURAI; PRIYATHILAKA; LEE, 2019; VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Nesse estudo, foram observadas sequências de ORFs completas com domínios SODCu/Zn e CAT.

Além de domínios proteicos relacionados ao sistema antioxidante, também foram encontradas sequências com similaridades a GST e UDPGT. GSTs e UDPGTs são enzimas do sistema de biotransformação de fase II amplamente distribuídas que catalisam a conjugação de xenobióticos eletrofilicos (e.g. PCBs, HPAs e drogas) ou endobióticos (e.g. esteroides, hormônios da tireóide, bilirrubina) com glutathione e ácido glucurônico, respectivamente (BOUTET; TANGUY; MORAGA, 2004; CHAURASIA et al., 2016; KU et al., 2014). Estudos anteriores com *P. vivipara* expostos à fração do óleo diesel acomodada em água também encontraram estes dois genes presentes em bibliotecas de genes hepáticos induzidos (MATTOS et al., 2010).

Por último, podemos destacar desta lista mais uma sequência de interesse devido a sua função de transportador de vários compostos endo e xenobióticos: o polipeptídeo transportador de ânions orgânicos (OATP). Os transportadores OATPs pertencem à superfamília transportadora de solutos (SLC), facilitando o influxo sódio-independente de compostos

orgânicos anfipáticos como xenobióticos, hormônios, conjugados hormonais, sais biliares, prostaglandinas e drogas farmacêuticas para o compartimento celular mantendo a homeostase (MUZZIO et al., 2014; OSWALD, 2019). Em peixes teleósteos pouco é conhecido sobre a diversidade e especificidade funcional destas proteínas transportadoras, porém acredita-se que os transportadores OATP possam ser mais diversos nos peixes do que em mamíferos (MUZZIO et al., 2014).

6.4 TRANSCRIPTOMA VIA MiSEQ

6.4.1 Montagem *de novo* do transcriptoma

Assim como na montagem do transcriptoma via Ion Proton descrita anteriormente, os peixes utilizados nas amostras sequenciadas via Illumina MiSeq, referentes ao delineamento experimental 2, são provenientes de populações naturais aclimatadas em laboratório e expostas sob condições controladas ao esgoto sanitário 33 % (v/v), visando uma representação dos genes transcritos em animais de ambos os sexos em condições mais próximas do ideal e sob estresse.

Nesse experimento houve um refinamento no delineamento experimental e na condução da montagem *de novo* do transcriptoma hepático. As amostras de RNA total extraído de amostras de fígado individuais foram analisadas quanto a sua pureza e concentração, tratadas com DNaseI e purificadas em colunas do kit RNeasy® MinElute® Cleanup (Qiagen®). Após a purificação a qualidade e concentração das amostras foi avaliada quanto a concentração e integridade do RNA, ausência de contaminantes como fenol, sais e DNA genômico. Uma amostra de cada sexo do grupo controle e exposto por 24 h foram escolhidas para a construção de quatro bibliotecas de cDNA que foram nomeadas da seguinte maneira: Controle Fêmea 24 h = **CT1**; Controle Macho 24 h = **CT7**; Exposto Fêmea 24 h = **EX1**; Exposto Macho 24 h = **EX2**.

Após o sequenciamento, foram produzidos um total de 27.755.477 *reads* pareados (*reads* PE), que após a avaliação de qualidade e filtragem dos dados resultaram em 25.893.246 *reads* (93,29 % bases Q20, 46,87 % conteúdo de GC) destinados a montagem *de novo* (**Tabela 10**).

Tabela 10. Controle de qualidade dos dados sequenciados brutos e após a limpeza e filtragem por nota *phred*.

Biblioteca	Sequências totais de reads		
	Brutos	Limpos*	Filtrados**
CT1 R1	8.867.158	8.282.817	8.282.817
CT1 R2	8.867.158	8.282.817	8.282.817
CT7 R1	7.135.862	6.661.153	6.661.153
CT7 R2	7.135.862	6.661.153	6.661.153
EX1 R1	5.204.055	4.840.621	4.840.621
EX1 R2	5.204.055	4.840.621	4.840.621
EX2 R1	6.548.402	6.108.655	6.108.655
EX2 R2	6.548.402	6.108.655	6.108.655
Total PE	27.755.477	25.893.246	25.893.246

PE – *paired end* (pareadas); CT - Controle; EX – Exposto.

* – reads selecionados com nota *phred* acima de 30 em pelo menos 75 % da sequência.

** - reads selecionados (dos limpos) com nota *phred* acima de 30 na extremidade 3'.

Fonte: Acervo do Autor.

Utilizando o software Trinity, os *reads* foram montados *de novo* em 54.285 transcritos com uma média de 778 pb e tamanho de N50 de 1.327 pb. Para uma boa montagem, espera-se que pelo menos ~80 % dos *reads* sequenciados sejam utilizados, sendo que os *reads* não montados provavelmente correspondem a transcritos pouco expressos, com cobertura insuficiente para permitir a montagem, ou são leituras aberrantes ou de baixa qualidade (CONESA et al., 2016). O sequenciamento pareado foi bem-sucedido. Do conjunto de 27.755.477 leituras obtidas, foi atingida uma taxa de alinhamento geral de 97,6 %.

Além do alinhamento das leituras, uma das métricas utilizadas para avaliar a qualidade da montagem do transcriptoma é examinar o número de transcritos montados que aparentam estar completos em seu tamanho ou muito próximo disto. Para organismos referência, o processo é relativamente direto, enquanto que para organismos não modelo, onde não há um transcriptoma referência para ancorar a análise, pode ser utilizado um conjunto de dados de algum organismo proximalmente relacionado, ou em outros casos em situações mais genéricas, alinhar o transcriptoma montado contra todas as proteínas conhecidas e determinar o número de correspondências únicas do *top hit* que se alinham em mais de “X” % do seu comprimento. Nesse estudo, utilizamos a segunda alternativa e os resultados podem ser observados na **Tabela 11**.

Tabela 11. Métrica de avaliação da qualidade de montagem do transcriptoma relacionando o número de sequências com o percentual de correspondências únicas identificadas em proteínas conhecidas de bancos de dados públicos.

Cobertura percentual do <i>top hit</i>	Número de sequências	Acima da cobertura
100	2.956	2.956
90	737	3.693
80	563	4.256
70	590	4.846
60	639	5.485
50	801	6.286
40	1.020	7.306
30	1.586	8.892
20	2.478	11.370
10	1.857	13.227

Fonte: Acervo do Autor.

Foram encontradas 4.846 proteínas que correspondem a um único transcrito entre 70 e 100 % de cobertura de alinhamento com a respectiva proteína. Dessas, 2.956 proteínas apresentam mais de 90 % de cobertura de alinhamento. É possível separar o conjunto de dados da montagem em dois grupos, o primeiro representado por 6.286 transcritos com cobertura de alinhamento do *top hit* superior a 50 %, e o segundo, com 6.941 transcritos com cobertura entre 10 e 40 %.

Em seguida, com o programa TransDecoder (v 2.1.0), foram identificadas as ORFs completas, parciais nos sentidos 3' e 5', e internas. As ORFs completas correspondem a sequências que no peptídeo apresentam ambos os códons de iniciação e parada. A ORF parcial 5', significa que falta o códon de iniciação e presumivelmente parte do N-terminal. A ORF parcial 3' significa que falta o códon de parada e presumivelmente parte do C-terminal, e por fim, ORF interna que significa que o peptídeo é parcial em 3' e 5' (**Tabela 12**).

Tabela 12. Identificação das ORFs completas, parciais 3' e 5', e internas do transcriptoma hepático de *P. vivipara* expostos ao esgoto sanitário 33 % (v/v) via Illumina MiSeq.

Tipo de ORF	Sequências
Completa	9.352
5' parcial	5424
Interna	5.390
3' parcial	1.729
Total	21.895

Fonte: Acervo do Autor.

O resumo das métricas da montagem do transcriptoma *de novo* obtidos via Illumina MiSeq está apresentado na **Tabela 13**.

Tabela 13. Sumário dos transcritos e unigenes de *P. vivipara* montados *de novo* pelo software Trinity.

Métricas	Valores
Total de <i>reads</i> brutos	27.755.477
Total de <i>reads</i> filtrados	25.893.246
Q20 bases	25.893.246
Conteúdo GC	46,87 %
Total de sequências	54.285
Total de bases montadas	42.255.894
Tamanho médio dos transcritos	778 pb
N50	1.327 pb
Total de trinity 'genes':	43.685
Total trinity transcritos:	54.285
Maiores ORFs identificadas	21.895
ORFs completas	9.352

Q20 – Escore de qualidade de *base-calling*; ORFs – Fases de leitura aberta.

Fonte: Acervo do Autor.

Quando comparado ao transcriptoma montado via Ion Proton, a qualidade da montagem via Illumina MiSeq foi muito superior. Apesar de o número total de sequências obtidas no Ion Proton (120.277 das quais 91.478 são “unigenes”, isto é, clusters sem as isoformas) ser maior que no MiSeq, o tamanho em pb é maior nesse último (778 pb em média). O N50 foi superior no MiSeq, com 1.327 pb contra 141 pb do Ion Proton. Quando comparada a espécies do mesmo gênero, essa métrica também foi superior aos valores encontrados para *P. reticulata*, com N50 = 846 pb (FRASER et al., 2011), 832 e 1.295 pb (SAARISTO et al., 2017), e inferior quando comparadas à *P. latipinna*, *P. formosa* e *P. mexicana* com valores N50 de 2.339, 1.764 e 2.569 pb respectivamente (SCHEDINA et al., 2018).

Uma alternativa à estatística do tamanho contig N50 que pode ser considerada mais apropriada para os dados da montagem do transcriptoma é a estatística do ExN50. Este tipo de abordagem calcula o tamanho de contig N50 utilizando apenas os transcritos mais expressos, que representam uma determinada porcentagem (X %) do total de dados de expressão normalizados. Os dados obtidos desta análise estão plotados na **Tabela 14**, na qual a primeira coluna **Ex**, representa a expressão dentro do conjunto de dados do transcriptoma, a coluna **ExN50**, representa a métrica N50 em relação ao valor da expressão da primeira coluna, e por fim na última coluna, o **número de transcritos** representa quantas sequências fazem parte do conjunto de transcritos em determinada porcentagem da expressão.

Tabela 14. Estatística ExN50 da montagem *de novo* do transcriptoma hepático de *P. vivipara*.

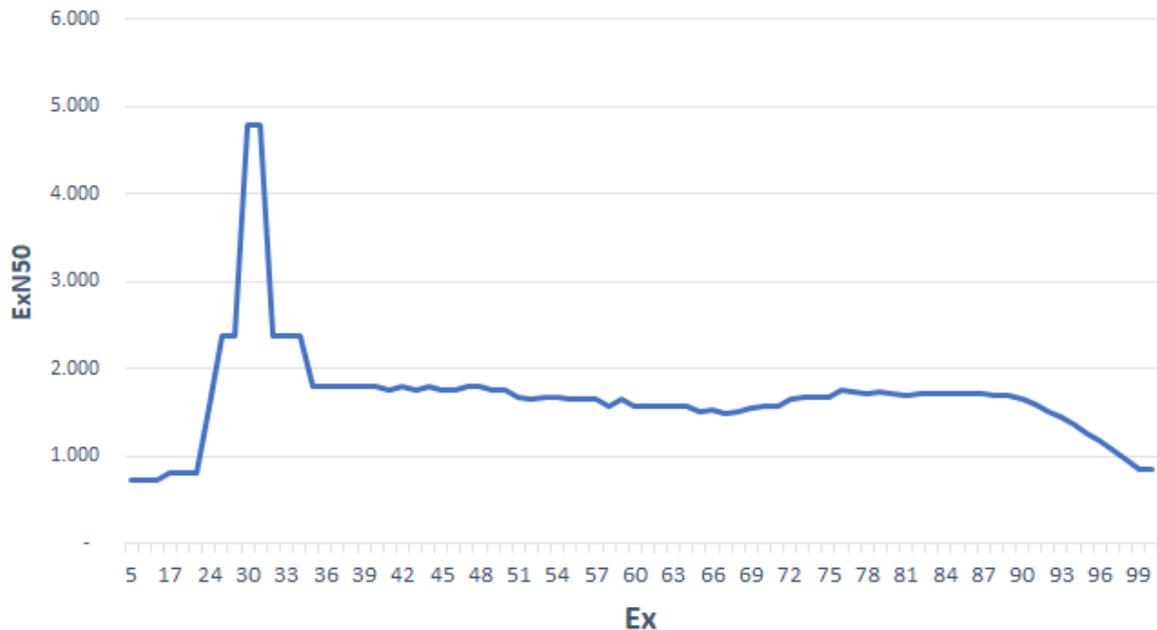
Ex	ExN50	nº de transcritos	Ex	ExN50	nº de transcritos
5	735	1	61	1.569	111
10	735	2	62	1.563	118
14	735	3	63	1.569	124
17	802	4	64	1.563	132
20	802	5	65	1.511	140
22	802	6	66	1.527	150
24	1.569	7	67	1.500	161
26	2.384	8	68	1.511	173
28	2.384	9	69	1.546	188
30	4.780	10	70	1.567	205
31	4.780	11	71	1.569	225
32	2.384	12	72	1.648	249
33	2.384	13	73	1.678	277
34	2.384	14	74	1.678	312
35	1.792	16	75	1.684	354
36	1.794	17	76	1.767	405
37	1.794	18	77	1.735	468
38	1.792	20	78	1.712	546
39	1.792	22	79	1.735	647
40	1.792	24	80	1.717	778
41	1.768	27	81	1.700	947
42	1.792	29	82	1.722	1.172
43	1.768	32	83	1.711	1.463
44	1.792	35	84	1.709	1.843
45	1.768	39	85	1.722	2.345
46	1.768	42	86	1.722	3.006
47	1.792	45	87	1.711	3.872
48	1.792	49	88	1.699	4.984
49	1.768	52	89	1.690	6.397
50	1.768	56	90	1.652	8.133
51	1.684	60	91	1.594	10.210
52	1.651	65	92	1.520	12.647
53	1.684	69	93	1.439	15.458
54	1.684	73	94	1.364	18.660
55	1.651	78	95	1.273	22.266
56	1.651	83	96	1.175	26.335
57	1.648	88	97	1.079	30.967
58	1.569	93	98	974	36.371
59	1.648	99	99	845	43.562
60	1.569	105	100	844	43.685

Ex – Expressão; ExN50 - Métrica N50 da montagem considerando "X" % da expressão total.

Fonte: Acervo do Autor.

Por exemplo, o EX90N50 foi de 1.652 pb (relativamente superior ao N50 de 1.327 pb da montagem total) com 8.133 transcritos, que representam apenas uma fração do número total de 43.685 transcritos. Também foi possível observar o maior pico de N50 próximo a 30 % da expressão com apenas 11 transcritos (**Figura 8**).

Figura 8. Perfil da Expressão Ex contra N50.



Fonte: Acervo do Autor.

6.4.2 Anotação do transcriptoma

Das 65.469 sequências de transcritos montados pelo Trinity para obtenção do transcriptoma hepático de *P. vivipara*, diferentes estratégias para a anotação funcional foram abordadas. Para este propósito, foi utilizado o programa Trinotate que possui diversas ferramentas integradas e cujos resultados obtidos estão exibidos na **Tabela 15**. Para a busca de proteínas semelhantes no banco de dados SwissProt, 10.538 (16,10 %) e 16.951 (25,89 %) sequências de transcritos apresentaram *hits* significativos utilizando blastx e blastp, respectivamente. A maioria das sequências anotadas contra esse banco de dados apresentaram *hits* em sequências de espécies modelo na seguinte ordem: *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Danio rerio* e *Rattus norvegicus*, e em seguida, distribuídos entre outras espécies incluindo diversos peixes teleósteos, répteis, aves e mamíferos.

Tabela 15. Resultados da anotação funcional do transcriptoma hepático de *P. vivipara* via Illumina MiSeq obtidos no programa Trinotate.

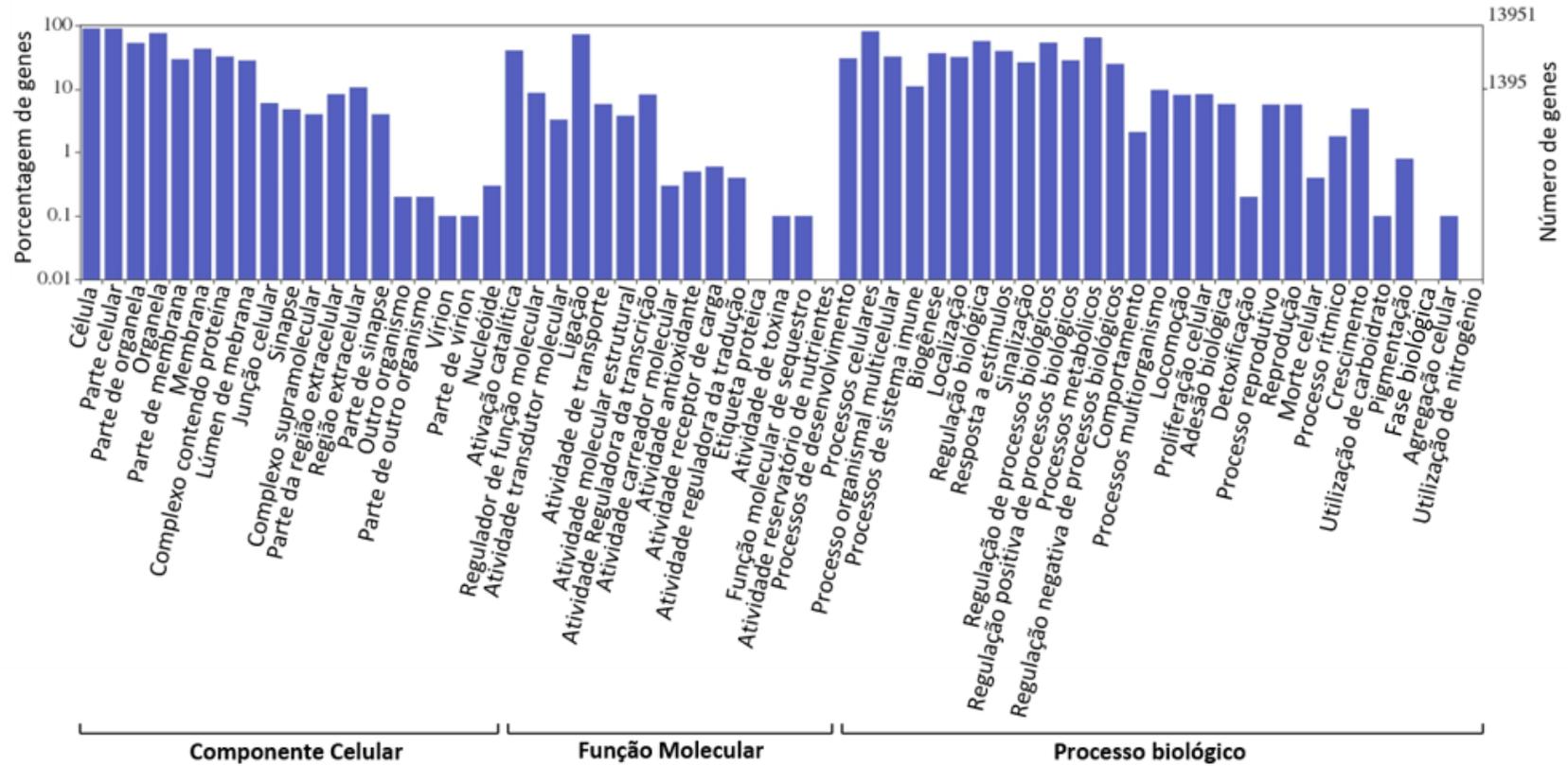
Métodos para anotação funcional / Banco de dados	Hits
Blastx / SwissProt	10.538 (16,10 %)
Blastp / SwissProt	16.951 (25,89 %)
HMMER / Pfam	13.654 (20,86 %)
eggNOG	16.090 (22,58 %)
KEGG	16.412 (25,07 %)
Termos GO associados ao blast	18.310 (27,97 %)
Termos GO associados ao Pfam	8.450 (12,91 %)
Hit em todos os critérios	1.855 (2,83 %)
Não anotados	29.403 (44,91 %)

Fonte: Acervo do Autor.

Para a busca por domínios de proteínas no banco Pfam pelo HMMER, 13.654 (20,86 %) transcritos apresentaram *hits* significativos. Os termos de ontologia gênica (GO) encontrados associados aos resultados de blast, corresponderam a 18.310 (27,97 %) transcritos, enquanto os relacionados ao banco Pfam foram 8.450 (12,91 %). Apenas 1.855 transcritos, menos de 3 % das sequências montadas, apresentaram *hits* significativos em todos os métodos avaliados, enquanto pouco mais de 44 % (29.403 transcritos) não apresentaram *hit* em nenhuma das sete metodologias. Possivelmente os transcritos que não puderam ser anotados podem ser pequenas sequências resultantes de erros de montagem ou ainda, transcritos desconhecidos.

A representação gráfica da anotação com os termos GO produzidas pelo WEGO (YE et al., 2006) está ilustrada na **Figura 9**. Os contigs anotados estão distribuídos em 59 categorias do GO dentro dos três níveis hierárquicos: 1) Componente celular, descrevendo a localização da proteína na célula; 2) Função molecular, descrevendo a atividade que uma determinada proteína desempenha no meio celular; 3) Processo biológico, que diz respeito a uma série de eventos realizados por uma ou mais funções celulares.

Figura 9. Classificação da ontologia gênica dos unigenes e distribuição das categorias GO atribuídas ao transcriptoma de *Poecilia vivipara*. Os transcritos foram classificados em três categorias: componentes celulares, funções moleculares e processos biológicos.



Fonte: Acervo do Autor.

Nessa análise foram encontradas ao todo 13.951 sequências com correspondências no banco de dados SwissProt para o transcriptoma hepático de *P. vivipara* em comparação ao transcriptoma (cérebro e corpo total) de *P. reticulata* que foram encontradas 22.872 sequências (FRASER et al., 2011). Com relação aos termos GO, para *P. reticulata*, foram encontrados 5.201 registros anotados para o termo componente celular, 9.120 para função molecular e 6.673 para processos biológicos (FRASER et al., 2011). Nesse estudo com *P. vivipara* foram encontrados 13.286 (35,1 %) registros anotados para componente celular, 12.558 (33,1 %) para processos biológicos e 12.043 (31,8 %) para função molecular. As categorias identificadas estão bem distribuídas e relativamente bem representadas, porém, termos como “célula”, “parte celular”, “organela”, “ligação”, “processos celulares”, “regulação biológica”, “resposta a estímulos”, “regulação dos processos biológicos” e “processos metabólicos”, são os mais prevalentes, o que pode nos indicar o importante papel do fígado no metabolismo do organismo como um todo.

Foram identificados diversos transcritos envolvidos em processos de biotransformação de fase I e II, atividade antioxidante, transportadores do tipo ABC (*Transportadores de cassetes de ligação ao ATP*) e receptores nucleares. Para a biotransformação de fase I, 510 transcritos foram identificados, sendo que 493 deles estão distribuídos entre as famílias e subfamílias dos *citocromos P450 1, 2, 3 e 4* (**Tabela 16**). Para a biotransformação de fase II, foram encontradas 38 sequências pertencentes a *GSTs*, 36 *UGTs* e 10 *SULTs*. Para enzimas envolvidas com atividade antioxidante, foram identificadas sete *peroxirredoxinas*, 30 *tiorredoxinas*, sete *GPx*, uma *CAT*, uma *GR* e sete *SODs*. Setenta e um transcritos identificados pertencem aos *transportadores ABCs* e 107 foram identificados como receptores nucleares. Muitos desses genes são de grande interesse para os estudos ecotoxicológicos e monitoramento ambiental por serem utilizados como biomarcadores de contaminação aquática e estresse oxidativo. A identificação destes genes possibilitará que novos trabalhos com *P. vivipara* sejam realizados, além de favorecer a escolha apropriada de cada gene para cada tipo de trabalho de exposição, ou monitoramento ambiental.

É importante ressaltar que anterior a esse trabalho, poucas sequências nucleotídicas (299) encontravam-se disponíveis no banco de dados do NCBI, sendo a maior parte resultante de sequências de marcadores de DNA nuclear e mitocondrial, e proteínas ribossomais (HO; PRUETT; LIN, 2016).

Tabela 16. Transcritos anotados pertencentes aos processos de biotransformação de fase I e II, transportadores nucleares do tipo ABC, receptores nucleares e com atividades antioxidantes.
Fonte: Acervo do Autor.

Função Biológica	Descrição do gene
Biotransformação de fase I	<i>Citocromo P450 1A1 (CP1A1)</i>
	<i>Citocromo P450 2A6 (CP2A6)</i>
	<i>Citocromo P450 2B4 (CP2B4)</i>
	<i>Citocromo P450 2D9 (CP2D9)</i>
	<i>Citocromo P450 2F2 (CP2F2)</i>
	<i>Citocromo P450 2G1 (CP2G1)</i>
	<i>Citocromo P450 2J1 (CP2J1)</i>
	<i>Citocromo P450 2J2 (CP2J2)</i>
	<i>Citocromo P450 2J3 (CP2J3)</i>
	<i>Citocromo P450 2J5 (CP2J5)</i>
	<i>Citocromo P450 2J6 (CP2J6)</i>
	<i>Citocromo P450 2K1 (CP2K1)</i>
	<i>Citocromo P450 2K3 (CP2K3)</i>
	<i>Citocromo P450 2K6 (CP2K6)</i>
	<i>Citocromo P450 2U1 (CP2U1)</i>
	<i>Citocromo P450 3A9 (CP3A9)</i>
	<i>Citocromo P450 3A19 (CP3AJ)</i>
	<i>Citocromo P450 3A30 (C330)</i>
	<i>Citocromo P450 3A40 (C340)</i>
	<i>Citocromo P450 3A56 (C356)</i>
	<i>Citocromo P450 4B1 (CP4B1)</i>
	<i>Citocromo P450 4V2 (CP4V2)</i>
	<i>Flavina contendo dimetilnilina monoxigenase 5 (FMO5)</i>
	<i>NADPH-quinona oxidoreductase 1 (NQO1)</i>
	<i>NADPH-quinona oxidoreductase 2 (NQO2)</i>
Biotransformação de fase 2	<i>Glutathione S-transferase A (GSTA)</i>
	<i>Glutathione S-transferase 3 (GSTA3)</i>
	<i>Glutathione S-transferase kappa 1 (GSTK1)</i>
	<i>Glutathione S-transferase Mi 1 (GSTM1)</i>
	<i>Glutathione S-transferase Mi 3 (GSTM3)</i>
	<i>Glutathione S-transferase ômega-1 (GSTO1)</i>
	<i>Glutathione S-transferase tetra-1 (GSTT1)</i>
	<i>Glutathione S-transferase tetra-3 (GSTT3)</i>
	<i>Glutathione S-transferase 3 microsomal (MGST3)</i>
	<i>UDP-glicuronosiltransferase 1-1 (UD11)</i>
<i>UDP-glicuronosiltransferase 1-2 (UD12)</i>	
	<i>UDP-glicuronosiltransferase 2A1 (UD2A1)</i>

Continuação Tabela 16.

Função Biológica	Descrição do gene
Biotransformação de fase 2	<i>UDP-glicuronosiltransferase 2A2 (UD2A2)</i>
	<i>UDP-glicuronosiltransferase 2A3 (UD2A3)</i>
	<i>UDP-glicuronosiltransferase 2B1 (UD2B1)</i>
	<i>UDP-glicuronosiltransferase 2B7 (UD2B7)</i>
	<i>UDP-glicuronosiltransferase 2B15 (UDB15)</i>
	<i>UDP-glicuronosiltransferase 2B20 (UDB20)</i>
	<i>UDP-glicuronosiltransferase 2B31 (UDB31)</i>
	<i>UDP-glicuronosiltransferase 2C1 (UD2C1)</i>
	<i>Sulfotransferase 1 (ST1S1)</i>
	<i>Sulfotransferase 3 (ST1S3)</i>
	<i>Sulfotransferase de tirosilproteína 1 (TPST1)</i>
<i>Sulfotransferase citosólica família 2B membro 1 (ST2B1)</i>	
<i>Sulfotransferase 1C1 (ST1C1)</i>	
Transportadores ABC	<i>Transportador ABC sub-família A membro 1 (ABCA1)</i>
	<i>Transportador ABC sub-família A membro 3 (ABCA3)</i>
	<i>Transportador ABC específico de retina (ABCA4)</i>
	<i>Transportador ABC sub-família B membro 6 (ABCB6)</i>
	<i>Transportador ABC sub-família B membro 7 (ABCB7)</i>
	<i>Transportador ABC sub-família B membro 8 (ABCB8)</i>
	<i>Transportador ABC sub-família B membro 9 (ABCB9)</i>
	<i>Transportador ABC sub-família B membro 10 (ABCB10)</i>
	<i>Bomba de exportação de sais biliares (ABCB11)</i>
	<i>Transportador ABC sub-família D membro 1 (ABCD1)</i>
	<i>Transportador ABC sub-família D membro 3 (ABCD3)</i>
	<i>Transportador ABC sub-família D membro 4 (ABCD4)</i>
	<i>Transportador ABC sub-família E membro 1 (ABCE1)</i>
	<i>Transportador ABC sub-família F membro 1 (ABCF1)</i>
	<i>Transportador ABC sub-família F membro 2 (ABCF2)</i>
	<i>Transportador ABC sub-família F membro 3 (ABCF3)</i>
	<i>Transportador ABC sub-família G membro 2 (ABCG2)</i>
	<i>Transportador ABC sub-família G membro 5 (ABCG5)</i>
	<i>Transportador ABC sub-família G membro 8 (ABCG8)</i>
	<i>Proteína de resistência a multidrogas 1 (MDR1)</i>
	<i>Proteína associada a resistência multidrogas 1 (MRP1)</i>
	<i>Proteína associada a multirresistência 2 (MRP2)</i>
	<i>Proteína associada a multirresistência 3 (MRP3)</i>
<i>Proteína associada a multirresistência 4 (MRP4)</i>	
<i>Proteína associada a multirresistência 7 (MRP7)</i>	
<i>Proteína associada a multirresistência 9 (MRP9)</i>	

Continuação Tabela 16.

Função Biológica	Descrição do gene
Receptores nucleares	<i>Receptor de andrógeno (ANDR)</i>
	<i>Receptor para aril hidrocarboneto (AHR)</i>
	<i>Receptor de estrogênio alfa (ESR1)</i>
	<i>Receptor de estrogênio beta (ESR2)</i>
	<i>Receptor do hormônio de crescimento (GHR)</i>
	<i>Receptor nuclear ROR-beta (RORB)</i>
	<i>Receptor de oxisteroides LXR-alfa (NR1H3)</i>
	<i>Receptor de oxisteroides LXR-beta (NR1H2)</i>
	<i>Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma alfa (PPARA)</i>
	<i>Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma delta (PPARD)</i>
	<i>Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PPARG)</i>
	<i>Receptor de pregnano X (PXR1)</i>
	<i>Receptor de ácido retinóico RXR-alfa-A (RXRAA)</i>
	<i>Receptor de ácido retinóico RXR-beta-A (RXRBA)</i>
	<i>Receptor de ácido retinóico RXR-gama-A (RXRGA)</i>
	<i>Receptor de ácido retinóico RXR-gama-B (RXRGB)</i>
	<i>Receptor do hormônio da tireoide alfa (THA)</i>
<i>Receptor do hormônio da tireoide beta (THB)</i>	
Enzimas antioxidantes	<i>Catalase (CAT)</i>
	<i>Glutaciona peroxidase 1 (GPX1)</i>
	<i>Glutaciona peroxidase 4 (GPX4)</i>
	<i>Glutaciona peroxidase 6 (GPX6)</i>
	<i>Glutaciona peroxidase 7 (GPX7)</i>
	<i>Glutaciona peroxidase 8 (GPX8)</i>
	<i>Glutaciona redutase (GSHR)</i>
	<i>Superóxido dismutase [Cu-Zn] extracelular (SODE)</i>
	<i>Superóxido dismutase [Cu-Zn] (SODC)</i>
	<i>Superóxido dismutase [Mn] (SODM)</i>
	<i>Tiorredoxina redutase 2 (TRXR2)</i>
	<i>Tiorredoxina redutase 3 (TRXR3)</i>
	<i>Proteína do tipo tiorredoxina 1 (TXNL1)</i>
	<i>Proteína do tipo tiorredoxina 4B (TXN4B)</i>
	<i>Peroxirredoxina-1 (PRDX1)</i>
<i>Peroxirredoxina-2 (PRDX2)</i>	
<i>Peroxirredoxina-3 (PRDX3)</i>	
<i>Peroxirredoxina-4 (PRDX4)</i>	
<i>Peroxirredoxina-5 (PRDX5)</i>	
<i>Peroxirredoxina-6 (PRDX6)</i>	

6.5 COMPARATIVO ENTRE OS TRANSCRIPTOMAS

O sequenciamento de alto rendimento de transcriptomas (RNA-Seq) abriu o caminho para estudar as informações genéticas e funcionais armazenadas em qualquer organismo em uma escala e velocidade sem precedentes (CONESA et al., 2016; HAAS et al., 2013). O baixo custo aliado a protocolos rápidos e de alto rendimento na geração de dados permitiram aos pesquisadores delinear o transcriptoma de referência de diversas espécies não-modelo, possibilitando aplicações a jusante, como alinhamento, filogenética, construção de marcadores (HAAS et al., 2013), elucidação de mecanismos de ação de xenobióticos (COLLI-DULA et al., 2018), ferramenta de estudos epidemiológicos (FERNANDEZ-CASSI et al., 2018), vias metabólicas, SNPs, entre outros (MEHINTO et al., 2012).

Com esta premissa de baixos custos, alto rendimento e velocidade na geração dos dados, algumas empresas investiram no desenvolvimento das plataformas e tecnologia de sequenciadores de nova geração. Podemos destacar quatro instrumentos que podem ser classificados como integrantes da tecnologia de sequenciamento de segunda geração: O 454 GS FLX, o Ion Torrent, o SOLiD e Illumina (MEHINTO et al., 2012). Não obstante, nos últimos anos, os fornecedores de sequenciadores de leituras curtas de alta capacidade foram reduzidos a dois fabricantes: Illumina, cuja tecnologia é baseada no sequenciamento por síntese, e Thermo Fisher Scientific, com tecnologia de sequenciamento semicondutores Ion Torrent (MARINE et al., 2019).

Com o surgimento do sequenciamento de terceira geração como o Pacific Biosystems (PacBio) com tecnologia de sequenciamento de molécula única em tempo real (SMRT) e sequenciamento em nanoporo pelo MInION da Oxford Nanopore Technologies, as etapas de amplificação no preparo das bibliotecas foi dispensado, permitindo o sequenciamento de *reads* muito maiores que os obtidos em tecnologias de segunda geração, e o sequenciamento de moléculas únicas. Estes equipamentos ainda não são muito acessíveis, porém prometem sequenciamentos mais rápidos e eficientes de *reads* longos (BLEIDORN, 2016; VASUDEVAN et al., 2019). Entretanto, acredita-se que nos próximos poucos anos o sequenciamento de segunda geração permanecerá como o estado da arte para pesquisa evolutiva nos campos da genômica populacional, filogenética e metagenômica (BLEIDORN, 2016).

Nesse trabalho, foram realizadas duas montagens *de novo* do transcriptoma hepático de *P. vivipara* em duas plataformas: Ion Proton (Ton Torrent) e Illumina MiSeq, e os principais resultados estão sumarizados na **Tabela 17**.

Comparando-se os dados dos sequenciamentos, a quantidade de leituras obtidas para a montagem do transcriptoma via Ion Proton foi 10 vezes maior que a obtida no sequenciamento do Illumina MiSeq. Do mesmo modo, o número de sequências montadas foi superior, com 120.277 (Ion Proton) contra 54.285 (Illumina MiSeq). Entretanto, o número de bases montadas foi aproximadamente 2,3 vezes maior na montagem Illumina MiSeq, além de uma maior média de tamanho dos transcritos (148 contra 778 pb) e maior valor de N50 (141 contra 1.327 pb).

Tabela 17. Comparação das métricas dos transcritos e unigenes de *P. vivipara* montados *de novo* pelo software Trinity via Ion Proton e Illumina MiSeq.

Métricas	Ion Proton	Illumina MiSeq
Total de <i>reads</i> brutos	289.709.168	27.755.477
Total de <i>reads</i> filtrados	237.601.956	25.893.246
Q20 bases	237.601.956	237.601.956
Conteúdo GC	48,06 %	46,87 %
Total de sequências	120.277	54.285
Total de bases montadas	17.876.789	42.255.894
Tamanho médio dos transcritos	148 pb	778 pb
N50	141 pb	1.327 pb
Total de trinity 'genes':	91.478	43.685
Total trinity transcritos:	120.277	54.285
Maiores ORFs identificadas	2.726	21.895
ORFs completas	408	9.352

Q20 – Escore de qualidade de *base-calling*; ORFs – Fases de leitura aberta.

Fonte: Acervo do Autor.

Com essas métricas pode-se perceber que a qualidade da montagem *de novo* via Illumina MiSeq foi superior. Além desses dados em relação a tamanhos de transcritos, a identificação de regiões codificantes dá um peso maior para a comparação. Dos 91.478 genes encontrados via Ion Proton, apenas 2.726 possuem ORFs, enquanto na montagem Illumina MiSeq, pouco menos da metade dos 54.285 genes encontrados apresentam ORFs.

Até o ano de 2013 não havia relatos na literatura sobre o sequenciamento genômico ou transcriptômico do peixe zebra (*D. rerio*), uma espécie modelo, utilizando Ion Torrent. Atribuiu-se o fato ao entrave técnico a respeito do pequeno tamanho dos *reads* e baixa

profundidade comparados a outras tecnologias (BAKER; HARDIMAN, 2014). Entretanto, a tecnologia foi utilizada por Porseryd e colaboradores (2018) investigando as alterações transcriptômicas em testículos de *D. rerio* expostos ao EE₂, na montagem do transcriptoma sacular do peixe *Porichthys notatus* (FABER-HAMMOND et al., 2015), na busca por marcadores de desenvolvimento do bagre listrado *Pangasianodon hypophthalmus* (THANH et al., 2015), caracterização do transcriptoma hepático de *Basilichthys microlepidotus* (VEGA-RETTTER; VÉLIZ, 2014).

Apesar de os primeiros trabalhos utilizando a plataforma Ion Torrent surgirem ao final de 2014 para a espécie modelo *D. rerio*, e as demais citadas, notavelmente a qualidade das montagens ficam prejudicadas por conta dos *reads* curtos. No estudo com peixe zebra, não há relato da métrica tamanho de contig N50, pois os *reads* foram mapeados diretamente no genoma da espécie (PORSERYD et al., 2018), porém para *P. notatus*, *P. hypophthalmus* e *B. microlepidotus*, os valores de tamanho de contig N50 foram de 399; 506 e 653 pb, respectivamente (FABER-HAMMOND et al., 2015; THANH et al., 2015; VEGA-RETTTER; VÉLIZ, 2014).

Quail e colaboradores (2012a) compararam as plataformas de sequenciadores NGS Ion Torrent e Illumina, e segundo os autores, embora os dados gerados usando a plataforma Ion Torrent possuam uma taxa de erro bruta maior (~ 1,8 %) do que os dados da Illumina (<0,4 %), desde que haja cobertura suficiente, a representação e a capacidade de encontrar SNPs são muito parecidas entre essas tecnologias com mais positivos verdadeiros sendo chamados nos dados Ion Torrent, mas muito menos falsos positivos nos dados de Illumina. Ainda concluem que ambos os sequenciadores são bastante semelhantes em termos de utilidade e facilidade de fluxo de trabalho.

Entretanto, um dos problemas encontrados para a utilização da plataforma Ion Torrent é justamente o viés na cobertura do genoma, principalmente em genomas ricos em AT. Foi descoberto que a enzima utilizada para a amplificação dos fragmentos durante a preparação das bibliotecas para NGS pode ter uma influência significativa para o viés (QUAIL et al., 2012b). Como na tecnologia utilizada pelo Ion Proton há duas etapas de amplificação, sendo a primeira na construção da biblioteca, e a segunda na preparação do *template* (PCR em emulsão), possivelmente este pode ser uma das causas do viés observado (QUAIL et al., 2012a).

Outro percalço de se utilizar o sequenciamento Ion Torrent especificamente para montagem de transcriptomas sem referências, é que a maioria dos montadores foram desenvolvidos anteriormente à introdução da plataforma e os algoritmos utilizados nos programas são largamente baseados nos dados gerados no Illumina (LAHENS et al., 2017). Apesar de o Trinity oferecer suporte oficial apenas aos dados de RNA-Seq da Illumina, estão sendo feitos esforços para explorar o uso de leituras de sequenciamento de transcrição gerados em outras tecnologias (HAAS et al., 2013).

Um dos maiores problemas encontrados para a montagem *de novo* via Ion Proton nesse estudo foi a grande variedade de tamanho das leituras. Apesar das desvantagens da metodologia (Ion Proton) quando comparadas com a tecnologia Illumina, este estudo publicou o primeiro transcriptoma de *P. vivipara*, (PIAZZA et al., 2019).

6.6 TRANSCRIÇÃO GÊNICA qPCR

6.6.1 Teste dos genes normalizadores

Os genes testados obtiveram resultados dentro dos limites estabelecidos de eficiência entre 95 e 105 %, coeficiente de correlação R^2 maior que 0,97 e formação de um único produto de PCR, tornando-os aptos para as análises de expressão diferencial. O gene que codifica para *Zona Pelucida* (ZP) foi excluído das análises por apresentar discrepâncias na transcrição entre as amostras do mesmo grupo e em grupos diferentes, R^2 menor que 0,9 e formação de mais de um produto de PCR.

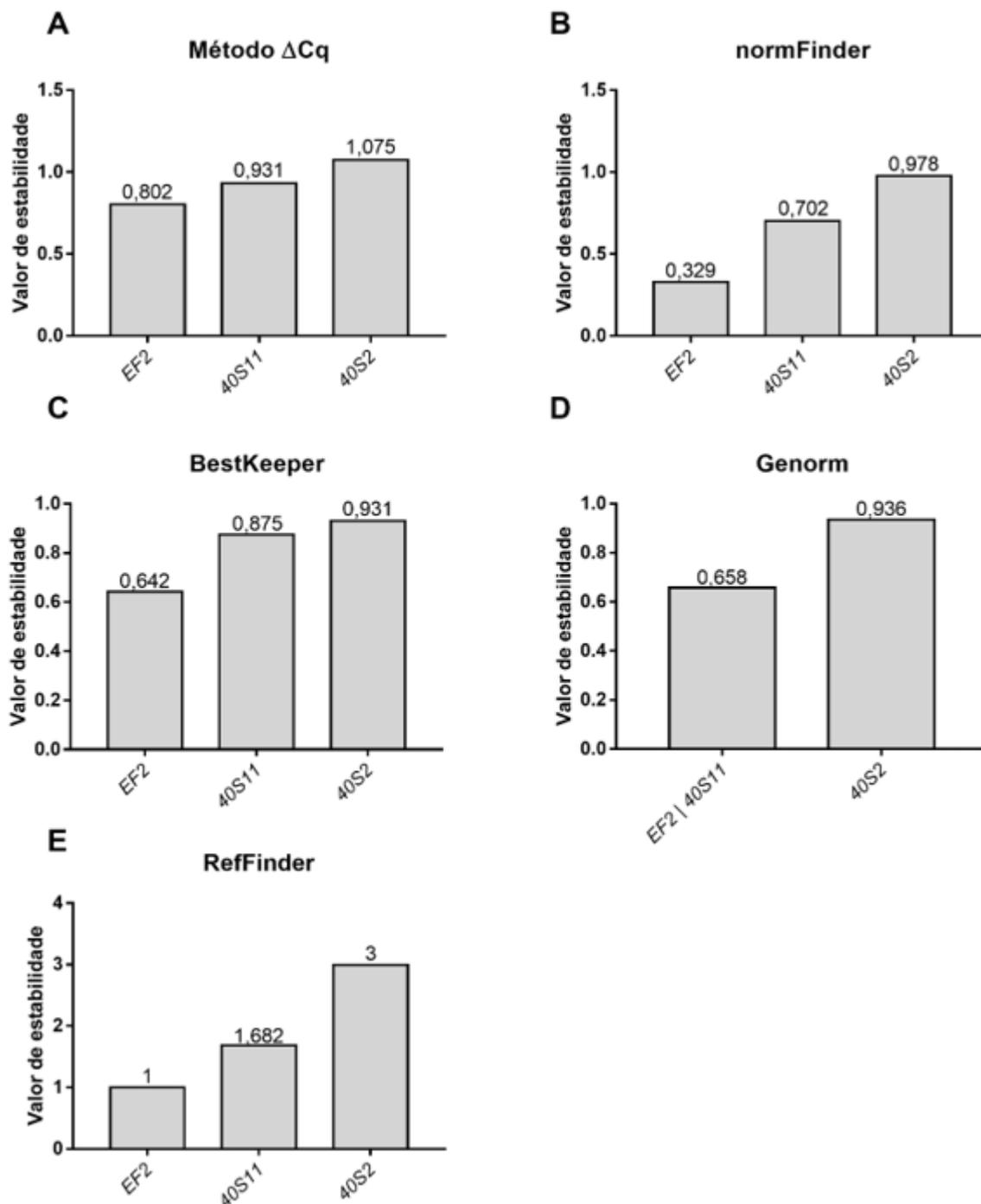
Para a normalização, foram testados genes constitutivos porém, nos últimos anos está cada vez mais claro que não existe um único gene que seja expresso constitutivamente em todos os tipos de células e em condições experimentais diversas, implicando que cada gene referência precisa ser verificado em cada experimento (ANDERSEN; JENSEN; ØRNTOFT, 2004). Desta forma, os transcritos de *EF2*, *40S2* e *40S11* foram testados quanto a estabilidade do gene para serem utilizados como genes referência utilizando a ferramenta RefFinder (XIE et al., 2012) para os dois períodos de exposição. A análise do RefFinder compara os métodos de ΔCq , BestKeeper, normFinder e Genorm e ranqueia os candidatos a gene referência.

Na análise após 24 horas de exposição, a estabilidade dos transcritos pode ser observada na **Figura 10**, na qual os menores valores representam uma maior estabilidade. O

gene mais estável foi *EF2* seguido por *40S11*, e o menos estável foi *40S2*. As médias geométricas dos valores ranqueados foram 1; 1.682 e 3 respectivamente.

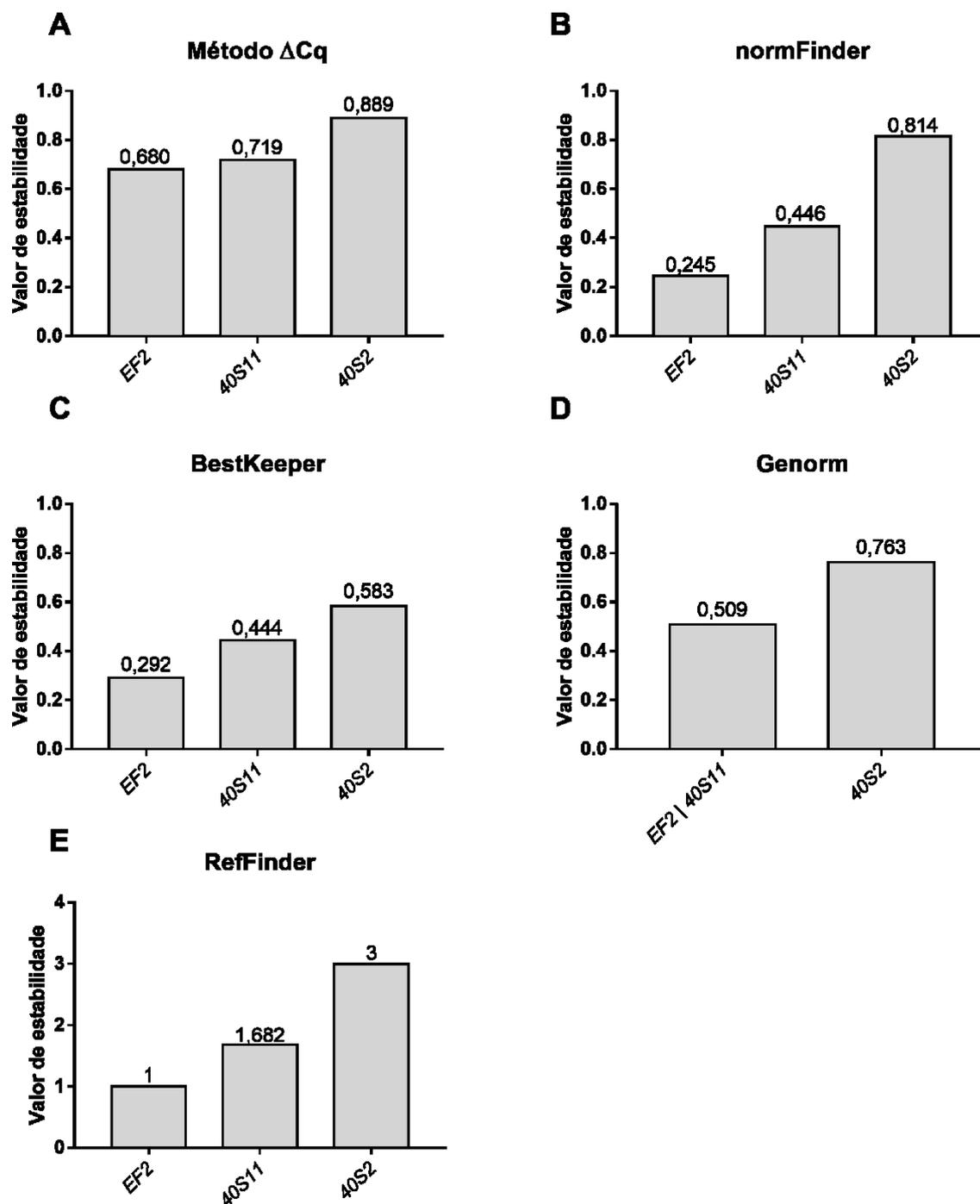
Para os transcritos após 96 horas de exposição, o ranqueamento foi semelhante ao encontrado em 24 h: *EF2* seguido por *40S11* e *40S2* (**Figura 11**). Comparativamente, a estabilidade dos genes candidatos foi maior após 96 h de exposição. Os três genes testados não apresentaram diferenças significativas em suas transcrições em relação aos grupos experimentais, porém, o gene *EF2* que apresentou a maior estabilidade neste estudo acabou por ser escolhido e utilizado para normalizar os genes alvo pelo método $\Delta\Delta Cq$ (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008).

Figura 10. Análise da estabilidade da transcrição gênica dos genes referência *fator de alongação 2* (EF2), *proteína ribossomal 40S S2* (40S2) e *proteína ribossomal 40S S11* (40S11) após 24 h de exposição ao esgoto sanitário 33 %. Os valores de estabilidade dos genes candidatos foram calculados pelo método ΔCq (A), normFinder (B), BestKeeper (C), Genorm (D) e RefFinder (E). Valores menores indicam maior estabilidade da transcrição.



Fonte: Acervo do Autor.

Figura 11. Análise da estabilidade da transcrição gênica dos genes referência *fator de alongação 2 (EF2)*, *proteína ribossomal 40S S2 (40S2)* e *proteína ribossomal 40S S11 (40S11)* após 96 h de exposição ao esgoto sanitário 33 %. Os valores de estabilidade dos genes candidatos foram calculados pelo método ΔCq (A), normFinder (B), BestKeeper (C), Genorm (D) e RefFinder (E). Valores menores indicam maior estabilidade da transcrição.



Fonte: Acervo do Autor.

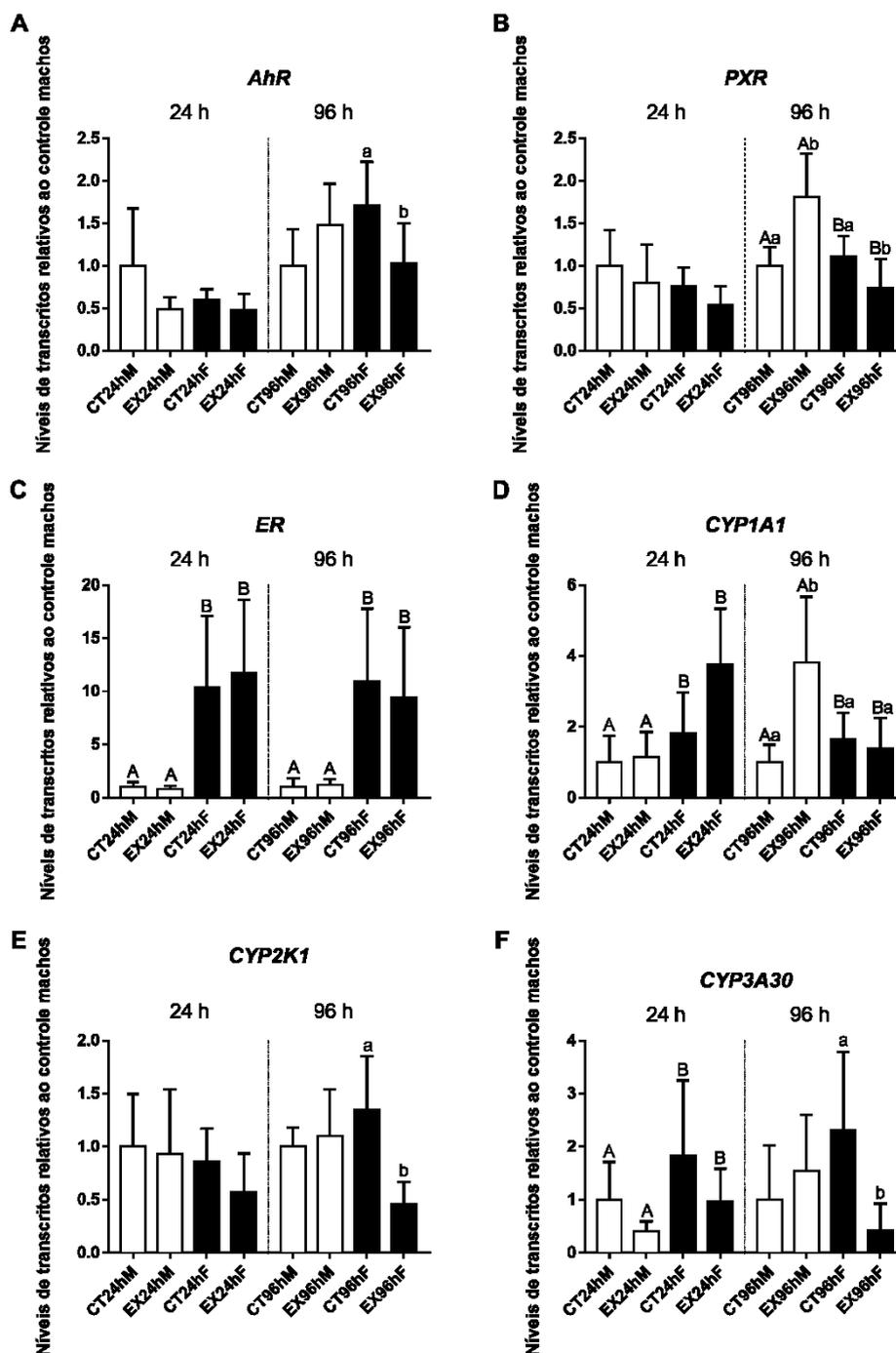
6.6.2 Transcrição dos genes de interesse

Os genes alvo escolhidos para este estudo codificam diferentes fatores de transcrição como receptores nucleares (NRs) e de xenobióticos (XRs) e genes associados com mecanismos de biotransformação, defesa antioxidante e transportadores.

Os receptores nucleares atuam como sensores de sinalização intra e extracelular desempenhando um papel crucial no controle do desenvolvimento biológico, diferenciação, homeostase e proteção contra estresse induzido por xenobióticos, enquanto os receptores endócrinos como o receptor de estrógeno (ER), são responsivos a hormônios esteroides (LI; WANG, 2010). Muitos destes receptores exibem uma capacidade de ligação a xenobióticos promíscua e funcionam como sensores de subprodutos tóxicos derivados do metabolismo de químicos endógenos e exógenos apresentando papéis importantes em endocrinologia. Portanto, os receptores de xenobióticos são capazes de regular a ativação transcricional de genes que codificam enzimas metabolizadoras de drogas de fase I e II, bem como a absorção e efluxo de transportadores (LI; WANG, 2010) e servem como alvos potenciais para químicos ambientais com capacidade de desregulação endócrina (BURNETT et al., 2007). Nesse estudo, foram escolhidos para análise os genes dos receptores: *aryl hidrocarboneto (AhR)*, *receptor pregnano x (PXR)* e *receptor de estrógeno (ER)*; os genes de biotransformação de fase I: *CYP1A*, *CYP2K1*, *CYP3A30*, *NQO1*; biotransformação de fase II: *GSTa3*, *GSTmu*, *ST1C1*, *UGT1A1*; defesa antioxidante: *SOD*; transportadores: *MRP2*, *ABCC1*, *MDR1* e genes relacionados ao sistema endócrino: *SOX9* e *VIT*.

O gene *AhR* não apresentou diferenças significativas após 24 h de exposição, entretanto, após 96 h foi observado um efeito de interação ($F(1,20) = 14,5$; $p = 0,0011$) no qual a exposição ao esgoto afeta os peixes de maneira distinta ocasionando o aumento da transcritos em machos enquanto a transcrição em fêmeas não é afetada. Foi observada diferença estatística em fêmeas (controle *versus* expostas). Uma observação interessante para o gene *AhR*, é que em 24 horas de exposição, os níveis transcricionais são menores em machos expostos, e em ambos os grupos de fêmeas, todos em relação ao grupo controle machos (todos sem diferença estatística), e após 96 horas de exposição, observa-se um efeito inverso. Os transcritos aumentam em machos expostos, e nas fêmeas controle e expostas, em relação ao grupo controle machos (**Figura 12A**).

Figura 12. Transcrição gênica dos receptores nucleares e fase I de biotransformação em fígados de peixes *P. vivipara* machos e fêmeas expostos ao esgoto sanitário 33 % por 24 h e 96 h e os seus respectivos grupos controle. Os níveis dos transcritos dos genes *AhR*, *PXR*, *ER*, *CYP1A1*, *CYP2K1* e *CYP3A30* estão normalizados pelo gene referência *EF2* e relativizados pelo grupo controle machos do seu respectivo período de exposição. Os dados estão apresentados em média \pm desvio padrão. Letras maiúsculas diferentes representam diferença significativa para o fator sexo. Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa entre os grupos no mesmo sexo ($p < 0,05$).



Fonte: Acervo do Autor.

Na **Figura 12B** podem ser observados os níveis de transcrição do gene *PXR*. Após 24 h não há diferenças significativas, apesar da menor transcrição de todos os grupos quando comparados ao grupo controle machos. Em 96 h de exposição observa-se diferenças significativas para o fator sexo ($F(1,19) = 11,45$, $p = 0,0031$) e interação entre tratamento e sexo ($F(1,19) = 24,01$, $p < 0,0001$): fêmeas e machos respondem de maneira distinta à exposição. Enquanto machos expostos apresentam um aumento da transcrição de *PXR*, nas fêmeas expostas, ocorre uma diminuição. O grupo com maior transcrição gênica foi o dos machos expostos, que são diferentes estatisticamente com 1,8 vez mais transcritos que machos controle. As fêmeas expostas apresentaram a menor transcrição, sendo 1,5 vez significativamente menor que as fêmeas do grupo controle.

Para o *receptor de estrógeno (ER)*, as maiores transcrições foram para o grupo das fêmeas (controle e expostas) após 24 h, cujas transcrições foram cerca de 12,4 vezes superiores ao grupo dos machos (controle e exposto), conforme demonstrado na **Figura 12C**. Foi observado um efeito significativo do fator sexo ($F(1,20) = 18,45$, $p = 0,0004$). O perfil de transcrição foi bastante semelhante após 96 horas de exposição. As fêmeas apresentaram aproximadamente 9,2 vezes (em média) mais transcritos que os machos, considerando-se controles e expostos em conjunto. Como observado em 24 horas, após 96 h de exposição, o fator sexo foi significativo ($F(1,19) = 16,13$, $p = 0,0007$) (**Figura 12C**).

Quanto ao sistema de biotransformação de fase I, o gene *CYP1A1* apresentou diferenças para o fator sexo ($F(1,19) = 8,623$, $p = 0,0085$) após 24 h de exposição. As fêmeas apresentaram uma maior taxa de transcrição, em relação aos machos (**Figura 12D**). Após 96 horas, a transcrição de *CYP1A1* foi significativamente diferente para o fator sexo ($F(1,20) = 5,913$, $p = 0,0246$), sendo maior em machos, para o fator tratamento $F(1,20) = 6,996$, $p = 0,0155$, onde o esgoto foi capaz de aumentar a transcrição nos grupos expostos; e também houve um efeito de interação entre os fatores sexos e tratamento, com um valor de F de $(1,20) = 15,7$, e $p = 0,0008$. Apesar de o esgoto alterar a transcrição dos peixes expostos, os animais respondem de maneira distinta. Em machos expostos, a transcrição é aumentada significativamente enquanto em fêmeas na mesma condição, não há alteração da transcrição. Para o gene *CYP2K1*, não houve diferenças significativas em 24 horas de exposição, porém, após 96 h, foram observadas alterações na transcrição para os efeitos do tratamento ($F(1,20) = 5,593$, $p = 0,0184$) e interação entre tratamento e sexo ($F(1,20) = 10,51$, $p = 0,0041$). Houve uma inibição na transcrição das fêmeas do grupo exposto de aproximadamente 2,9 vezes em

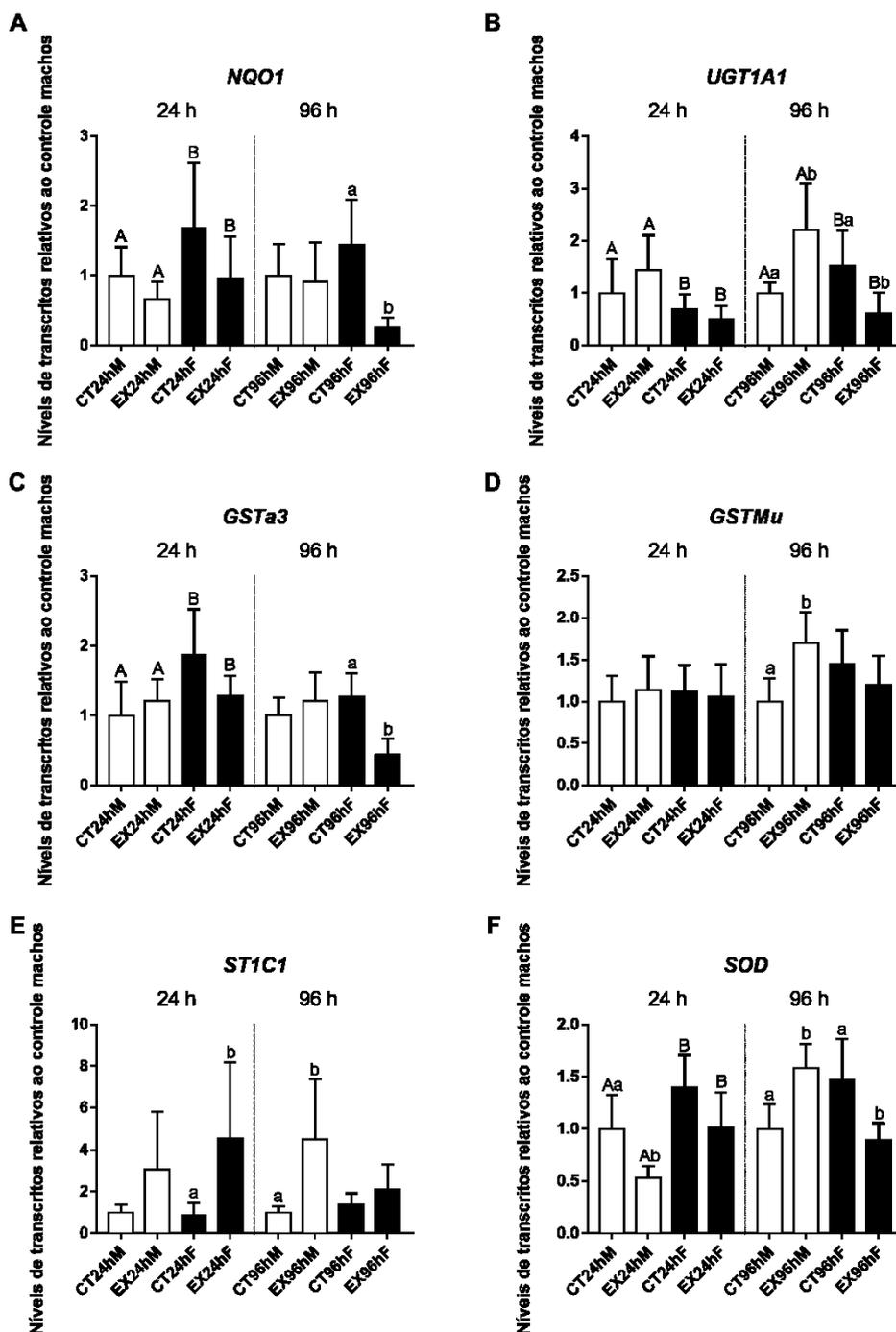
relação ao seu controle, enquanto machos não apresentam alterações significativas (**Figura 12E**).

Para os transcritos de *CYP3A30*, houve apenas diferença estatística em relação ao fator sexo ($F(1,20) = 5,275$, $p = 0,0326$) após 24 horas de exposição, onde as fêmeas em geral apresentam mais transcritos que machos. Em 96 h de exposição foi observada interação entre os efeitos sexo e tratamento ($F(1,20) = 7,022$, $p = 0,0154$). O esgoto sanitário diminui a transcrição de fêmeas expostas sem afetar significativamente os machos do mesmo grupo (**Figura 12F**).

Concernente ao gene *NQO1* que codifica para a enzima de biotransformação de fase I NADPH quinona oxidoredutase 1, após 24 h de exposição, o fator sexo apresentou diferenças significativas ($F(1,20) = 5,487$, $p = 0,0296$). Fêmeas apresentaram maior transcrição (**Figura 13A**). Após 96 horas de exposição, a transcrição dos machos se manteve similar nos animais do grupo controle e no grupo submetido ao esgoto, enquanto a transcrição das fêmeas controle permaneceu elevada e maior que os demais grupos. As fêmeas do grupo exposto apresentaram diminuição da transcrição, resultando em uma diferença de aproximadamente 5,4 vezes em relação ao seu grupo controle. Frente aos resultados, ficaram evidentes os efeitos do tratamento com um valor de $F(1,20) = 9,243$ e $p = 0,0065$, e interação do tratamento com sexo ($F(1,20) = 6,722$, $p = 0,0174$).

Os genes analisados que codificam para enzimas de biotransformação de fase II estão apresentados na **Figura 13 (B, C, D e E)**. O gene da *UGT1A1*, **Figura 13B**, apresentou diferenças significativas para o fator sexo ($F(1,20) = 8,127$, $p = 0,0099$) após 24 h de exposição. Os machos apresentaram mais transcritos do que as fêmeas. Após 96 horas foram observados efeitos para o fator sexo ($F(1,20) = 5,603$, $p = 0,0281$) e interação entre os fatores sexo e tratamento ($F(1,20) = 20,22$, $p = 0,0002$). Machos expostos apresentam 2,2 vezes mais transcritos que o seu respectivo controle enquanto fêmeas expostas apresentam 2,5 vezes menos transcritos que as fêmeas do grupo controle.

Figura 13. Transcrição dos genes de fase I e II de biotransformação e defesa antioxidante em fígados de peixes *P. vivipara* machos e fêmeas expostos ao esgoto sanitário 33 % por 24 h e 96 h e os seus respectivos grupos controle. Os níveis dos transcritos dos genes *NQO1*, *UGT1A1*, *GSTa3*, *GSTMu*, *ST1C1* e *SOD* estão normalizados pelo gene referência *EF2* e relativizados pelo grupo controle machos do seu respectivo período de exposição. Os dados estão apresentados em média \pm desvio padrão. Letras maiúsculas diferentes representam diferença significativa para o fator sexo. Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa entre os grupos no mesmo sexo ($p < 0,05$).



Fonte: Acervo do Autor.

A transcrição hepática dos peixes para o gene *GSTa3* após 24 horas apresentou diferenças para sexo ($F(1,20) = 6,136$, $p = 0,0223$), sendo que fêmeas apresentaram mais transcritos que machos. Apesar de as fêmeas apresentarem maior transcrição, houve interação dos fatores sexo e tratamento ($F(1,20) = 4,545$, $p = 0,0456$), no qual o efeito da exposição ao esgoto resultou na diminuição da transcrição apenas nas fêmeas. Em 96 h de exposição, observa-se uma transcrição semelhante entre grupos exceto para as fêmeas expostas, que apresentaram uma inibição significativa de 2,8 vezes em relação ao seu controle. Houve diferenças significativas para o efeito do tratamento ($F(1,20) = 5,651$, $p = 0,0275$) e interação entre exposição ao esgoto e sexo dos animais ($F(1,20) = 15,7$, $p = 0,0008$) semelhante ao ocorrido em 24 h (**Figura 13C**). Para a isoforma *GSTmu*, enquanto em 24 h não foram observadas diferenças transcricionais além do basal, em 96 h pode-se perceber um aumento em todos os grupos, sendo que estatisticamente, há diferença no grupo de machos entre controle e expostos que tiveram transcrição 1,7 vez maior, além de um efeito de interação ($F(1,20) = 11,53$, $p = 0,0029$) com aumento da transcrição de machos sem afetar fêmeas dos grupos expostos ao esgoto sanitário 33 % (**Figura 13D**).

O gene que codifica para sulfotransferase 1C, (*STIC1*) apresentou maiores transcrições hepáticas nos peixes dos grupos expostos com 3 e 4,5 vezes mais transcritos em machos e fêmeas respectivamente quando comparados aos seus respectivos controles de mesmo sexo, tornando evidente o efeito do tratamento ($F(1,19) = 8.533$, $p = 0,0088$) (**Figura 13E**). Entretanto, a diferença estatística é apenas apontada para o grupo das fêmeas. Após 96 horas de exposição, os machos expostos apresentaram a maior transcrição, sendo 4,5 vezes maior que o grupo de machos controle (**Figura 13E**). O efeito da exposição ao esgoto é significativo ($F(1,20) = 9,404$, $p = 0,0061$) e demonstrou interação ($F(1,20) = 5,089$, $p = 0,0354$). Apesar do fator sexo não afetar o resultado, os peixes expostos respondem ao tratamento em diferentes proporções resultando em um aumento da transcrição em machos superior àquela observada em fêmeas.

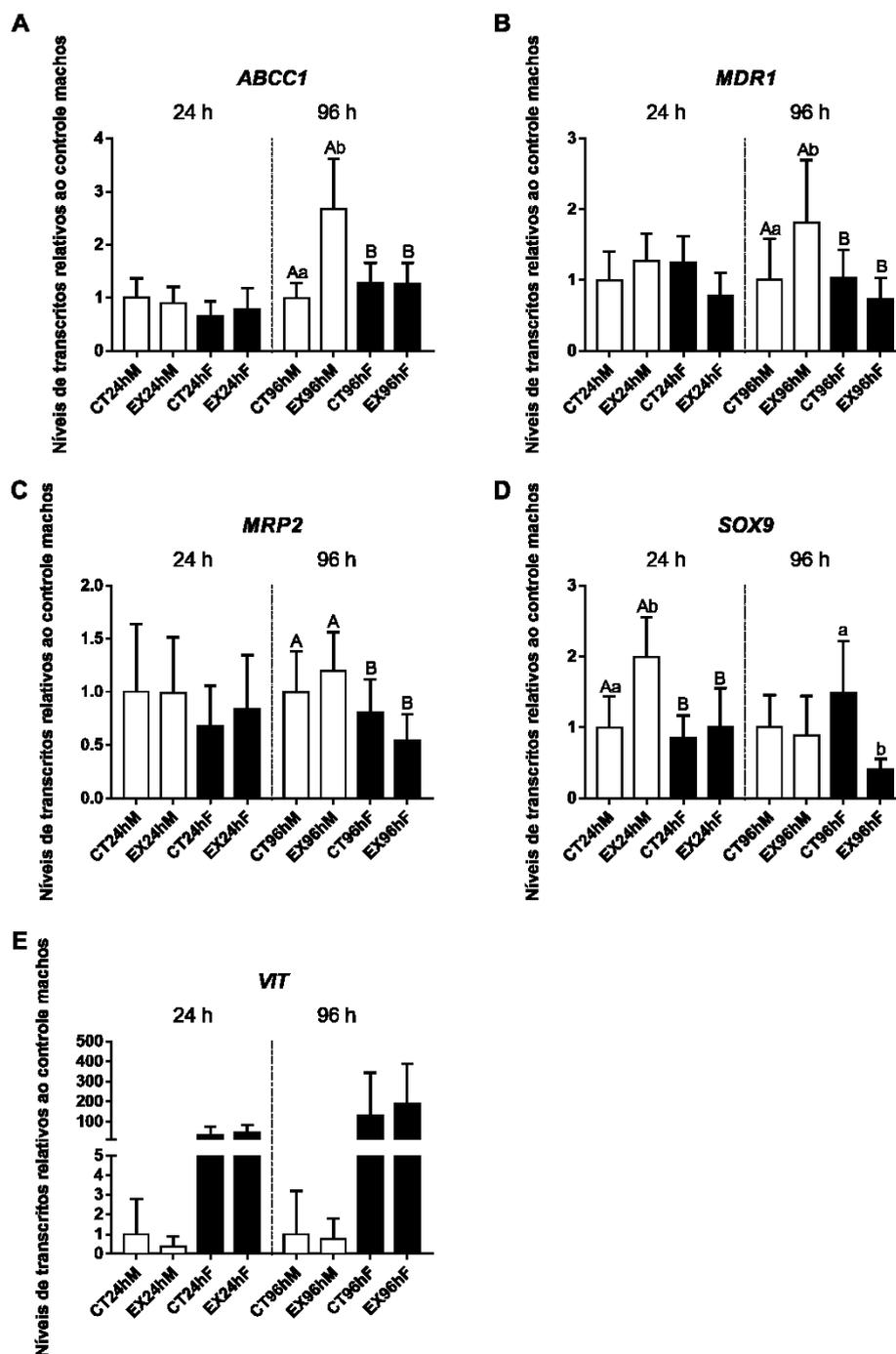
Com relação a *superóxido dismutase*, após 24 h, foram observados efeitos significativos para o fator sexo ($F(1,20) = 17,56$, $p = 0,0005$), e para o tratamento ($F(1,20) = 10,94$, $p = 0,0035$), resultando na diminuição da transcrição dos grupos expostos em relação aos seus respectivos controles. As fêmeas apresentaram uma maior transcrição de *SOD*, sendo 1,6 vez maior que os machos. Após 96 h ocorreu um efeito significativo de interação entre

tratamento e sexo ($F(1,20) = 30,42$, $p = 0,0001$). Os machos expostos apresentaram um aumento da transcrição, com 1,6 vez mais transcritos que o seu controle, enquanto as fêmeas expostas apresentaram uma menor transcrição (1,6 vez menor) em relação ao seu respectivo grupo controle (**Figura 13 F**).

A transcrição dos genes associados ao transporte de endobióticos e xenobióticos estão apresentadas na **Figura 14**. Com relação ao gene *ABCC1*, não foram observadas diferenças significativas em 24 h de exposição, porém, após 96 h, os machos apresentaram a maior transcrição. Além disso, os machos do grupo exposto apresentaram significativamente 1,2 vez mais transcritos que seu respectivo grupo controle (**Figura 14A**). Foram observadas diferenças significativas para os efeitos de sexo ($F(1,20) = 7,796$, $p = 0,0105$), tratamento ($F(1,20) = 10,38$, $p = 0,0043$) e interação entre ambos ($F(1,20) = 16,56$, $p = 0,0006$). Os peixes do sexo masculino expostos apresentaram um aumento da transcrição enquanto as fêmeas expostas mantiveram a transcrição semelhante ao observado em seu grupo controle.

Para os transcritos de *MDR1*, não foram observadas diferenças significativas após 24 horas de exposição. Entretanto, após 96 h, os machos apresentaram uma transcrição mais elevada que as fêmeas, apontando um efeito significativo para o fator sexo ($F(1,19) = 7,152$, $p = 0,0150$) e também um efeito de interação ($F(1,19) = 4,486$, $p = 0,0476$), onde os machos expostos apresentam um aumento na transcrição, enquanto fêmeas não são afetadas significativamente (**Figura 14B**). O gene *MRP2* também não apresentou diferenças significativas em 24 h de exposição. Entretanto, após 96 h, apenas o efeito do sexo é considerado significativo ($F(1,20) = 8,559$, $p = 0,0084$) com uma maior transcrição para os machos (**Figura 14C**).

Figura 14. Transcrição dos genes transportadores e relacionados a disruptores endócrinos em fígados de peixes *P. vivipara* machos e fêmeas expostos ao esgoto sanitário 33 % por 24 h e 96 h e os seus respectivos grupos controle. Os níveis dos transcritos dos genes *ABCC1*, *MDR1*, *MRP2*, *SOX9* e *VIT* estão normalizados pelo gene referência *EF2* e relativizados pelo grupo controle machos do seu respectivo período de exposição. Os dados estão apresentados em média \pm desvio padrão. Letras maiúsculas diferentes representam diferença significativa para o fator sexo. Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa entre os grupos no mesmo sexo ($p < 0,05$).



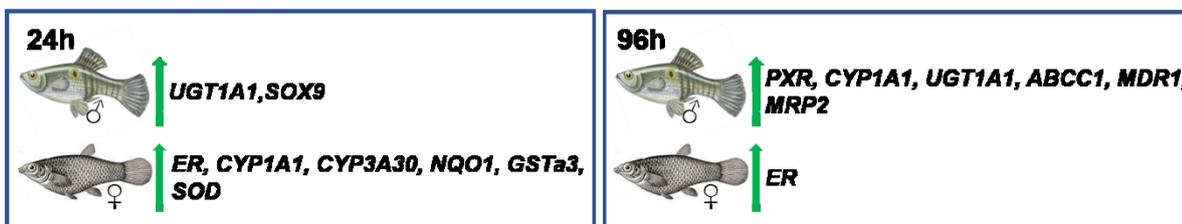
Fonte: Acervo do Autor.

Para os genes relacionados diretamente ao sistema endócrino, foi observado um aumento significativo de 2 vezes mais transcritos de *SOX9* nos machos do grupo exposto, que o seu respectivo controle (**Figura 14D**). Os resultados indicam um efeito significativo para o tratamento com esgoto ($F(1,20) = 10,6$, $p = 0,0040$), também para o sexo ($F(1,20) = 7,661$, $p = 0,0119$), com maior transcrição observada em machos. Após 96 horas, os efeitos do tratamento foram considerados significativos ($F(1,20) = 1,185$, $p = 0,0144$), e sem diferenças para sexo, embora ocorra um efeito significativo de interação entre tratamento e sexo ($F(1,20) = 4,56$, $p = 0,0453$). O esgoto foi capaz de modular a resposta de *SOX9*, diminuindo a transcrição nos animais expostos, entretanto, este efeito foi significativo apenas para as fêmeas que apresentaram 3,6 vezes menos transcritos no grupo exposto que no seu respectivo controle (**Figura 14D**). Para o gene *VIT*, não houve diferenças significativas entre os grupos em ambos os tratamentos e sexos, bem como nos tempos amostrais (**Figura 14E**).

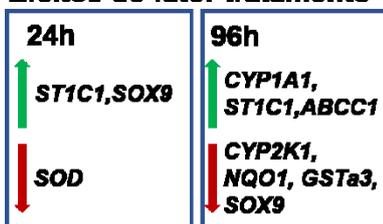
Um compilado de todos os efeitos da transcrição gênica em fígados de *P. vivipara* expostos por 24 e 96 horas ao esgoto sanitário 33 % (v/v) podem ser observados na **Figura 15**.

Figura 15. Compilado dos efeitos observados na transcrição gênica em fígados de *P. vivipara* expostos por 24 e 96 h ao esgoto sanitário. Setas verdes indicam aumento da transcrição, setas vermelhas indicam diminuição da transcrição.

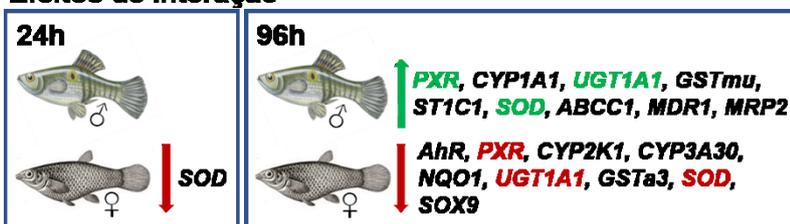
Efeitos do fator sexo



Efeitos do fator tratamento



Efeitos de interação



Fonte: Acervo do Autor.

6.6.3 Correlações transcricionais

Os receptores nucleares AhR, que pertencem à família básica de proteínas do tipo hélice-volta-hélice, desempenham um importante papel nas vias de detoxificação de compostos do tipo dioxina incluindo os HPAs (LEE et al., 2015b; ROY et al., 2018; XU; LI; KONG, 2005). Este fator de transcrição ligante-dependente pode responder a diversos ligantes tornando-o importante não somente em respostas a elementos tóxicos, mas também em funções imunes, de desenvolvimento, fisiológicas e do metabolismo de xenobióticos em uma grande variedade de espécies e tecidos (HAHN, 2002; LEE et al., 2015b; XU; LI; KONG, 2005; ZHOU; MAITRA; WANG, 2008).

A via de sinalização genômica de *AhR* é bem caracterizada. Inicialmente, a proteína AhR encontra-se no citoplasma em uma conformação inativa complexado a um dímero de proteínas de choque térmico hsp90. Quando um ligante cruza a membrana plasmática e liga-se ao AhR, ocorre uma mudança conformacional e o complexo é translocado ao núcleo onde poderá heterodimerizar com o translocador nuclear AhR (ARNT). O heterodímero AhR-ARNT poderá por sua vez associar-se a regiões específicas do DNA, denominadas elementos de resposta a dioxina (DRE) ou xenobióticos (XRE) regulando a transcrição de vários genes alvo (HAHN, 2002; LARIGOT et al., 2018; POLLENZ, 2002; XU; LI; KONG, 2005).

A indução de *AhR* geralmente está associada com um aumento da transcrição dos genes de biotransformação de fase I e II, e enzimas metabolizadoras de xenobióticos (DIETRICH, 2016; HAHN, 2002; JIN et al., 2019; XU; LI; KONG, 2005), entretanto, neste estudo, após 24 h de exposição ao esgoto sanitário, não houve alterações na transcrição de *AhR* e dos demais genes avaliados envolvidos na biotransformação de fase I e II e nas enzimas metabolizadoras de xenobióticos, com exceção de *STIC1*. Pode ter ocorrido uma resposta temporal para *AhR* visto que em 96 horas de exposição ocorre um aumento da transcrição em todos os grupos amostrais em relação a 24 horas de exposição.

Após 96 horas foi observada uma interação para o gene *AhR*. Enquanto a exposição ao esgoto não afetou a transcrição em machos, nas fêmeas ocorreu uma diminuição. Para o gene *GSTa3* também houve um efeito de interação semelhante, assim como para o gene *NQO1*. Como visto, *AhR* apresenta funções protetivas contra o estresse oxidativo e dentre os seus alvos podem ser citadas as enzimas GST e NQO1 que desempenham defesas contra espécies reativas

de oxigênio (DIETRICH, 2016). A menor transcrição de *GSTa3* e *NQO1* observados em fêmeas expostas podem ser atribuídas ao *AhR* também diminuído neste mesmo grupo (DIETRICH, 2016). O papel do *AhR* é menos evidente quando avaliadas as diferenças entre machos e fêmeas de animais da mesma linhagem (LEE et al., 2015a), porém, alguns estudos sugerem uma complexa interação entre *AhR* e *ER* que poderiam parcialmente explicar as diferenças entre os sexos (BABA et al., 2005; CHEN; CHAN, 2018; LEE et al., 2015a; OHTAKE et al., 2008). O *AhR* ligado ao ligante exerce um efeito estrogênico através da interação direta com moléculas de *ER* não ligadas associadas a elementos de resposta estrogênica nos promotores de genes alvo (BABA et al., 2005). Em animais aquáticos, as respostas de *ER* e *AhR* são biomarcadores bem estabelecidos utilizados para observar os efeitos de poluentes, entretanto, estes biomarcadores de resposta podem ser afetados em situações de exposição a misturas complexas, podendo resultar em interpretações equivocadas (YAN; LU; HE, 2012). Aparentemente, uma interação cruzada (*crosstalk*) entre as vias de *ER* e *AhR* pode ter contribuído para as diferenças sexuais observadas nesse estudo uma vez que o gene *ER* mostrou diferenças entre sexos, sendo naturalmente maior em fêmeas.

Assim como *AhR*, o gene *PXR* também desempenha um importante papel na regulação dos níveis de xenobióticos em diferentes tecidos de peixes (BURKINA; ZLABEK; ZAMARATSKAIA, 2015; CUI et al., 2017) bem como a regulação de genes envolvidos no metabolismo e transporte de ácidos biliares e colesterol (FERNÁNDEZ et al., 2018; ZHANG et al., 2017). A regulação do metabolismo destes compostos é coordenada pela regulação de genes que codificam enzimas de biotransformação de fase I e II, e proteínas transportadoras (CUI et al., 2017). A expressão de genes como *CYP3A* está associada principalmente com *PXR* (WASSMUR et al., 2010). Porém, já foi sugerido que a regulação de *CYP1*, *CYP2* e *CYP3* em *D. rerio* possa ser realizada tanto por *PXR* quanto por *AhR* (KUBOTA et al., 2015), e que a ativação de *PXR* pode ocasionar um efeito adverso nas funções fisiológicas normais (ZHANG et al., 2017).

Wang e colaboradores (2019) pesquisando os efeitos da sinvastatina na via de sinalização de *PXR* em fígados do peixe *Mugilogobius abei* encontraram indução de *PXR*, *CYP1A*, *CYP3A* e *GSTa*. Em *Gambusia affinis*, a transcrição de *PXR* e *CYP3A* foram inibidas após 24 h de exposição ao diclofenaco (BAO et al., 2018). Laizé e colaboradores (2018) encontraram indução dos genes *AhR*, *PXR*, *CYP1A* e *GSTpi1* em larvas de *zebrafish* submetidas ao HPA 3-metilcolantreno. Nesse estudo não houve mudanças significativas na transcrição de

PXR após 24 h de exposição, porém, foi observada uma interação entre tratamento e sexo nos animais expostos por 96 h, efeito semelhante ao que ocorreu para a transcrição do gene *AhR* no mesmo intervalo de tempo, porém, além da diminuição da transcrição em fêmeas expostas, também houve o aumento da transcrição em machos do mesmo grupo.

Os genes *AhR* e *PXR* não foram alterados após 24 horas de exposição ao esgoto sanitário 33 %, o que poderia explicar a ausência de respostas significativas para os genes *CYP1A1*, *CYP2K1*, *CYP3A30*, *NQO1*, *UGT1A1*, *GSTa3*, *GSTmu*, *MRP2*, *ABCC1* e *MDR1* entre os grupos de animais no tempo 24 horas. Entretanto, após 96 horas de exposição, foi observado um aumento não significativo para o gene *AhR* em machos expostos, e um aumento significativo para o gene *PXR* neste mesmo grupo e tempo de exposição, permitindo a suposição de que os aumentos observados em machos expostos para os genes de biotransformação de fase I e II *CYP1A1*, *UGT1A1*, *GSTmu*, *ST1C1* e para os transportadores *ABCC1* e *MDR1* podem ter sido modulados pelas vias de sinalização de *PXR*. Além disso, para *AhR*, *CYP2K1*, *CYP3A30*, *NQO1* e *GSTa3* foi observado um efeito de interação semelhante onde animais expostos respondem de maneira distinta, com diminuição da transcrição em fêmeas. *PXR*, *SOD* e *UGT1A1* também apresentaram o mesmo efeito de interação, porém com aumento de transcrição em machos e redução da transcrição em fêmeas nos grupos expostos e por fim, *CYP1A*, *GSTmu*, *ST1C1*, *ABCC1* e *MDR1* cujo efeito de interação apenas aumenta a transcrição em machos expostos. *ABCC1* e *MDR1* ainda podem ter sido induzidos em machos expostos como resultado do aumento da transcrição de genes envolvidos na biotransformação de xenobióticos de fase I e II (*CYP1A*, *UGT1A1*, *GSTmu*, *ST1C1*) neste mesmo grupo. A biotransformação desses compostos oriundos do esgoto sanitário por essas vias, podem gerar metabólitos conjugados com glutathione, ácido glucurônico e sulfatos que podem ser excretados pelos transportadores do tipo ABC (FLORES; MANAUTOU; RENFRO, 2017; LUCKENBACH; FISCHER; STURM, 2014).

A expressão gênica de *SODCu/Zn* é um importante biomarcador relacionado ao estresse oxidativo e tem sido utilizado no monitoramento toxicológico ambiental. Entretanto a transcrição de *SODCu/Zn* pode ser transiente e não corresponder diretamente ao conteúdo proteico devido aos processos de regulação transcricionais, pós-transcricionais, traducionais e pós-traducionais (XIE et al., 2018). Estudos demonstraram que a ativação de *AhR* pode aumentar a transcrição de *Nrf2* (*Fator nuclear relacionado ao eritróide 2*), e por consequência,

várias enzimas de conjugação e antioxidantes (CHE et al., 2016; MESSINA et al., 2013). Os xenobióticos podem induzir *SOD* tanto pelas proteínas Nrf2 quanto pelo AhR através dos elementos responsivos a antioxidante (AREs) e XREs (MIAO; ST. CLAIR, 2009; XIE et al., 2018). Nesse estudo foi observada a diminuição da transcrição nos genes *AhR*, *CYP2K1*, *CYP3A30*, *NQO1*, *UGT1A1* e *GSTa3* no grupo de *P. vivipara* fêmeas expostas por 96 h ao esgoto sanitário 33 %, o que por consequência também manteria os níveis de *SOD* diminuídos em fêmeas. Por outro lado, em machos expostos, houve aumento da transcrição de *CYP1A1*, *UGT1A1*, *GSTmu* e *STIC1*. A biotransformação está envolvida na produção e liberação de espécies reativas de oxigênio (EROS) como consequência natural das reações redox envolvidas na transformação dos xenobióticos (KLOTZ; STEINBRENNER, 2017). O aumento da transcrição de *SOD* em machos é possivelmente resultante da indução da biotransformação nesse grupo.

Os genes da família *Sox* codificam fatores de transcrição evolutivamente conservados contendo domínios de ligação ao DNA chamados HMG box (*High mobility group* – grupo de alta mobilidade), que compartilham cerca de 50 % de resíduos idênticos aos do HMG box do fator de determinação testicular *SRY* de mamíferos. Além de *SRY*, *SOX9* é outro membro desta família envolvido com a determinação sexual (HETT et al., 2005; YOKOI et al., 2002; YUAN et al., 2014). As mutações em *SOX9* de humanos estão relacionadas com a displasia campomélica, uma condrodysplasia caracterizada por anormalidades esqueléticas e reversão sexual de macho para fêmea, indicando seu papel essencial no desenvolvimento gonadal de machos (YOKOI et al., 2002). Em camundongos submetidos a lesões de isquemia e reperfusão hepáticas foi relatado um aumento da transcrição de *SOX9* em decorrência das respostas inflamatórias e apoptóticas (FAN et al., 2018). Neste trabalho, o aumento da transcrição deste gene em machos expostos após 24 h poderia estar relacionado a um possível processo inflamatório gerado pela miscelânea de compostos presentes no esgoto, mas esta resposta não foi observada em fêmeas. Por outro lado, a diminuição de *SOX9* está associada a exposição aos estrogênios (BARSKE; CAPEL, 2010; YUAN et al., 2014). Após 96 h de exposição, as fêmeas submetidas ao esgoto apresentaram uma menor transcrição de *SOX9*, que pode estar relacionada a uma maior concentração de estrogênio endógeno ou exposição direta a 17β -estradiol que é um dos esteroides mais consumidos como contraceptivo, ou ainda, por compostos como PCBs, alquilfenóis e ésteres ftalatos que mimetizam estrógenos naturais e que são introduzidos no ambiente aquático através do esgoto sanitário (FROEHNER et al., 2012).

Conjuntamente, as alterações na transcrição gênica de *SOX9* para machos e fêmeas dos grupos expostos ao esgoto após 24 e 96 horas respectivamente, podem estar relacionadas com um incipiente processo de desregulação endócrina. Estudos demonstrando a importância de *SOX9* na determinação e manutenção sexual em camundongos (BARRIONUEVO et al., 2016), peixes (ADOLFI et al., 2015; TSAKOIANNIS et al., 2018) e tartarugas (TORRES-MALDONADO et al., 2001) podem embasar esta hipótese.

Neste estudo não houve diferença significativa para a transcrição do gene *VIT*, embora tenha sido observada uma maior quantidade de transcritos em fêmeas, o que é o esperado para condições fisiológicas normais. A vitelogenina é uma proteína precursora do vitelo sintetizada no fígado de peixes em resposta ao estrogênio circulante durante o ciclo reprodutivo (HEMMER et al., 2002). Em peixes fêmeas adultas o estrogênio endógeno regula a expressão gênica de *VIT* no fígado. Peixes machos normalmente não expressam estes genes em níveis significantes, a não ser que sejam expostos a algum xenobiótico estrogênico, podendo muitas vezes ultrapassar os níveis de *VIT* plasmática medidos em fêmeas (HEMMER et al., 2002; KNOEBL; HEMMER; DENSLOW, 2004).

As estações de tratamento de esgoto recebem os efluentes de domicílios, instituições públicas e privadas além do lixiviado de rodovias e áreas urbanas que acabam por carrear uma variedade imensa de químicos como fármacos, produtos de higiene pessoal, detergentes, HPAs, PCBs compostos halogenados, metais traço, estrógenos naturais, sintéticos e compostos miméticos como alquilfenóis etoxilados (BEIJER et al., 2017; DENG et al., 2016; LANGE et al., 2017; MCARDLE et al., 2000; MCELROY et al., 2012). Organismos aquáticos em áreas urbanas estão sujeitos a esta miríade de estressores por conta da inabilidade de remoção de químicos nos sistemas de tratamento de esgoto convencionais ou pelo despejo e escoamento direto nos corpos d'água (BEBIANNI et al., 2017; BEIJER et al., 2017; BURKINA; ZLABEK; ZAMARATSKAIA, 2015; GONZALEZ-REY et al., 2014; GRABICOVA et al., 2014, 2015; TREVISAN et al., 2017; ZORITA; MÅRTENSSON; MATHIASSEN, 2009). É possível que esta mistura complexa de contaminantes presentes no esgoto tenha sido responsável por desencadear a regulação transcricional dos genes relacionados com as vias de reconhecimento, detoxificação e transporte de xenobióticos.

Apesar de esperarmos alterações em genes relacionados com biotransformação de xenobióticos frente ao contaminante utilizado neste experimento, após 24 h, a maior parte das

respostas observadas foram em função do fator sexo e não do tratamento. Como citado anteriormente, após 24 h, os genes *CYP1A1*, *CYP3A30*, *NQO1* e *GSTa3* foram significativamente diferentes apenas na transcrição das fêmeas exibindo níveis transcricionais superiores aos machos, e opostamente, *UGT1A1* apresentou machos com maiores transcrições que fêmeas.

O gênero pode ser um importante fator na toxicidade de um xenobiótico através das diferenças de absorção, metabolismo, distribuição e excreção. Muitos dos genes associados a estes processos apresentam padrões gênero-específicos em fígado e rins (FITZSIMMONS et al., 2018; FLORES; MANAUTOU; RENFRO, 2017; KLEINOW; MELANCON; LECH, 1987) e podem ser atribuídos a influências hormonais endógenas (RUIZ et al., 2013). As diferenças de metabolismo de xenobióticos em diferentes gêneros foram claramente demonstradas em humanos e outros organismos modelo como ratos, o que justifica o uso de ambos os gêneros para estudos toxicocinéticos em outros vertebrados (SAAD et al., 2016; TSAKOGIANNIS et al., 2018).

Cribbin e colaboradores (2017) identificaram transcritos diferencialmente expressos entre machos e fêmeas do peixe agulha *Atractosteus tropicus*. A biotransformação e atividade de enzimas antioxidantes gênero-específicas foram observadas em peixes (ADEOGUN et al., 2016; FITZSIMMONS; LIEN; NICHOLS, 2007; IBOR et al., 2019; KARAMI et al., 2015; VUORINEN et al., 2006). Deane e colaboradores (2014) investigando os efeitos de PBDE-47 (2,2',4,4' éter tetrabromodifenílico) em dieta de *Oryzias melastigma* encontraram diferenças gênero-específicas na atividade caspase 3 e 8, com machos apresentando atividade significativamente aumentada enquanto as fêmeas permaneceram sem diferenças. Para HSP90 e HSP70 no mesmo experimento, as atividades em machos não foram alteradas enquanto em fêmeas foi significativamente aumentada. Saad e colaboradores (2016) não encontraram diferenças na atividade CYP1A quanto ao gênero em *D. rerio*. Diferenças sexuais pronunciadas foram observadas quanto à atividade hepática monooxigenase (MO) e conteúdo de citocromo P450 em várias espécies de peixes, principalmente em peixes machos com maior atividade MO e fêmeas com maior quantidade de CYPs (STEGEMAN; CHEVIONI, 1980; KLEINOW; MELANCON; LECH, 1987; KOIVUSAARI; HARRI; HÄNNINEN, 1981).

Os mecanismos responsáveis pela dependência de gênero das enzimas de biotransformação hepáticas e funções de transporte estão longe de serem completamente compreendidos (RUIZ et al., 2013). Apesar de muitos trabalhos citarem que as alterações

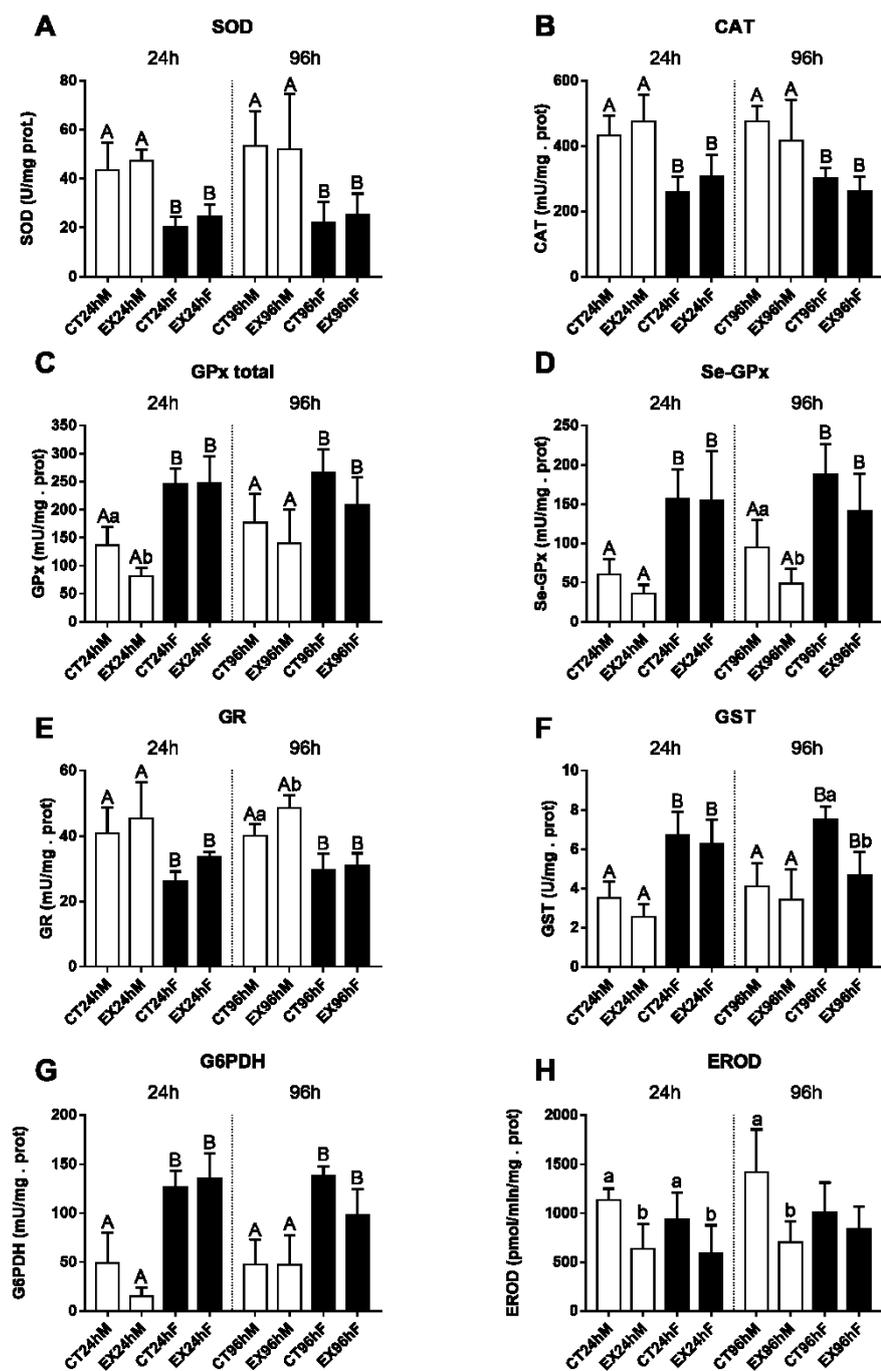
relacionadas ao gênero são importantes e que podem afetar a sensibilidade de um organismo a determinado insulto tóxico de um xenobiótico ou disposição de substratos endobióticos (ANDERSSON; FÖRLIN, 1992; SCHLENK et al., 2008), poucos trabalhos têm surgido efetivamente na literatura científica a despeito das diferenças transcricionais e das atividades enzimáticas entre sexos para peixes teleósteos.

6.7 ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Durante a exposição ao esgoto sanitário 33 % não houve mortalidade dos peixes tornando possível a avaliação da atividade enzimática de machos e fêmeas dos seguintes biomarcadores bioquímicos: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutaciona peroxidase total (GPx) e selênio dependente (Se-GPx), glutaciona redutase (GR), glutaciona S-transferase (GST), glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) e etóxi-resorufina *O*-deetilase (EROD) em fígados e brânquias. Em cérebros foi possível avaliar a atividade acetilcolinesterase e butirilcolinesterase.

Todas as atividades enzimáticas avaliadas em fígado apresentaram pelo menos uma alteração, conforme demonstrado nos gráficos da **Figura 16**.

Figura 16. Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutiona peroxidase (GPx), glutiona peroxidase selênio dependente (Se-GPx), glutiona redutase (GR), glutiona S-transferase (GST), glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) e etóxi-resorufina *O*-deetilase (EROD) em fígados de peixes *Poecilia vivipara* expostos ao esgoto sanitário 33 % por 24 e 96 h. Os dados estão apresentados em média \pm desvio padrão. Letras maiúsculas diferentes representam diferença significativa para o fator sexo. Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa entre os grupos no mesmo sexo ($p < 0,05$).



Fonte: Acervo do Autor.

A atividade SOD foi maior nos peixes machos em ambos os períodos de exposição, porém o esgoto sanitário não foi capaz de alterá-la significativamente (**Figura 16A**).

A atividade catalase também foi maior nos grupos de machos tanto na exposição de 24 quanto na de 96 h ($F(1,18) = 36,66$; $p < 0,0001$ e $F(1,18) = 29,54$; $p < 0,0001$, respectivamente) (**Figura 16B**).

As atividades totais de GPx apresentaram diferenças significativas para o fator sexo ($F(1,20) = 104,3$; $p < 0,0001$) com maiores atividades em fêmeas após 24 h de exposição. O esgoto sanitário 33 % foi capaz de diminuir a atividade dos machos em comparação ao seu controle enquanto para as fêmeas não houve alteração. Com base nos dados observados poderíamos concluir que há uma tendência significativa para interação entre os fatores sexo e tratamento, com um valor de $p = 0,051$. Após 96 h foi observado apenas diferenças para o fator sexo. Fêmeas apresentam maior atividade GPx total que os machos. O esgoto foi capaz de diminuir a atividade GPx total dos animais expostos, porém não foram observadas significâncias para este efeito (**Figura 16C**). Para a atividade glutathiona peroxidase dependente de selênio foram observados resultados semelhantes à GPx total após 24 h, com efeitos significativos para o sexo ($F(1,20) = 47,22$; $p < 0,0001$). Fêmeas apresentaram uma maior atividade quando comparadas aos machos e o tratamento não foi capaz de alterar a atividade enzimática dos grupos expostos. Após 96 h, tanto sexo quanto tratamento apresentaram diferenças significativas ($F(1,19) = 72,55$; $p < 0,0001$ e $F(1,19) = 9,489$; $p = 0,0062$, respectivamente). O esgoto sanitário foi capaz de diminuir a atividade Se-GPx dos machos expostos significativamente (**Figura 16D**).

Foi registrada uma maior atividade GR em machos nos dois períodos de exposição. Em 24 h, o esgoto foi capaz de aumentar a atividade GR dos animais expostos, porém este aumento não é significativo. Após 96 h foram encontradas diferenças significativas para os efeitos do sexo ($F(1,20) = 68,44$; $p < 0,0001$) com maior atividade em machos, e para o tratamento ($F(1,20) = 8,662$; $p = 0,0080$). Machos expostos apresentaram maior atividade GR, enquanto fêmeas não apresentam atividade alterada para a glutathiona redutase (**Figura 16E**).

Para GST, as maiores atividades registradas foram em fêmeas em ambos os períodos de exposição. Após 24 horas foi observada diferença significativa apenas para sexo ($F(1,18) = 65,7$; $p < 0,0001$), enquanto em 96 h, além da diferença de atividade em relação ao sexo ($F(1,18) = 20,63$; $p < 0,0003$), ocorreu efeito significativo do tratamento ($F(1,18) = 11,83$;

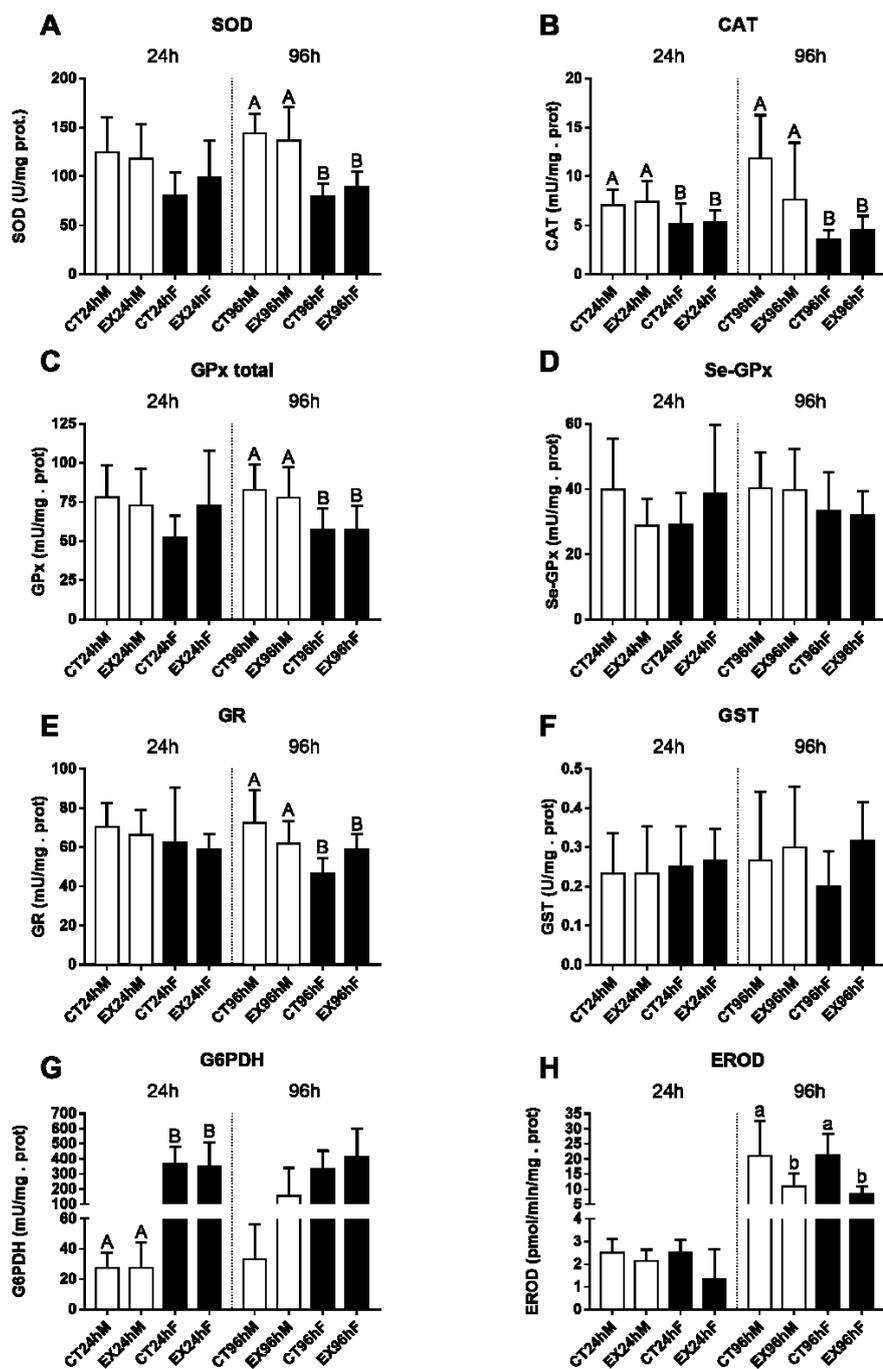
$p=0,0029$). O esgoto alterou a atividade GST nos peixes expostos e este efeito tornou-se mais evidente com a diminuição da atividade em fêmeas por conta da interação significativa entre tratamento e sexo $F(1,18) = 4,475$; $p=0,0486$ (**Figura 16F**).

A atividade G6PDH após 24 h de exposição é maior significativamente em fêmeas demonstrando diferença estatística para o fator sexo $F(1,20) = 120,1$; $p < 0,0001$). Apesar de não serem notadas diferenças significativas entre controle e tratamento em ambos os sexos, foi possível observar uma forte interação entre os fatores tratamento e sexo $F(1,20) = 5,496$; $p = 0,0295$) que consequentemente diminuiu a atividade em machos expostos, enquanto em fêmeas ocorreu um breve aumento. Após 96 h, foi observada alteração para a atividade G6PDH em relação ao sexo $F(1,20) = 48,45$; $p < 0,0001$) com fêmeas apresentando maior atividade. O efeito do tratamento foi significativo apenas para as fêmeas ocorrendo uma diminuição da atividade nos peixes expostos ($p < 0,05$) (**Figura 16G**).

Após 24 horas de exposição, a atividade catalítica de CYP1A, a EROD, exibiu diferenças significativas para o tratamento $F(1,19) = 16,22$; $p = 0,0007$). A atividade foi diminuída nos grupos expostos quando comparados aos seus controles. 96 horas de exposição resultaram, novamente, em alterações ocasionadas pelo efeito do esgoto $F(1,19) = 12,26$; $p = 0,0024$) porém é possível visualizar um efeito de interação dos fatores sexo e tratamento $F(1,19) = 4,643$; $p = 0,0442$). A atividade EROD em machos expostos foi menor em relação ao seu respectivo controle, enquanto em fêmeas expostas esta diminuição não apresentou diferenças estatísticas. Acredita-se que essas observações ocorram em decorrência dos machos do grupo controle apresentarem a maior atividade registrada para esta enzima em ambos os períodos de exposição ao esgoto (**Figura 16H**).

As atividades enzimáticas medidas nas brânquias estão ilustradas na **Figura 17**. Com relação a atividade, SOD não apresentou diferenças significativas em 24 h de exposição, no entanto, após 96 horas o fator sexo apresentou diferenças significativas $F(1,19) = 34,26$; $p < 0,0001$), onde os machos apresentaram maior atividade que fêmeas (**Figura 17A**).

Figura 17. Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutiona peroxidase total (GPx) e selênio dependente (Se-GPx), glutiona redutase (GR), glutiona S-transferase (GST), glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) e etóxi-resorufina *O*-deetilase (EROD) em brânquias de peixes *Poecilia vivipara* expostos ao esgoto sanitário 33 % por 24 e 96 h. Os dados estão apresentados em média \pm desvio padrão. Letras maiúsculas diferentes representam diferença significativa para o fator sexo. Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa entre os grupos no mesmo sexo ($p < 0,05$).



Fonte: Acervo do Autor.

As brânquias não apresentaram diferenças significativas entre os grupos controles e expostos, entretanto, a atividade CAT após 24 h foi significativamente diferente para o fator sexo ($F(1,20) = 7,247$; $p = 0,0140$), onde machos apresentaram maior atividade que fêmeas. Após 96 h, são observadas apenas diferenças em relação ao sexo. Assim como em 24 h, após 96 h de exposição, machos apresentaram maior atividade CAT (**Figura 17B**).

Enquanto em 24 horas não foram relatadas diferenças significativas para a atividade GPx total em brânquias, em 96 h de exposição foram evidenciadas diferenças significantes para o fator sexo ($F(1,20) = 12$; $p = 0,0025$). Machos apresentaram maior atividade que fêmeas e o tratamento não influenciou a atividade desta enzima nos animais (**Figura 17C**). Para Se-GPx não houve diferenças estatísticas entre os grupos em ambos os períodos de exposição.

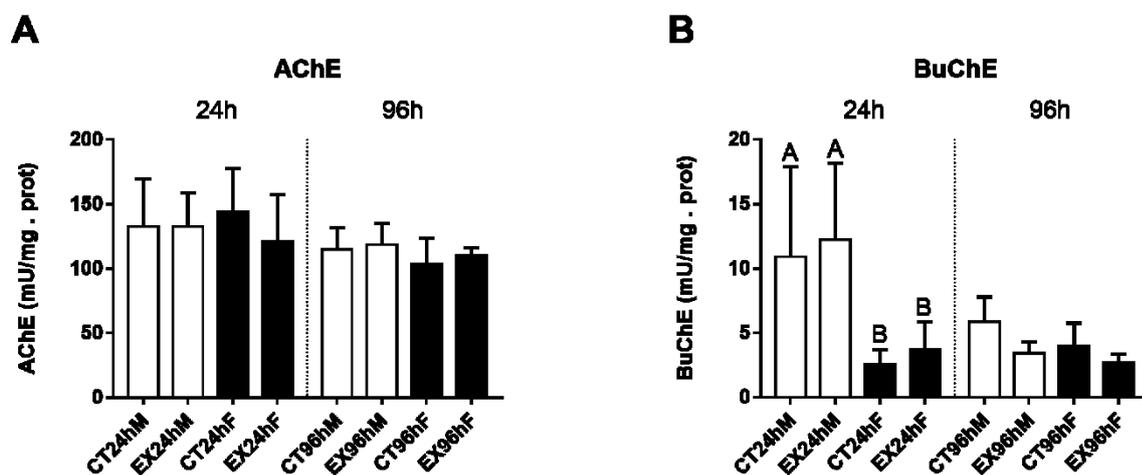
A GR não exibiu diferenças em 24 horas de exposição, entretanto após 96 h, a atividade GR branquial dos peixes foi significativamente diferente para o fator sexo ($F(1,18) = 29,54$; $p < 0,0001$). Machos apresentaram maior atividade que fêmeas (**Figura 17E**). A atividade GST não sofreu alterações significativas em brânquias em 24 e 96 horas.

Para a atividade G6PDH após 24 h, ficou evidente a diferença entre sexos. As fêmeas apresentaram maior atividade quando comparadas aos. Após 96 horas não foram observadas diferenças significativas para a atividade (**Figura 17G**).

A atividade EROD nas brânquias não apresentou diferenças após 24 h, entretanto, após 96 horas o efeito da exposição ao esgoto gerou diferenças significativas ($F(1,20) = 8,293$, $p = 0,0093$). Os peixes expostos ao esgoto apresentaram uma diminuição da atividade EROD (**Figura 17H**).

Quanto as atividades avaliadas em cérebros de *P. vivipara*, para AChE não foram observadas diferenças em ambos os períodos de exposição (**Figura 18A**). A atividade BuChE em 24 h foi significativamente maior em machos em comparação com as fêmeas. Após 96 h não foram observadas diferenças significativas (**Figura 18B**).

Figura 18. Atividade das enzimas acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BuChE) em cérebros de peixes *Poecilia vivipara* expostos ao esgoto sanitário 33 % por 24 e 96 h. Os dados estão apresentados em média \pm desvio padrão. Letras maiúsculas diferentes representam diferença significativa para o fator sexo. Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa entre os grupos no mesmo sexo ($p < 0,05$).



Fonte: Acervo do Autor.

Os efeitos biológicos causados pelos poluentes ambientais são rotineiramente medidos através de diversos biomarcadores bioquímicos e moleculares que refletem a indução de sistemas de biotransformação específicos, ou o início de várias alterações celulares (FONSECA et al., 2011a; RIBALTA; SANCHEZ-HERNANDEZ; SOLE, 2015; VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Dentre os biomarcadores, as vias do citocromo P450 e as enzimas antioxidantes são conhecidas por suas respostas aos insultos químicos em organismos marinhos, e geralmente são medidas como variações na transcrição de genes, níveis ou atividade funcional de proteínas ativas (HOYDAL et al., 2018; KIM et al., 2013; LANGE et al., 2017; REGOLI et al., 2011; SAAD et al., 2016).

Apesar de as análises moleculares serem geralmente utilizadas para suportar ou mesmo substituir as análises bioquímicas, a ligação entre os efeitos que ocorrem em vários níveis intracelulares nem sempre são fáceis de se predizer ou elucidar, e os resultados da transcrição de um gene e a atividade catalítica do seu produto podem exibir tendências diferentes, parecendo inconsistentes, visto que pode existir uma relação complexa entre a estabilidade do mRNA, *turnover* proteico e os mecanismos transcricionais e traducionais de regulação da cinética enzimática (REGOLI et al., 2011). O uso de múltiplos biomarcadores em diferentes

níveis de organização biológica é uma abordagem apropriada para a detecção de respostas biológicas ativadas por contaminantes (VIEIRA et al., 2019).

O fígado de peixes é geralmente o órgão onde muitos xenobióticos são absorvidos e passam por processos metabólicos críticos de ativação (oxidação), mediada por mono-oxigenases associadas aos citocromos P450, ou inativação mediada por conjugases, permitindo a sua excreção e eliminação (ANDERSSON; FÖRLIN, 1992; OLIVEIRA; PACHECO; SANTOS, 2008; SANTANA et al., 2018). Contudo, a habilidade de metabolizar xenobióticos não se restringe apenas ao fígado, mas também a outros tecidos como as brânquias, rins e trato gastrointestinal (ANDERSSON; FÖRLIN, 1992). Neste trabalho, além das abordagens moleculares investigadas em fígados de *P. vivipara* (transcriptoma e qPCR), também foram mensuradas atividades enzimáticas em fígado, brânquias e cérebro dos animais.

O tecido mais responsivo neste estudo foi o fígado. Conforme citado anteriormente, todas as enzimas hepáticas estudadas apresentaram alguma diferença em ambos os períodos de exposição, enquanto nas brânquias houve uma prevalência de resultados significativos após 96 h. As defesas antioxidantes são tipicamente desenvolvidas preferencialmente no fígado como resposta central na detoxificação de xenobióticos e processamento de produtos metabólicos para degradação, apesar de as brânquias serem o primeiro órgão de contato com os poluentes ambientais e não apresentarem um sistema de detoxificação tão robusto quanto o hepático (LI et al., 2010; OLIVEIRA; PACHECO; SANTOS, 2008).

Enzimas metabolizantes de xenobióticos são tipicamente moduladas através da ativação do receptor citosólico AhR, que translocado ao núcleo, liga-se aos DRE e iniciam a transcrição de uma série de genes, incluindo os *citocromos P450s* (*CYP1A* e *CYP1B*), *UGT1A*, *GSTs*, *NQO1* (DIETRICH, 2016; GAGNON; RAWSON, 2017; REGOLI et al., 2011). Níveis elevados de EROD, a expressão catalítica de CYP1A, são indicativos de uma elevada atividade de detoxificação sob exposição à poluição orgânica (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Mudanças nas atividades CYP podem alterar a concentração plasmática de estrógenos, andrógenos, progesteronas e glicocorticoides (BEIJER et al., 2018). Além disso, 17 β -estradiol (E₂) endógeno pode impactar a mensuração da atividade EROD inibindo a atividade CYP1A (ANDERSSON; FÖRLIN, 1992; BURKINA; ZLABEK; ZAMARATSKAIA, 2015; GAGNON; RAWSON, 2017; NAVAS; SEGNER, 2001). No trabalho de revisão de Gagnon e Rawson (2017) sobre espécies bioindicadoras utilizadas para quantificar a atividade EROD em peixes australianos, todos os estudos apresentaram aumento

da atividade nos peixes expostos a misturas complexas de efluentes industriais como os provenientes de estações de tratamento de esgoto, indústrias de celulose e refinarias de petróleo. Por outro lado, em truta-arco-íris *Oncorhynchus mykiss* expostas ao estradiol e estriol foram observados níveis de EROD 15 e 13 vezes menores que o controle, respectivamente (ELSKUS, 2004). Yan, Lu e He (2012) não observaram mudanças na EROD de *Carassius auratus* expostos ao 17 β -estradiol.

Alguns estudos apontam que determinados PCBs e HPAs podem causar efeitos estrogênicos e antiestrogênicos enquanto substâncias estrogênicas como o 17 α -etinilestradiol (EE₂) e nonilfenol, podem inibir a atividade EROD em peixes (ARUKWE; FÖRLIN; GOKSØYR, 1997; KIRBY et al., 2007; NAVAS; SEGNER, 2000; YAN; LU; HE, 2012). Notavelmente, peixes fêmeas possuem níveis muito maiores de E₂ endógenos e de expressão de receptores de estrógenos que machos e juvenis (YE et al., 2018). O esteroide natural 17 β -estradiol e o estrógeno sintético 17 α -etinilestradiol, introduzidos no ambiente através dos efluentes sanitários municipais, são os dois compostos feminizantes mais prevalentes nos rios e estuários (BREVES et al., 2018). Além destes dois estrógenos, uma série de outros compostos xenoestrógenos com a capacidade de mimetizar estrógenos e considerados compostos desreguladores endócrinos (EDCs), são encontrados no ambiente aquático (BOSKER; SANTORO; MELVIN, 2017; ISMAIL; WEE; ARIS, 2017; KATSIADAKI et al., 2012; YE et al., 2018). Apesar de um forte dimorfismo sexual quanto à expressão de CYP1A ocorrer em peixes com uma menor atividade em fêmeas (ELSKUS, 2004), não foram encontradas diferenças na atividade EROD entre machos e fêmeas de *Clarias gariepinus* injetados com diferentes doses de benzo[a]pireno (KARAMI et al., 2015).

Compostos azólicos como o imidazol, benzimidazol, triazol, entre outros, são conhecidos por seu amplo uso na medicina humana e veterinária, agricultura e em diversos materiais promovendo proteção antifúngica por inibirem a atividade EROD em fungos (BEIJER et al., 2018). Devido a sua ampla utilização, estes compostos são introduzidos no meio ambiente principalmente via esgoto sanitário e atuam como xenobióticos (LI et al., 2010; MATTHIESSEN; WELTJE, 2015). Esta inibição já foi reportada em peixes como *Oncorhynchus mykiss* (BEIJER et al., 2018) e *Gasterosteus aculeatus* (BEIJER et al., 2010).

Neste estudo para as análises realizadas em fígados e brânquias dos peixes expostos por 24 e 96 horas ao esgoto não houve diferenças para o fator sexo na atividade EROD, o que

nos permite correlacionar que possivelmente, os efeitos observados são decorrentes dos contaminantes presentes no esgoto, e que os estrógenos endógenos dos animais não interferiram na atividade. A interação observada após 96 h para a atividade EROD hepática dos peixes com aumento da atividade dos machos enquanto fêmeas não foram afetadas pelo esgoto, corrobora para esta hipótese. Em contrapartida, a transcrição hepática de *CYP1A1* é significativamente diferente entre os sexos ao contrário do observado para a atividade catalítica. Em 24 horas de exposição, os transcritos em machos e fêmeas não apresentaram diferenças, enquanto a atividade diminuiu nos fígados dos animais expostos. Após 96 horas, foi relatada interação entre os fatores sexo e tratamento para os níveis de transcritos e para a atividade EROD. Porém, os machos apresentaram maior transcrição no grupo exposto, exibindo uma possível indução gênica, enquanto a atividade catalítica diminuiu. As fêmeas não demonstraram diferenças entre transcritos e atividade enzimática. Neste sentido, parece ter ocorrido uma regulação temporal em decorrência da falta de mRNA em machos frente a diminuição da atividade no grupo exposto, resultando em um aumento da transcrição em 96 h para garantir a detoxificação dos xenobióticos presentes no esgoto. Possivelmente este aumento de mRNA foi suficiente para elevar a taxa de atividade EROD mantendo níveis semelhantes aos das fêmeas. As fêmeas por sua vez, com os maiores níveis de transcritos no grupo exposto por 24 h, ainda não teriam seus RNAs mensageiros traduzidos em proteínas, o que de certa forma é regularizado em 96 h, com níveis de transcritos e atividade semelhantes aos seus respectivos grupos.

O estresse oxidativo, que pode ser consequência de diversos passos de uma via metabólica, resulta de um desbalanço entre os mecanismos pró-oxidantes e antioxidantes devido a depleção de antioxidantes ou acúmulo excessivo de EROS, ou ambos, ocasionando o dano oxidativo ou injúria (COUTO; WOOD; BARBER, 2016; LI et al., 2010). Substâncias oxidativas nas células podem causar uma elevação dos mecanismos de defesa antioxidante. A glutathiona (GSH) e enzimas dependentes de GSH, como as GPx e GSTs, desempenham um papel essencial no sistema antioxidante (HUGHES; GALLAGHER, 2004; LIANG et al., 2011). GSH é o principal composto sulfidril citosólico de baixo peso molecular que atua como redutor celular e agente protetor contra diversos poluentes com grupos funcionais tióis. GSH atua como eliminadora de EROS através da conjugação direta ao xenobiótico, ou através das enzimas dependentes de GSH produzindo glutathiona dissulfídica (GSSG), podendo desta forma ser utilizada como um biomarcador de estresse ambiental (DELEVE; KAPLOWITZ, 1991; LI et al., 2010; SANTANA et al., 2018). Os níveis de GSH são mantidos pela síntese *de novo* e pela

atividade GR que recicla GSSG para GSH as custas de NADPH (COUTO; WOOD; BARBER, 2016; OLIVEIRA; PACHECO; SANTOS, 2008; SANTANA et al., 2018; VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

A GST é uma importante enzima envolvida na conjugação de uma gama de substratos eletrofílicos à glutatona reduzida, promovendo a proteção da célula ao estresse oxidativo (LI et al., 2010). Assim como GR e GPx, a atividade GST pode ser induzida em decorrência de um mecanismo adaptativo para diminuição do estresse oxidativo, entretanto, um estresse oxidativo severo pode suprimir a atividade GST através da exaustão de GSH e/ou desregulação de sua síntese (LI et al., 2010). Foram encontradas diferentes respostas em diferentes tecidos e tempos amostrais de *O. mykiss* expostas a longo prazo ao propiconazol. Enquanto em fígados e músculo houve aumento da atividade, em brânquias houve diminuição a longo prazo (LI et al., 2010). Karami e colaboradores (2015) não observaram diferenças na atividade GST em *C. gariepinus* expostos a benzo[a]pireno, enquanto em *O. niloticus* expostas ao paraquat foram registradas diferenças nas respostas GST em relação ao sexo, com maior atividade em machos (FIGUEIREDO-FERNANDES et al., 2006). Nos peixes desse estudo foram observados em ambos os períodos de exposição, diferenças apenas em fígado para o fator sexo com maior atividade em fêmeas.

Como citado anteriormente, a atividade GR é essencial para a manutenção do estado redox intracelular regenerando GSH a partir de GSSG, que servirá de substrato em algumas reações catalisadas por GST e GPx por exemplo (BEBIANNI et al., 2017; COUTO; WOOD; BARBER, 2016; FLORES-NUNES et al., 2015). Liang e colaboradores (2011) observaram um efeito gênero dependente na atividade GR de camundongos expostos a pirrolizidina alcaloide, sendo significativamente maior em machos. Para *O. niloticus* expostas ao paraquat, a atividade GR foi maior em fêmeas (FIGUEIREDO-FERNANDES et al., 2006). Para *P. vivipara*, a atividade GR hepática foi maior em machos em ambos os períodos de exposição, além de uma maior atividade relacionada ao tratamento em 96 h, e maior em brânquias dos machos nesse mesmo tempo de exposição. O desbalanço da atividade GR pode desafiar o estado redox do organismo tornando os níveis de GSH formados pela redução da GSSG insuficientes para lidar com as espécies reativas de oxigênio formadas durante o estresse oxidativo, resultando em efeitos deletérios para o organismo (BEBIANNI et al., 2017).

GPx constituem uma família de enzimas capazes de reduzir uma variedade de hidroperóxidos orgânicos e inorgânicos aos seus correspondentes hidróxidos na presença de glutathione reduzida conferindo proteção do organismo ao estresse oxidativo (NAGAI et al., 1999; SANTANA et al., 2018; YAMASHITA et al., 2012). A detoxificação de EROS e qualquer hidroperóxido implica na oxidação de GSH a GSSG pela GPx (LI et al., 2010). Em *P. vivipara*, as diferenças maiores para GPx e Se-GPx são referentes ao sexo, com fêmeas apresentando maior atividade hepática. Nesse estudo, o esgoto sanitário foi capaz de modular a GPx em machos após 24 h de exposição resultando em uma diminuição da atividade, enquanto a atividade Se-GPx diminuiu em resposta ao tratamento após 96 h de exposição. Fonseca e colaboradores (2011a) também observaram uma atividade Se-GPx maior em peixes *Pomatoschistus micros* em ambiente com menor impacto antrópico enquanto a GPx total foi maior nos locais poluídos. Em *Gambusia affinis*, a atividade GPx aumentou significativamente em fígado quando expostos ao diclofenaco (BAO et al., 2018). Li e colaboradores (2010) observaram alterações na atividade GPx tecido específicas em *O. mykiss* expostas ao propiconazol, com aumento da atividade em fígado após exposição a longo prazo, diminuição da atividade tempo e concentração dependentes em brânquias, aumento da atividade em músculo na maior concentração em um intervalo de 20 dias, e inibição após 30 dias. Ainda em *O. mykiss*, as atividades GPx hepáticas foram diminuídas quando expostas ao antibiótico eprinomectina (ALAK et al., 2017). Em *Liza aurata* expostas ao fenantreno, foi relatado um decréscimo de Se-GPx em brânquias, enquanto em fígado houve um aumento da atividade (OLIVEIRA; PACHECO; SANTOS, 2008). Em *P. vivipara*, as brânquias não foram um tecido responsivo para as atividades GPx e Se-GPx, apesar de os machos apresentarem uma maior atividade GPx total após 96 h de exposição, ao contrário do que ocorreu em fígado.

O decréscimo na GPx hepática dos machos expostos pode ser um sinal de toxicidade associada a produção de EROS induzida pelo esgoto, e não necessariamente uma consequência dos baixos níveis de GSH (que não foram mensurados nesse estudo) (OLIVEIRA; PACHECO; SANTOS, 2008). Esses resultados podem refletir um processo adaptativo incipiente em fígados frente aos xenobióticos, o que não pode ser observado em brânquias. A ausência de diferenças significativas nas enzimas dependentes de GSH nas brânquias é devido, possivelmente, às baixas concentrações de GSH no tecido, visto que a maior parte da GSH é sintetizada no fígado e então transportada a outros tecidos (OLIVEIRA; PACHECO; SANTOS, 2008). Adicionalmente, machos apresentaram maior atividade SOD, que por consequência gera mais

H₂O₂ a ser metabolizado. Baixos níveis de GPx corroboram para este acúmulo de H₂O₂ que pode causar dano celular nos peixes (CARVALHO et al., 2012). Ainda em machos, foram encontradas baixas atividades hepáticas das enzimas dependentes de GSH concomitante com uma maior atividade CAT, sugerindo que a CAT em machos é a enzima preferencial para a remoção de H₂O₂, enquanto o inverso ocorre em fêmeas. Esta relação inversa entre atividades enzimáticas antioxidantes já foi documentada em peixes e mamíferos (RIBALTA; SANCHEZ-HERNANDEZ; SOLE, 2015).

A G6PDH pertence a via das pentose fosfato e é uma importante enzima fornecedora de NADPH para a manutenção do equilíbrio redox (GSH/GSSG) (HO et al., 2013; WINZER; VAN NOORDEN; KÖHLER, 2002). Winzer e colaboradores (2002), investigando a atividade G6PDH em hepatócitos de *Platichthys flesus*, observaram a quase completa inibição da atividade em fêmeas, mas não em machos, expostos a estressores oxidativos. Bainy e colaboradores (1996) encontraram indução da atividade G6PDH em fígados de tilápias *O. niloticus* provenientes de um local poluído. No presente estudo, observou-se uma atividade maior em fígados de fêmeas *P. vivipara* e uma interação entre gênero e tratamento. O esgoto foi capaz de alterar a atividade em 24 horas promovendo a sua diminuição em machos sem afetar as fêmeas, e após 96 h o inverso, com fêmeas apresentando atividade inibida. A inibição da atividade G6PDH por estrógenos pode resultar em menores níveis de NADPH possivelmente relacionados a uma maior vulnerabilidade aos tóxicos ambientais, e em fêmeas, isto fica mais evidente frente à metabolização de vitelogenina no fígado por requer um poder redutor muito maior do que os machos no seu respectivo período reprodutivo (WINZER; VAN NOORDEN; KÖHLER, 2002). Apesar disto, a atividade G6PDH em fêmeas em ambos os tempos e grupos (controle e exposto, 24 e 96h) foi maior em comparação aos grupos de machos, e todos os peixes encontravam-se nos mesmos estádios de maturação gonadal.

As enzimas SOD e CAT protegem o organismo dos danos oxidativos e mantêm a homeostase celular pela remoção de EROS gerados como intermediários altamente reativos do metabolismo de hidrocarbonetos (KOPECKA-PILARCZYK; CORREIA, 2009). As SODs são uma classe de enzimas essenciais para a dismutação do superóxido em peróxido de hidrogênio, sendo a primeira linha de defesa enzimática contra o ânion superóxido agindo imediatamente após a exposição com o objetivo de neutralizá-lo (SANTANA et al., 2018; YADAV et al., 2015). A segunda linha de defesa geralmente é catalisada pela catalase, e várias peroxidases

(SELLATHTHURAI; PRIYATHILAKA; LEE, 2019). A CAT é uma oxidorreductase responsável por converter duas moléculas de H_2O_2 em duas moléculas de água e uma de oxigênio (REGOLI; GIULIANI, 2014).

Neste trabalho, SOD e CAT foram maiores em fígados e brânquias de machos, semelhante ao relatado para *Girardinichthys viviparus* expostos a PCBs (VEGA-LÓPEZ et al., 2007). No estudo de Figueiredo-Fernandes e colaboradores (2006) com *O. niloticus* expostos ao paraquat, a atividade SOD também foi maior em machos. Segundo Vega-López e colaboradores (2007), estas diferenças ligadas ao sexo podem ser provavelmente determinadas pelos níveis de peroxidação lipídica (LPO) característicos de cada sexo, onde a atividade catalítica de isozimas citocromo P450 trariam um aumento de EROS, especialmente em machos (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Esta hipótese não foi testada, visto que neste estudo não foram avaliados os níveis de LPO nos animais, além de a atividade EROD ter diminuído nos grupos expostos sem diferenças para o fator sexo. Geralmente as atividades CAT e SOD aumentam frente a condições de estresse oxidativo (REGOLI et al., 2011; ZHANG et al., 2019), porém, o que se observou em *P. vivipara* foram alterações em função do gênero.

Em relação a atividades enzimáticas em fígados e brânquias, é possível sumarizar que houve uma menor atividade G6PDH para os machos em relação às fêmeas. Uma atividade G6PDH baixa está relacionada a níveis menores de NADPH, que possivelmente seria utilizado nas reações de biotransformação de fase I. De fato, a atividade EROD neste estudo diminuiu nos grupos expostos ao esgoto. Os baixos níveis de NADPH podem ter sido consumidos por GR, que apresentou maior atividade, provavelmente relacionada com a reciclagem de GSH, que por sua vez pode servir de substrato para outras enzimas como GST e GPx. Adicionalmente, os machos apresentaram menor atividade GPx, o que resultaria em menores níveis de GSSG, provavelmente porque o H_2O_2 presente nas células estaria sendo metabolizado pela CAT que apresentou maior atividade neste gênero, ou por outras peroxidases que não foram avaliadas neste estudo.

Com relação as fêmeas, ocorreu basicamente o inverso do que foi observado nos machos. A atividade G6PDH é maior, possibilitando maiores níveis de NADPH, e fornecendo poder redutor para outras vias enzimáticas juntamente com a reciclagem de GSH via GR, entretanto, a atividade GR foi menor que nos machos. Em camundongos, foi relatado que as fêmeas possuem fisiologicamente uma atividade glutamato cisteína ligase (GCL) maior que os machos (LIANG et al., 2011). Esta enzima é um dos passos limitantes da síntese de GSH

(FRANKLIN et al., 2009) e presume-se que os seus baixos níveis em camundongos machos são compensados por uma atividade GR maior (LIANG et al., 2011). Parte da GSH em fêmeas de *P. vivipara* provavelmente está sendo consumida por GPx e GST que apresentaram maiores atividades. Além disso, a diminuição da atividade GST significativamente em fêmeas expostas por 96 h ao esgoto, pode ser consequência da diminuição da atividade G6PDH também observada no mesmo grupo e tempo de exposição, conforme o raciocínio apresentado anteriormente. Ainda em relação a GST, a diminuição da atividade pode ser resultado direto da inibição da transcrição de *GSTs* (como observado em *GSTa3* hepática).

Concernente às atividades medidas no cérebro dos peixes, dentre os vários biomarcadores de exposição a contaminantes ambientais, a família das colinesterases, acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BuChE), são amplamente utilizadas para a avaliação dos efeitos nocivos dos pesticidas carbamatos e organofosforados (GHAZALA et al., 2014; VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). As enzimas AChE são responsáveis pela decomposição do neurotransmissor acetilcolina, e têm um papel central na neurotransmissão. Em organismos aquáticos como moluscos bivalves e peixes teleósteos expostos a carbamatos e organofosforados, ou residentes em habitats antropogenicamente impactados, a atividade e expressão AChE é inibida, e estes decréscimos são associados a diversos tipos de desordens neurológicas (LINDE-ARIAS et al., 2008; RAVASCHIERE et al., 2017).

Outras colinesterases incluindo BuChE, são cruciais para diferentes partes do sistema imune. Mesmo que suas funções fisiológicas não sejam bem definidas, BuChE é considerada uma das principais enzimas detoxificantes (GHAZALA et al., 2014; PEREIRA et al., 2019). Devido a sua relevância a respeito do estresse ambiental, a importância destas enzimas como biomarcadores de contaminação ambiental é uma consequência da sua sensibilidade frente a multiplicidade de contaminantes ambientais, estando presentes em um grande número de espécies distintas (LINDE-ARIAS et al., 2008; PEREIRA et al., 2019; RAVASCHIERE et al., 2017).

A inibição da atividade AChE cerebral em peixes tem sido sugerida como uma via para demonstrar a exposição a compostos neurotóxicos, principalmente organofosfatos e carbamatos (CHIANG et al., 2012; VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). A inibição destas enzimas é essencialmente irreversível com a maioria dos pesticidas ou

persistente por muitas semanas. Esta inibição geralmente aumenta com a exposição crônica (CHIANG et al., 2012). Em peixes *Labeo rohita* expostos aos pesticidas prodenofos e carbofuram, um organofosforado e um carbamato respectivamente, houve uma inibição das atividades AChE e BuChE (GHAZALA et al., 2014). Em duas espécies de peixes nativos da América do Sul, *Trichomycterus areolatus* e *Percilia gillissi* amostrados ao longo de um ano em rios impactados por ação antrópica, não foram observadas diferenças para AChE cerebral, tanto para os locais quanto para o sexo dos animais (CHIANG et al., 2012). O mesmo foi observado neste estudo, onde não houve diferenças em *P. vivipara* em relação ao tratamento e gênero dos animais. Enquanto a atividade BuChE foi maior em machos em 24 h de exposição e praticamente semelhante entre os grupos após 96 h.

7 CONCLUSÃO

Os resultados desse estudo demonstram que o esgoto sanitário afetou diretamente o organismo dos peixes apresentando alterações nas diversas vias metabólicas identificadas nos transcriptomas hepáticos.

A montagem *de novo* de ambos os transcriptomas hepáticos possibilitaram a identificação de diversas sequências nucleotídicas envolvidas em diferentes vias metabólicas, permitindo a formação de um repositório para futuros estudos nessa espécie.

O efeito de interação entre o tratamento e sexo observados em genes de receptores nucleares (*AhR* e *PXR*), biotransformação (*CYP1A1*, *CYP2K1*, *CYP3A30*, *NQO1*, *UGT1A1*, *GSTa3*, *GSTmu* e *ST1C1*), antioxidantes (*SOD*), transportadores (*ABCC1* e *MDR1*) e envolvidos no sistema endócrino (*SOX9*) sugerem que o sexo é um fator determinante nas respostas dos peixes, podendo ser atribuídos a influências hormonais endógenas. Entretanto, os mecanismos responsáveis pela dependência do fator sexo dos transcritos e das enzimas de biotransformação hepáticas, atividade antioxidantes e funções de transporte estão longe de serem completamente compreendidos.

As alterações nas transcrições e atividades enzimáticas hepáticas nos peixes *P. vivipara* demonstraram a importância do papel metabólico do fígado na manutenção da homeostase frente aos insultos dos xenobióticos.

Os biomarcadores utilizados neste estudo foram eficientes em demonstrar as alterações sofridas pelos peixes quando expostos ao esgoto. Dentre os biomarcadores estudados *GSTa3*

foi o único gene responsivo em ambos os períodos de exposição apresentando efeito de interação (tratamento*gênero), sugerindo-o como um biomarcador prioritário para monitoramento ambiental utilizando *P. vivipara*.

Em ambos os períodos de exposição houve alteração na atividade das enzimas hepáticas, enquanto nas brânquias, a prevalência de resultados significativos ocorreu apenas 96 h após a exposição ao esgoto sanitário. Assim como o observado nas atividades transcricionais, o fator sexo apresentou as maiores alterações nas atividades enzimáticas.

Os resultados apresentados demonstram a importância de se considerar os períodos de exposição e o sexo dos animais como fatores essenciais em trabalhos de exposição, seja em laboratório ou monitoramento ambiental, evitando-se interpretações equivocadas na avaliação de biomarcadores.

8 CAPÍTULO III: ALTERAÇÕES MOLECULARES EM PEIXES *Poecilia vivipara*
(Bloch e Schneider, 1801) **EXPOSTOS AO 4-n-NONILFENOL**

9 INTRODUÇÃO

Diversos poluentes orgânicos encontrados nos ecossistemas aquáticos podem ser absorvidos e causar efeitos deletérios à saúde dos organismos aquáticos e dos humanos. Dentre estes, os alquilfenóis etoxilados (APEOs) são de grande preocupação devido ao seu amplo uso, ubiquidade e efeitos toxicológicos (VIDAL-LIÑÁN et al., 2015). Os APEOs são uma das classes de surfactantes sintéticos efetivos (NIMROD; BENSON, 1996) extensivamente utilizadas com aplicações em diversos setores como agricultura, agroindústria, domésticos, industriais, além de estarem presentes no processamento de alimentos e em diversas formulações de produtos de uso cotidiano (DE BRUIN et al., 2019; HUANG et al., 2019).

A capacidade de se concentrar em diferentes superfícies e formar micelas em soluções é a principal característica dos compostos tensoativos. A estrutura anfifílica da molécula surfactante, que contém uma parte polar (hidrofílica) e uma parte não polar (hidrofóbica), é a razão de sua atividade surfactante. O caráter hidrofílico dos APEOs é devido a cadeia polietoxilada com unidades etoxiladas que podem variar de 1 a 40. A propriedade hidrofóbica oposta é fornecida por alquilfenóis com cadeias de hidrocarbonetos ramificadas contendo oito, nove ou doze átomos de carbono. Desta forma, os APEOs mais comuns são os octilfenóis etoxilados (OPEO), nonilfenóis etoxilados (NPEO) e o dodecilfenóis etoxilados (DOEO) (ACIR; GUENTHER, 2018; XU; PARK; CHAN GYE, 2019).

NPEOs sofrem biodegradação durante os processos de tratamento de esgoto majoritariamente, e parcialmente no ambiente, através da perda dos grupos etóxi, resultando nos nonilfenóis e outros precursores mono- e di- etoxilados (NP1EO, NP2EO), que são mais tóxicos e estrogênicos que os NPEOs (ACIR; GUENTHER, 2018; ADEMOLLO et al., 2018; AHEL; GIGER; KOCH, 1994; SUN et al., 2017).

Dos alquilfenóis, o nonilfenol (NP) é o composto mais utilizado, correspondendo a 80 % do consumo de surfactantes (DE BRUIN et al., 2019). Suas características de composto anfipático e não iônico em água o tornam um produto muito versátil com aplicações nas produções de detergentes, limpadores, emulsificantes, solubilizantes, plasticizantes, lubrificantes, entre uma enorme variedade de outras aplicações (ACIR; GUENTHER, 2018; ADEMOLLO et al., 2018; DAIDOJI et al., 2003; HUANG et al., 2019; SUN et al., 2017; XU; PARK; CHAN GYE, 2019). Devido ao seu amplo uso industrial e doméstico, o NP acaba sendo

encontrado globalmente no meio ambiente aquático devido aos efluentes industriais, esgoto sanitário bruto e efluentes de estações de tratamento de esgoto (HUANG et al., 2019; PRIAC et al., 2014; SUN et al., 2017; XU; PARK; CHAN GYE, 2019), e também já foi detectado em alimentos e água potável (BARAHONA; TURIEL; MARTÍN-ESTEBAN, 2011; HAMLIN; MARCIANO; DOWNS, 2015).

Nonilfenol geralmente é o surfactante encontrado nas maiores concentrações no ambiente aquático, onde podem persistir por décadas devido a sua lenta biodegradação em sedimentos, além de apresentar a maior estrogenicidade dentre todos os metabólitos de APEOs (LARA-MARTÍN; GONZÁLEZ-MAZO; BROWNAWELL, 2012). De fato, o NP pode mimetizar a ação de estrógenos endógenos ao agir como agonista dos receptores de estrógeno bloqueando ou alterando as funções endócrinas em vários estágios de desenvolvimento e reprodução, também afetando a atividade aromatase e as funções do receptor AhR (ACIR; GUENTHER, 2018; ADEMOLLO et al., 2018; REMPEL; SCHLENK, 2008). O efeito mais conhecido do NP é a indução da proteína vitelogenina em peixes (ARUKWE et al., 1998, 2000a; ARUKWE; KULLMAN; HINTON1, 2001; MEUCCI; ARUKWE, 2005), porém outros efeitos na biota foram relatados. Estudos com peixes truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) expostos ao NP demonstraram aumento nos níveis de transcritos dos genes *vitelogenina* e *zona pelúcida-4*, sugerindo que esses genes possuem elementos de resposta ao estrógeno em sua região reguladora (SHELLEY et al., 2012). Os efeitos do NP também podem ser mediados por uma via de modulação gênica alternativa àquela utilizada pelo receptor de estrógeno e alterar outras vias metabólicas (COCCI; MOSCONI; PALERMO, 2013; LARKIN et al., 2002; RUGGERI et al., 2008), entretanto, a interferência do NP em outras vias metabólicas tem recebido menos atenção (THIBAUT et al., 2002).

Com relação ao sistema imune, foi relatado que o NP pode modular as respostas do sistema imune em células de baço murino (YAMASHITA; SUGIURA; KURODA, 2002). Em peixes *Pleuronectes americanus*, o nível de transcritos dos genes *sistema complemento C8b*, *cathepsina L* e *Lectina*, envolvidos em respostas inflamatórias e sistema imune, foram alterados pela exposição ao NP (BALDWIN et al., 2005). Corroborando a hipótese da capacidade do NP alterar sistema imune, Ruggeri e colaboradores (2008) mostraram que a exposição do peixe zebra (*Danio rerio*) ao NP promoveu a alteração do nível de transcritos dos genes *sistema complemento C9* e o *Fator B do sistema complemento*. Não só proteínas do sistema imune inato, mas também uma citocina, *TNF α* , apresentou aumento no nível de transcritos após exposição ao NP em *D. rerio* (JIN et al., 2010). Em nível celular, o NP é capaz de afetar a fagocitose *in*

vivo e afetar a proliferação de linfócitos *in vitro* de truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss* (HÉBERT et al., 2009; SHELLEY; ROSS; KENNEDY, 2012).

Os estudos de efeitos do NP no DNA ainda são incipientes na literatura científica. Entre estes efeitos do NP em DNA de peixes, merecem destaque: o aumento no nível de transcritos de genes envolvidos no controle do ciclo celular, dano ao DNA e apoptose em truta arco-íris (*O. mykiss*) (BARŠIENĖ et al., 2006; SHELLEY et al., 2012); a maior frequência de anomalias nucleares eritrocíticas no robalo europeu (*Dicentrarchus labrax*) (TELES et al., 2004); aumento da frequência de micronúcleos e apoptose em bagre africano (*Clarias gariepinus*) (MEKKAWY; MAHMOUD; SAYED, 2011); aumento da apoptose em espermátocitos e células homólogas as de Sertoli e Leydig em medaka (*Oryzias latipes*) (WEBER et al., 2002) e apoptose durante o desenvolvimento embrionário de *D. rerio* (CHANDRASEKAR et al., 2011). Apesar disso, faltam informações na literatura sobre estudos específicos relacionando os efeitos do NP na expressão de proteínas de reparo, supressoras tumorais e apoptóticas em peixes.

Para a compreensão do modo de ação do NP no metabolismo em peixes, é necessário identificar as principais enzimas envolvidas no processo de biotransformação e avaliar a sua modulação em função da exposição ao NP. Estudos mostram o envolvimento dos citocromos P450, CYP2K-like e CYP2M-like, na hidroxilação de NP em salmão do atlântico (*Salmo salar*) (ARUKWE et al., 2000b; THIBAUT et al., 2002). Outros estudos com *S. salar* expostos ao NP mostraram alteração na atividade de CYP3A e CYP1A1, no nível de transcritos de *CYP3A*, *CYP1A1* e dos fatores de transcrição *PXR* e *AhR* (MEUCCI; ARUKWE, 2006), aumento na atividade das enzimas de biotransformação e do metabolismo de esteroides UDP-glucuronosiltransferase, 6 β -, 16 α - e 17 α progesterona hidroxilase (ARUKWE; FÖRLIN; GOKSØYR, 1997) e ainda a presença de metabólitos glucuronidados e hidroxilados do NP na bile e urina, demonstrando o envolvimento das vias metabólicas de biotransformação de fases I e II (ARUKWE et al., 2000c).

Ainda concernente à biotransformação de fase II, foi observada a depleção de GSH em bacalhau-do-atlântico (*Gadus morhua*) (HASSELBERG et al., 2004; HASSELBERG; MEIER; SVARDAL, 2004), no peixe de água doce *Micropterus salmoides* (HUGHES; GALLAGHER, 2004) e na truta arco-íris *O. mykiss* (UGUZ et al., 2003) após exposição ao NP (LUSHCHAK, 2011). No estudo de Uguz e colaboradores (2003), houve um aumento da atividade GST e

depleção de GSH, possivelmente em razão da excreção de formas oxidadas da glutathione (GSSG). O estudo ainda sugere a inativação oxidativa da enzima glutathione reductase (GR), responsável pela redução da GSSG em GSH (DELEVE; KAPLOWITZ, 1991; LUSHCHAK, 2011).

Os relatos apresentados acima indicam que a via de glutathionação pode participar da biotransformação do NP. Os efeitos do NP podem diminuir a capacidade dos peixes em metabolizar outros xenobióticos quando expostos a misturas complexas. Uma vez que a biotransformação é necessária para detoxificação e excreção de xenobióticos, as alterações da atividade de enzimas de biotransformação de fase I e II são utilizadas como biomarcadores de exposição a diversos xenobióticos em programas de monitoramento ambiental (CAPOLUPO et al., 2017; VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

A presença de alquilfenóis tem sido detectada no ambiente aquático, isto é, nos ecossistemas costeiros, marinho e de água doce, sendo o NP encontrado em oceanos, estuários, lagoas costeiras, lagos, rios, águas superficiais, subterrâneas e em outras fontes de água potável (PRIAC et al., 2014). Órgãos públicos como o Ato Canadense de Proteção Ambiental (CEPA) (BENNIE, 1999), a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) e a Agência Francesa de Águas concernem sobre o Nonilfenol como um poluente prioritário, perigoso e sobre diretrizes de limites de descarte e redução de uso (PRIAC et al., 2014). Outros órgãos internacionais como a Agência do Meio Ambiente do Reino Unido (UKEA), Comissão de Oslo e Paris (OSPAR), Agência do Meio Ambiente do Japão (JEA), USEPA e a Fundação Mundial de Animais Silvestres (WWF) consideram o NP como um composto desregulador endócrino (EDC) (ACIR; GUENTHER, 2018). Na União Européia, desde 2005, todos os membros tiveram que implementar uma diretiva na lei nacional, estipulando que os NPs e NPEOs não poderiam ser postos à venda nos mercados ou utilizados como substância constituinte de preparações em concentrações iguais ou superiores a 0,1 % em massa, regulamentando a maioria das aplicações industriais como formulação de pesticidas, produtos de limpeza, produção têxtil e metalurgia (ACIR; GUENTHER, 2018). Entretanto, no que concerne a Legislação Brasileira através da Resolução CONAMA 357/05 e a Portaria 518 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2004) que legisla sobre a qualidade da água potável, não são contemplados os alquilfenóis. Com uma legislação deficitária, o Brasil não contempla compostos considerados contaminantes emergentes com exceção de pouco mais de 30 pesticidas, e além disso, os valores máximos estabelecidos não consideram os efeitos estrogênicos dos contaminantes (MONTAGNER; VIDAL; ACAYABA, 2017).

Conforme exposto acima, o NP é capaz de interagir negativamente com a biota aquática interferindo nos sistemas endócrino, imune, de biotransformação, e diretamente no DNA. Neste trabalho, buscou-se avaliar os possíveis efeitos do 4-n-nonilfenol na transcrição hepática e gonadal de genes envolvidos no sistema de biotransformação de fase I e II, sistema antioxidante e sistema endócrino, contribuindo para o estabelecimento da espécie *P. vivipara* como um modelo para testes ecotoxicológicos.

10 OBJETIVOS

10.1 Objetivo geral

Avaliar as alterações transcricionais nas vias de biotransformação, antioxidantes e relacionadas à desregulação endócrina, de peixes *Poecilia vivipara* expostos ao 4-n-nonilfenol.

10.2 Objetivos específicos

- 1- Avaliar os níveis de transcritos hepáticos dos genes: *ABCC1*, *AhR*, *CYP1A*, *CYP2K1*, *CYP3A30*, *ER*, *GSTa3*, *GSTMu*, *MRP2*, *NQO1*, *PXR*, *SOD*, *SOX9*, *STIC1*, *UGT1A1*, *VIT* e *ZP4* em peixes machos e fêmeas da espécie *P. vivipara* expostos a duas doses de 4-n-nonilfenol por 24 h;
- 2- Avaliar os níveis de transcritos gonadais dos genes: *ABCC1*, *AhR*, *CYP1A*, *CYP2K1*, *CYP3A30*, *ER*, *GSTa3*, *GSTMu*, *MRP2*, *NQO1*, *PXR*, *SOD*, *SOX9*, *STIC1*, *UGT1A1*, *VIT* e *ZP4* em peixes machos e fêmeas da espécie *P. vivipara* expostos a duas doses de 4-n-nonilfenol por 24 h.

11 METODOLOGIA

11.1 COLETA E ACLIMATAÇÃO DOS ANIMAIS

A coleta dos animais seguiu os mesmos procedimentos descritos no item 5.1 desta tese. Os procedimentos foram aprovados previamente pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade **ICMBio/SISBIO nº 56408-1** e pela Comissão de Ética no Uso de Animais **CEUA UFSC nº 4613161116**.

Os peixes adultos e maturos sexualmente, foram coletados e separados por sexo em dois tanques, onde permaneceram por um período de 90 dias de aclimatação em um sistema de recirculação de água do mar filtrada (0,45 µm) a 21 °C e salinidade 24, aeração constante, alimentação *ad libitum* e fotoperíodo de 12/12 h (claro/escuro). Este procedimento foi necessário para que todos os animais estivessem no mesmo estágio de maturação gonadal (estágio I), e para evitar a cópula e por consequência, fêmeas prenhes.

11.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL 3 e 4

Após o período de aclimatação, nove aquários foram preenchidos com 10 L de água do mar filtrada e salinidade 24 com aeração constante. Foram separados três aquários para formar uma triplicata do grupo Controle, três para o grupo Exposto 1 e os três restantes para o grupo Exposto 2.

11.2.1 Preparação das doses e exposição dos peixes ao 4-n-Nonilfenol

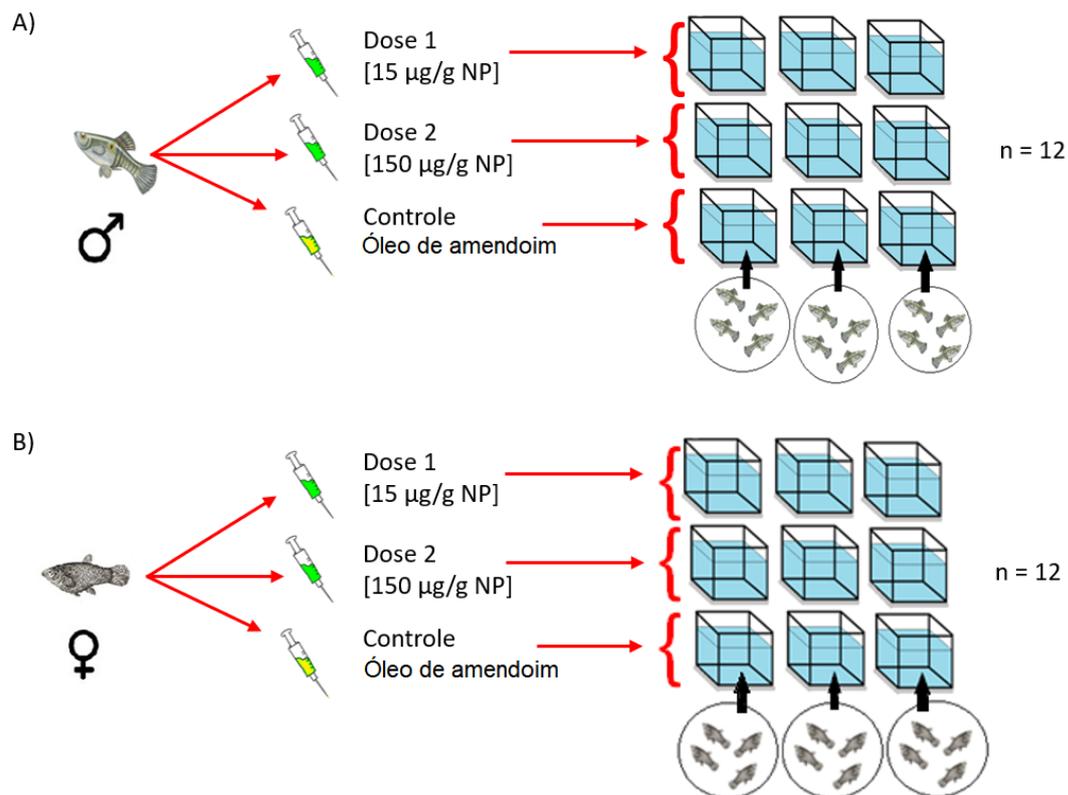
Os peixes utilizados nos delineamentos experimentais 3 e 4 foram expostos ao 4-n-Nonilfenol (NP) (Supelco®) através de uma injeção intraperitoneal utilizando óleo de amendoim como veículo. As doses escolhidas foram baseadas em trabalhos publicados com diferentes espécies de peixes expostos variando entre 1 a 125 mg/Kg em *Salmo salar* (ARUKWE; FÖRLIN; GOKSØYR, 1997; YADETIE; MALE, 2002); 10 a 200 µg g⁻¹ no linguado *Platichthys flesus* (CHRISTENSEN; KORSGAARD; BJERREGAARD, 1999); 1 a 100 µg g⁻¹ em truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss* (NADERI et al., 2015). As doses também foram pensadas considerando valores já reportados de bioacumulação em tecido de *Lepomis macrochirus* e *Micropterus dolomieu* entre 3,3 (limite de detecção) e 29,1 ng NP/g em peso

úmido (KANNAN et al., 2003) e em valores de NP encontrados em água doce entre 0,7 e 15 ng/L podendo ultrapassar 600 µg/L (PRIAC et al., 2014).

Com base nos dados da literatura, optou-se por utilizar uma dose de 15 µg/g e uma segunda dose 10 vezes maior de 150 µg/g de NP diluído em óleo de amendoim.

Uma vez que as doses de NP foram preparadas, os peixes aclimatados foram pesados e em seguida receberam administração via intraperitoneal (IP) de seus respectivos volumes. No primeiro experimento de exposição ao 4-n-Nonilfenol foram utilizados apenas machos, sendo quatro animais por aquário em triplicata para cada grupo: Exposto 1, dose de 15 µg/g de NP, Exposto 2, dose de 150 µg/g de NP e grupo Controle com administração IP de óleo de amendoim (n=12) (**Figura 19**).

Figura 19. Delineamento experimental da exposição de peixes *P. vivipara* a duas doses de 4-n-Nonilfenol via intraperitoneal por 24 horas. A) Exposição de machos; B) Exposição de fêmeas.



Fonte: Acervo do Autor.

Os animais permaneceram nos aquários por 24 h e em seguida foram eutanasiados. Foram coletados e armazenados em tubos individuais fígado, e gônadas dos animais. Os tecidos excisados foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido para a realização dos ensaios moleculares.

Um segundo experimento de exposição semelhante ao anterior foi realizado nos mesmos moldes, porém, substituindo os machos por fêmeas (**Figura 19B**).

11.3 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL

As amostras de fígado e gônadas coletadas individualmente em cada um dos delineamentos experimentais ilustrados acima tiveram seus RNAs totais extraídos pelo reagente Qiazol (Qiagen) seguindo as orientações do fabricante. A qualidade e concentração das amostras resultantes foram observadas por espectrofotometria a 260, 280 e 320 nm em Nanodrop (Nanodrop).

11.4 SÍNTESE DE cDNA

Um μg de cada amostra de RNA total dos fígados e gônadas foi utilizado para transcrição reversa pelo kit QuantiTect Reverse Transcription (Qiagen). As concentrações foram medidas em Nanodrop (Nanodrop) seguindo-se pela diluição das amostras para alíquotas de 100 ng (12,5 ng/ μL).

A partir de um pool das amostras de cada tecido foram confeccionadas quatro curvas padrão de cDNA: curva de cDNA de fígados de machos; fígados de fêmeas; gônadas de machos e gônadas de fêmeas. Cada pool foi quantificado em Nanodrop (Nanodrop) e diluído em série para as concentrações de 500; 250; 125; 62,5 e 31,25 ng. As curvas de cDNA resultantes foram então utilizadas para as análises de qPCR.

11.5 ANÁLISE DE qPCR

As reações de qPCR foram realizadas no termociclador Rotor Gene 6000 (Qiagen) com o kit *QuantiFastTMSYBR[®] Green PCR* (Qiagen) em rotor de 72 poços Rotor-Disc 72 (Qiagen). A concentração final de cada reação consistiu em 100 ng de cDNA, 1 μM para cada

iniciador (senso e antissenso) e Master Mix QuantiFast SYBR Green (HotStarTaq *Plus* DNA Polimerase, Tampão e mix de dNTP) 1X.

O programa de ciclagem consistiu na ativação da polimerase por 5 minutos a 95 °C, seguidos de 40 ciclos de desnaturação por 10 s a 95 °C e anelamento/extensão com aquisição de fluorescência por 30 s a 60 °C. O programa incluiu ao final da ciclagem uma curva de dissociação elevando-se 1 °C a cada 5 s iniciando em 55 °C até 95 °C.

Os genes de interesse e referência foram os seguintes: *aril hidrocarboneto (AhR)*, *Receptor de estrogênio alfa (ER)*, *Receptor pregnano X (PXR)*, *Citocromos P450 das família 1A, 2K1 e 3A30 (CYP1A, CYP2K1 e CYP3A30)*, *Glutathione S-transferase A3 (GSTA3)*, *Glutathione S-transferase Mu 3 (GSTMu3)*, *Fator de transcrição SOX9 (SOX9)*, *Vitelogenina-1 (VIT)*, *Zona pelúcida glicoproteína 4 (ZP4)*, *Proteína associada a multirresistência 1 (ABCC1)*, *Proteína associada a multirresistência 2 (MRP2)*, *Uridina difosfato glicuronosiltransferase 1A1 (UGT1A1)*, *Fator de alongação 2 (EF2)*, *Proteína ribossomal 40S S2 (40S2)* e *Proteína ribossomal 40S S11 (40S11)*. Estes iniciadores também foram utilizados nos delineamentos de exposição ao esgoto sanitário 33 %. Desta forma, não foram necessárias padronizações iniciais e suas sequências podem ser observadas na **Tabela 1** do capítulo 1. Independentemente, os genes que apresentaram eficiências entre 95 e 105 %, coeficiente de correlação (R^2) maior que 0,97 e único ponto de dissociação foram considerados adequados para as análises. Estes valores foram calculados diretamente no programa Rotor-Gene Q – Series Software (v 2.3.1).

Foram testados como normalizadores os genes *EF2*, *40S2* e *40S11* pelo método 2^{-Cq} (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008), que serão chamados como genes referência (BUSTIN et al., 2009), para utilização no método do Cq comparativo ou $\Delta\Delta Cq$. Dentre outros pressupostos deste método, a eficiência da PCR deve ser próxima a 1 e a eficiência do gene alvo deve ser similar ao gene de controle referência (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008). Em casos onde o método 2^{-Cq} não foi suficiente para encontrar um gene referência, foi utilizado o RefFinder, uma ferramenta desenvolvida para avaliar e triar genes referência com base nos conjuntos de dados experimentais (XIE et al., 2012). Esta ferramenta integra a maioria dos principais programas computacionais disponíveis como geNorm, Normfinder, BestKeeper, além do método $\Delta\Delta Cq$ comparativo (ANDERSEN; JENSEN; ØRNTOFT, 2004; PFAFFL et al., 2004; SILVER et al., 2006; VANDESOMPELE et al., 2002) para ranquear e comparar os genes testados como candidatos a referência. Baseado nos rankings de cada programa, o RefFinder atribui um peso

apropriado a cada gene individual e calcula a média geométrica destes pesos resultando em uma classificação geral final.

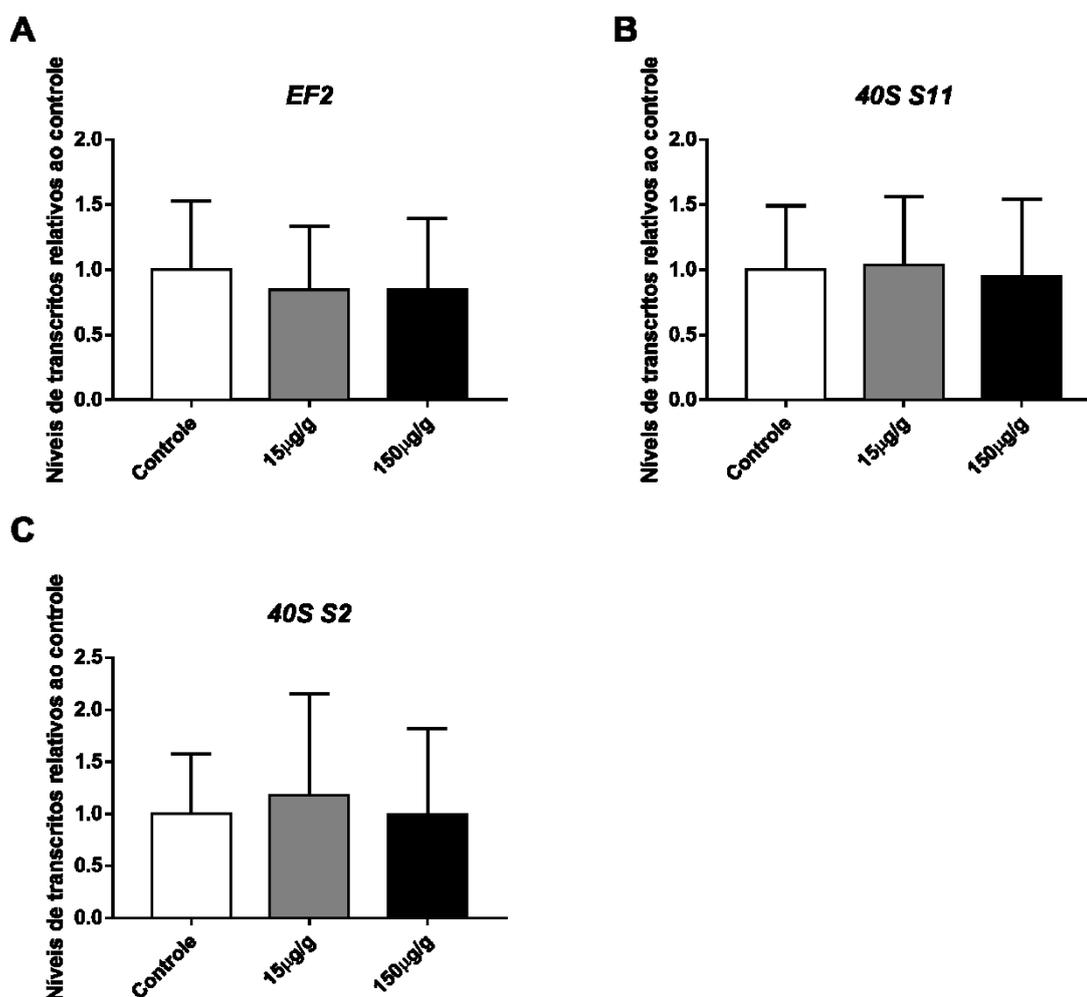
11.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente quanto a presença de dados discrepantes pelos testes de ROUT e Grubbs. Após a remoção dos *outliers*, os dados foram testados para verificação da normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. Os dados paramétricos foram avaliados pela análise de variância ANOVA de uma via com pós teste de Dunnett e os não paramétricos, pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de múltipla comparação de Dunn's comparando-se grupo controle 24 h contra exposto 1 (dose de 15 µg/g) e exposto 2 (dose de 150 µg/g). Todos os testes assumiram nível de significância para $p \leq 0,05$ e foram calculados utilizando-se o programa GraphPad Prism 7.0.

12 RESULTADOS

Inicialmente foram testados os genes candidatos a referência para normalização da técnica de qPCR para cada gênero em fígados. Para as fêmeas, os três genes testados *EF2*, *40S2* e *40S11*, passaram no teste do 2^{-Cq} , isto é, não houve variações na transcrição gênica entre os grupos (**Figura 20**). Como os três genes foram considerados adequados como referência, optou-se por utilizar a média geométrica dos três para normalização.

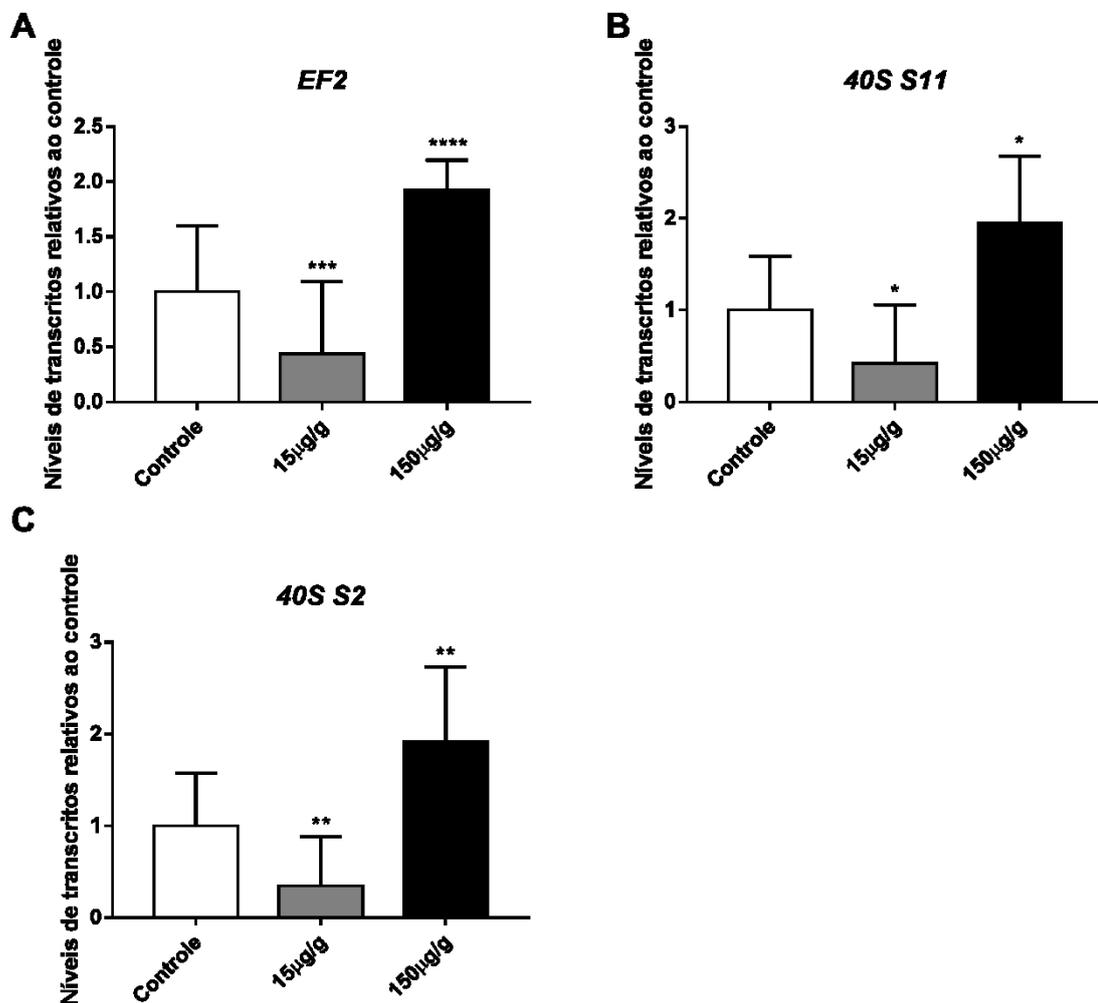
Figura 20. Transcrição dos genes candidatos a referência em fígado de *P. vivipara* fêmeas expostas ao 4-n-Nonilfenol em doses de 15 $\mu\text{g/g}$ e 150 $\mu\text{g/g}$ por 24 h e o seu respectivo grupo controle. (A) fator de elongação 2 (*EF2*), (B) proteína ribossomal 40S S11 (*40S11*) e (C) proteína ribossomal 40S S2 (*40S2*). Os dados estão apresentados em média \pm desvio padrão.



Fonte: Acervo do Autor.

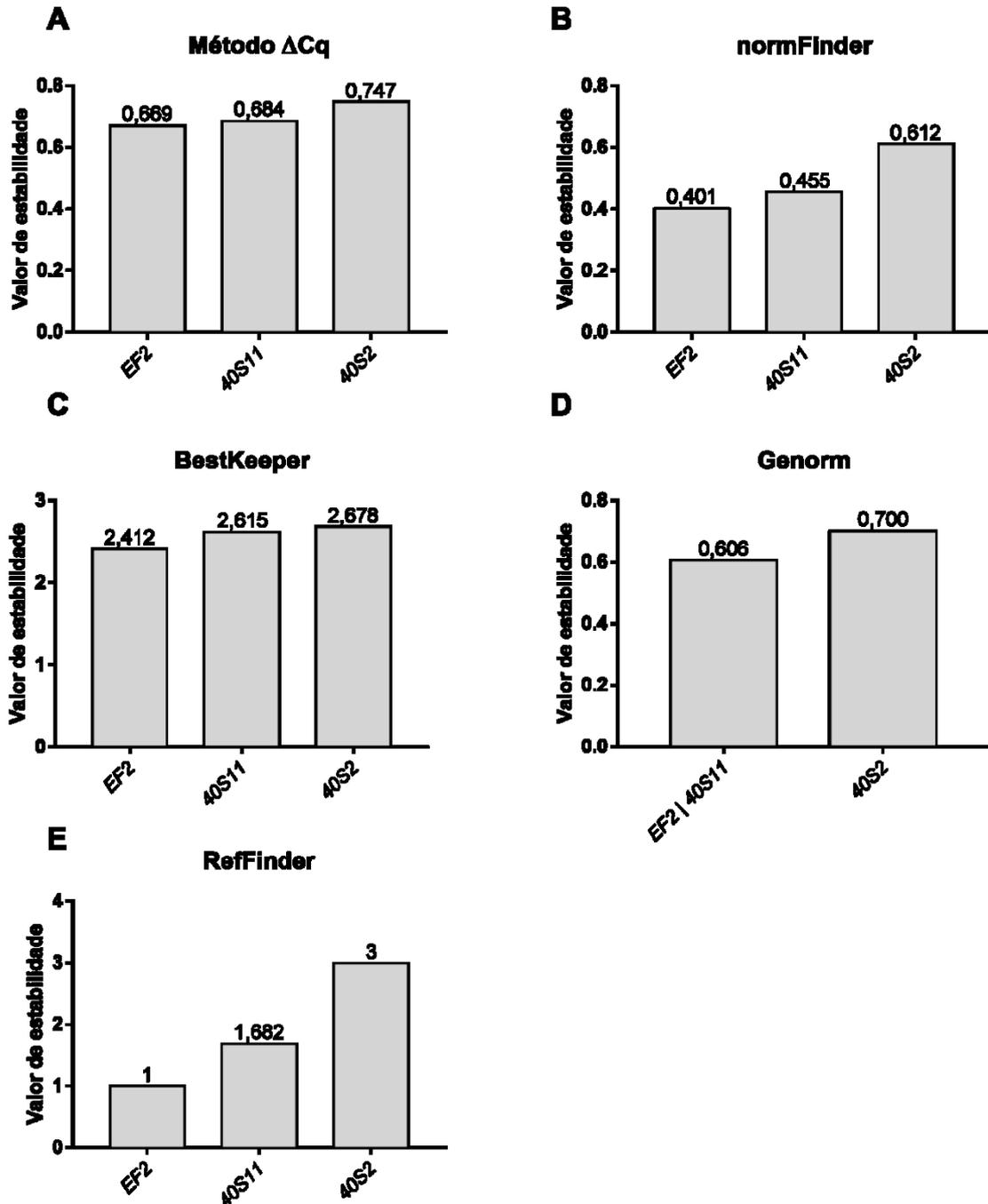
Para os machos, os três genes testados apresentaram variações significativas entre os grupos (**Figura 21**). Desta forma foi necessário utilizar a ferramenta RefFinder para avaliar a estabilidade da transcrição gênica dos genes candidatos (**Figura 21**). Ao final do ranqueamento o gene com maior estabilidade foi o *EF2* que por consequência foi o gene utilizado para normalização da técnica (**Figura 22E**).

Figura 21. Transcrição dos genes candidatos a referência em fígado de *P. vivipara* machos expostos ao 4-n-Nonilfenol em doses de 15 µg/g e 150 µg/g por 24 h e o seu respectivo grupo controle. (A) fator de elongação 2 (*EF2*), (B) proteína ribossomal 40S S11 (*40S11*) e (C) proteína ribossomal 40S S2 (*40S2*). O asterisco (*) significa diferença significativa ($p < 0,05$). Os dados estão apresentados em média \pm desvio padrão.



Fonte: Acervo do Autor.

Figura 22. Análise da estabilidade da transcrição gênica dos genes referência *fator de alongação 2* (EF2), *proteína ribossomal 40S S2* (40S2) e *proteína ribossomal 40S S11* (40S11) em fígados de *P. vivipara* machos, após 24 h de exposição ao 4-n-Nonilfenol em doses de 15 µg/g e 150 µg/g. Os valores de estabilidade dos genes candidatos foram calculados pelo método ΔCq (A), normFinder (B), BestKeeper (C), Genorm (D) e RefFinder (E). Valores menores indicam maior estabilidade da transcrição.



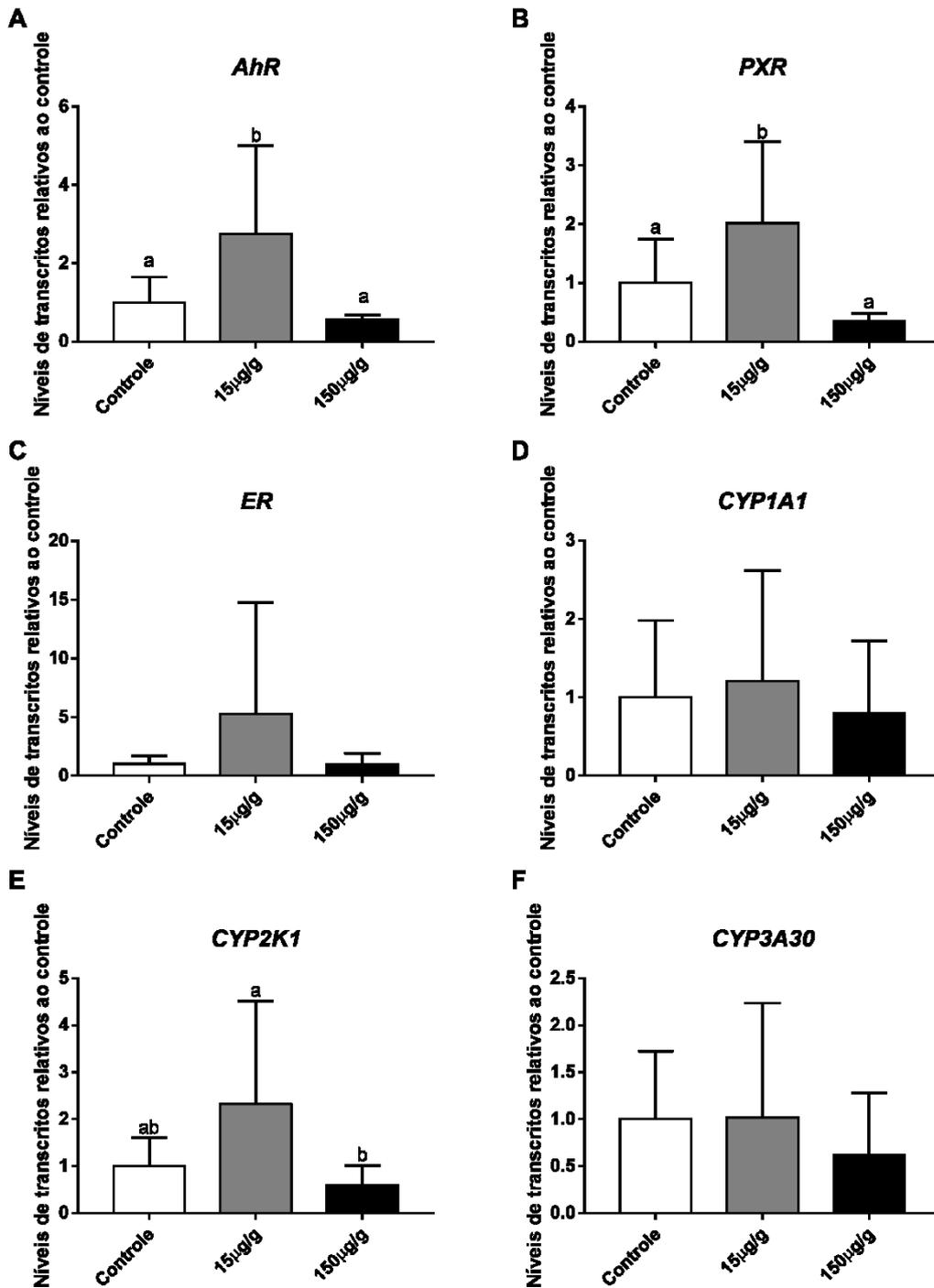
Fonte: Acervo do Autor.

Os resultados da transcrição hepática das fêmeas submetidas a doses intraperitoneais de 4-n-Nonilfenol (15 µg/g e 150 µg/g) por 24 horas podem ser observados nos gráficos das **Figuras 23 e 24**. A transcrição dos genes referentes aos receptores nucleares *AhR*, *PXR* e *ER* foram maiores no grupo de fêmeas submetidas à menor dose, 15 µg/g de 4-n-Nonilfenol, sendo 2,7 vezes significativamente maior que o controle para *AhR*, 2 vezes maior para *PXR* e 5,3 vezes maior para *ER*, este último sem diferença estatística significativa (**Figura 23A, B e C**, respectivamente).

Para os genes de biotransformação de fase I, referentes à família dos *CYPs*, não houve diferenças significativas para as isoformas *CYP1A1*, *CYP2K1* e *CYP3A3A* (**Figura 23D, E e F**, respectivamente). Nos genes de biotransformação de fase II, representados neste estudo por *UGT1a1*, não houve diferenças significativas entre os grupos expostos e o controle (**Figura 24A**), e para o gene *GSTa3*, houve uma maior transcrição no grupo exposto a dose menor, sendo 2,6 vezes maior que o controle (**Figura 24B**).

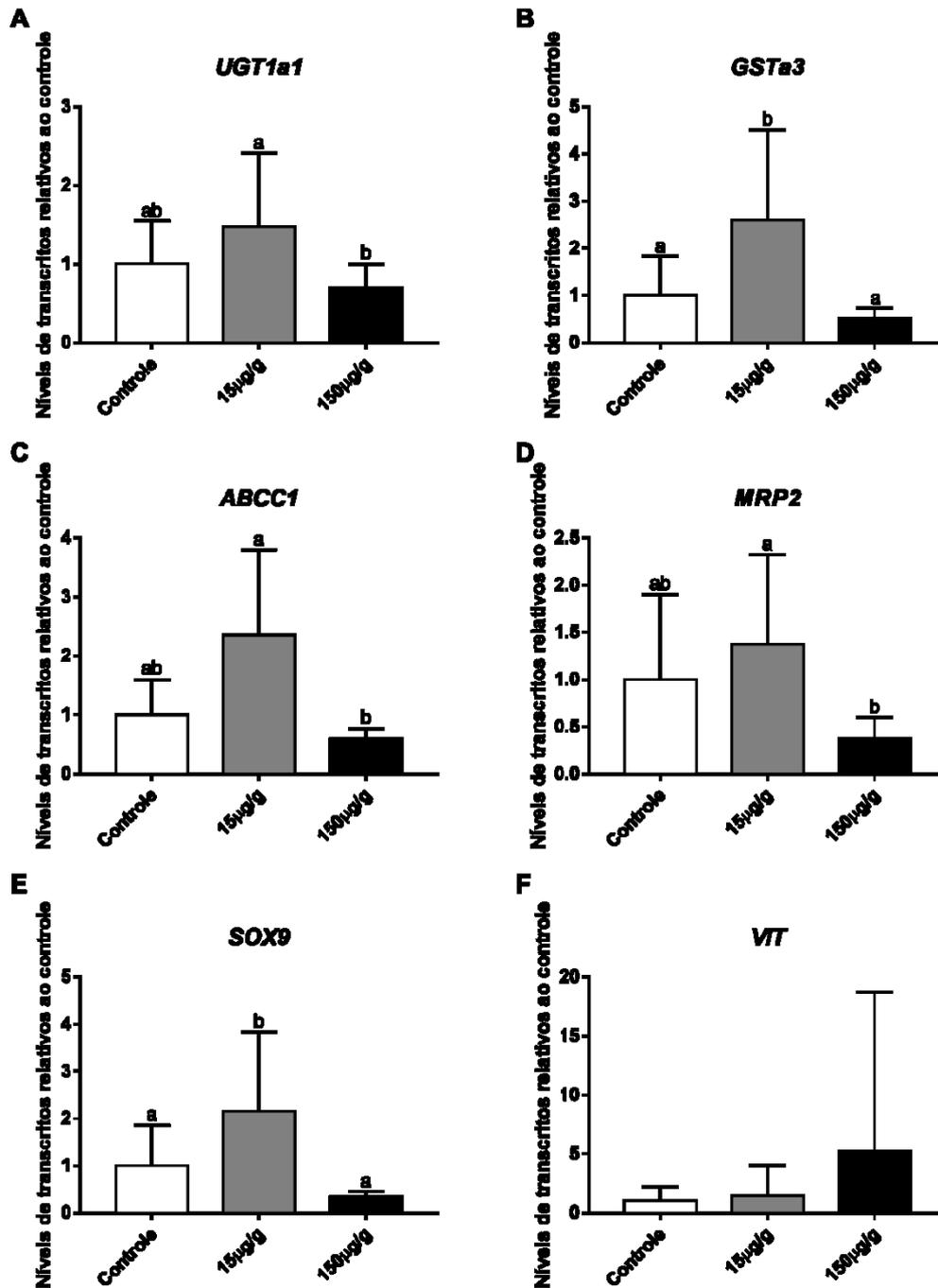
Não houve diferenças transcricionais significativas para os transportadores *ABCC1* e *MRP2* entre os grupos expostos e o controle (**Figura 24C e D**), bem como para o gene relacionado à desregulação endócrina *VIT* cuja maior transcrição foi observada no grupo exposto a maior dose de 150 µg/g de 4-n-Nonilfenol (**Figura 24F**). Ainda em relação à desregulação endócrina, o gene *SOX9* apresentou uma maior transcrição significativamente diferente do controle nos animais expostos a menor dose com aproximadamente 2,1 vezes mais transcritos (**Figura 24E**).

Figura 23. Transcrição gênica dos receptores nucleares e fase I de biotransformação em fígados de peixes *P. vivipara* fêmeas expostas ao 4-n-Nonilfenol em doses de 15 µg/g e 150 µg/g por 24 h e o seu respectivo grupo controle. Os níveis dos transcritos dos genes *AhR*, *PXR*, *ER*, *CYP1A1*, *CYP2K1* e *CYP3A30* estão normalizados pela média geométrica dos genes referência *EF2*, *40S11* e *40S2*, e relativizados pelo grupo controle. Os dados estão apresentados em média ± desvio padrão. Letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).



Fonte: Acervo do Autor.

Figura 24. Transcrição dos genes de biotransformação de fase II, transportadores e relacionados à desregulação endócrina em fígados de peixes *P. vivipara* fêmeas expostas ao 4-n-Nonilfenol em doses de 15 µg/g e 150 µg/g por 24 h e o seu respectivo grupo controle. Os níveis dos transcritos dos genes *UGT1a1*, *GSTa3*, *ABCC1*, *MRP2*, *SOX9* e *VIT* estão normalizados pela média geométrica dos genes referência *EF2*, *40S11* e *40S2*, e relativizados pelo grupo controle. Os dados estão apresentados em média ± desvio padrão. Letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).



Fonte: Acervo do Autor.

Em machos expostos sob as mesmas condições experimentais que as fêmeas podemos observar os resultados da transcrição hepática dos genes de interesse nas **Figuras 25 e 26**.

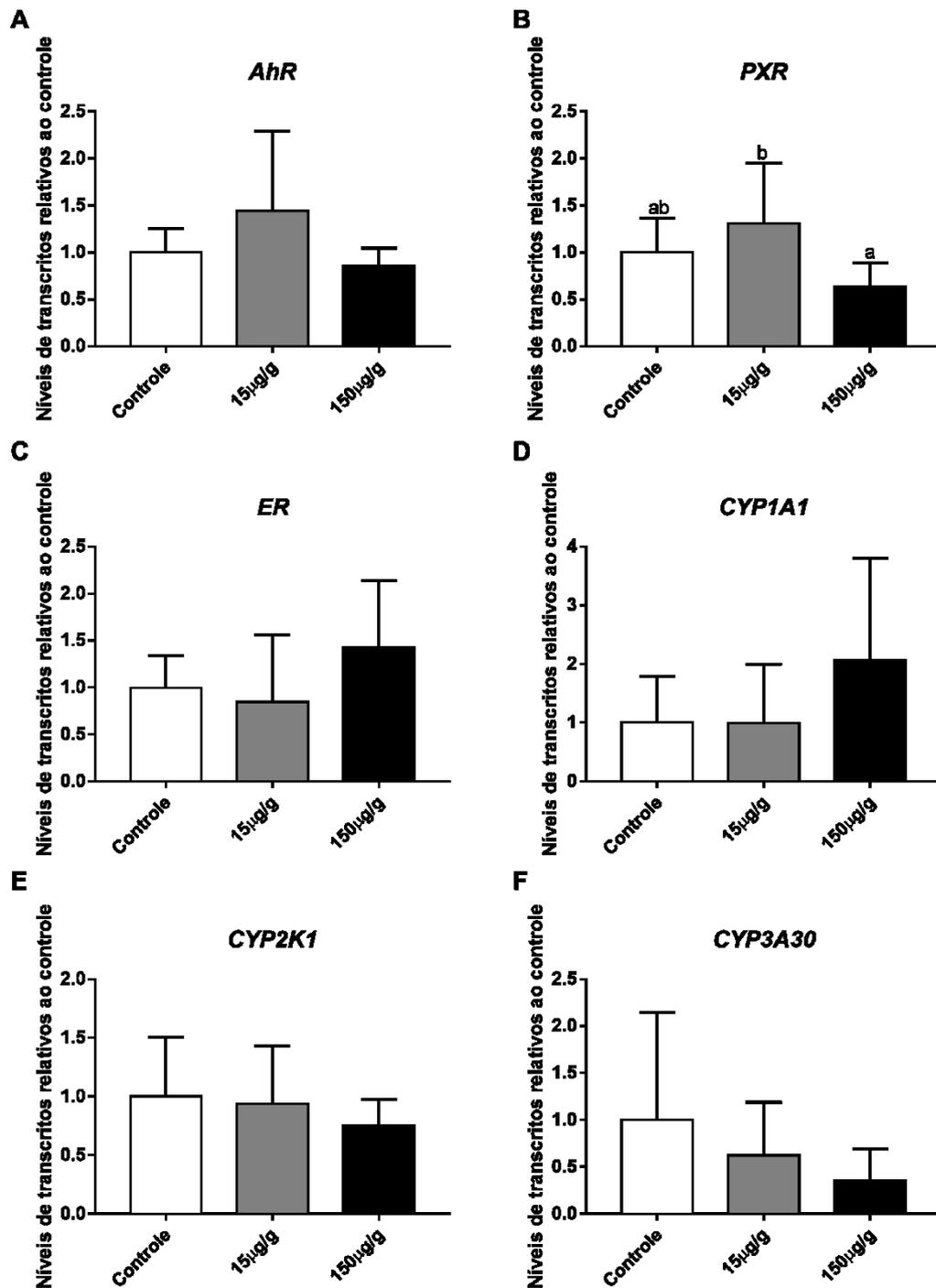
Concernente aos receptores nucleares, *AhR*, *PXR* e *ER* não apresentaram diferenças significativas nas transcrições hepáticas dos peixes dos grupos expostos e controle (**Figura 25 A, B e C**).

Os genes de biotransformação de fase I *CYP1A1*, *CYP2K1* e *CYP3A30* não apresentaram diferenças significativas na transcrição após 24 h de exposição (**Figura 25D, E e F**). Assim como nas fêmeas, a transcrição de *UGT1a1* em machos não apresentou diferenças significativas (**Figura 26A**). Por outro lado, o gene de biotransformação *GSTa3* teve sua transcrição diminuída 1,8 vez no grupo exposto à menor dose de nonilfenol, e 1,4 vez no grupo exposto à maior dose, ambos em relação ao controle (**Figura 26B**).

Para os genes transportadores, as diferenças observadas foram no grupo de animais expostos à menor dose, com *ABCC1* induzido 2 vezes mais que o controle (**Figura 26C**) e *MRP2* reprimido 1,7 vez também em relação ao controle (**Figura 26D**).

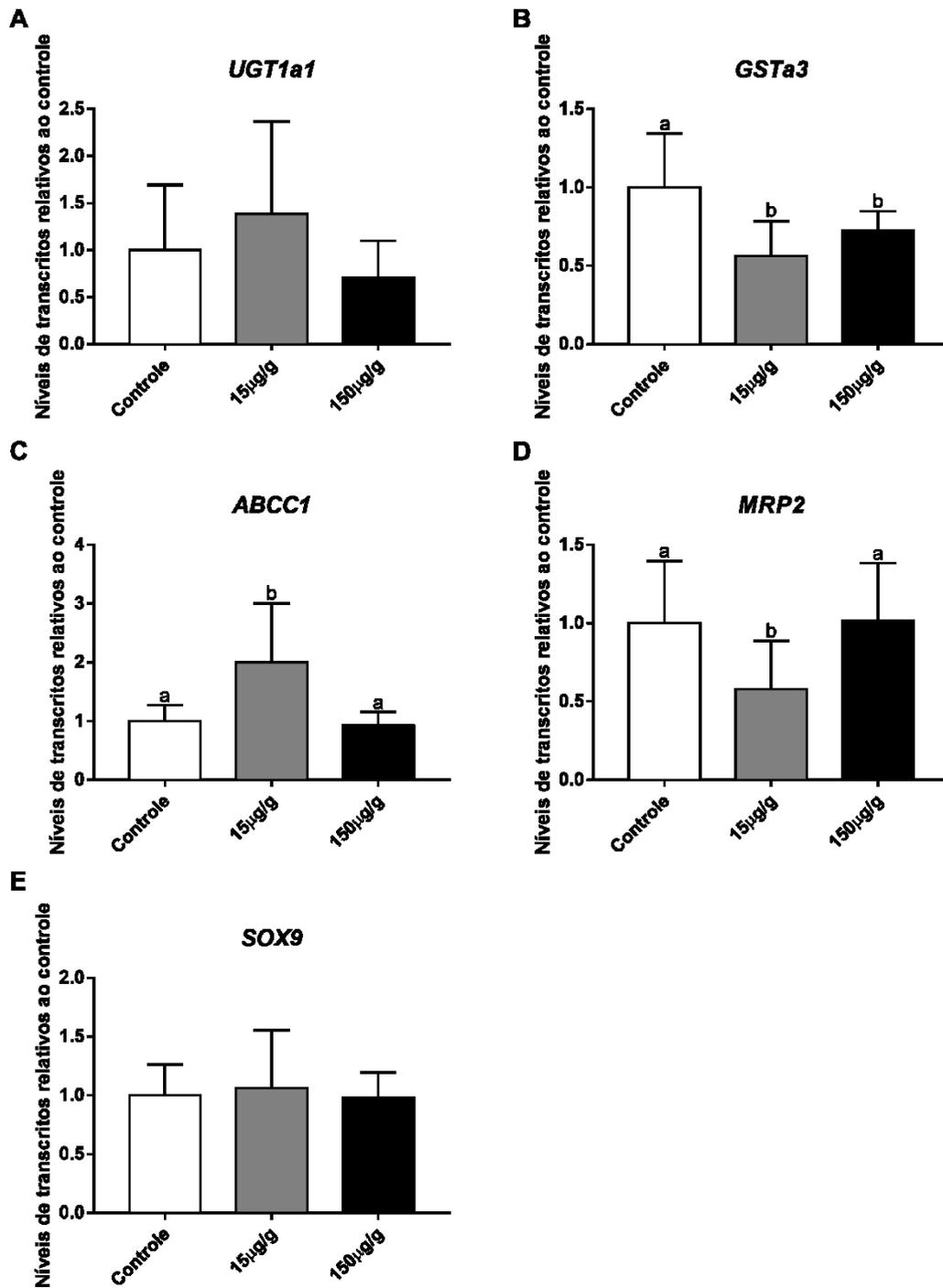
Quanto aos genes relacionados à desregulação endócrina, não foram observadas diferenças significativas para *SOX9* (**Figura 26E**). O gene *VIT* foi desconsiderado desta análise em fígados por apresentar valores de Cq abaixo do limite de detecção considerado aceitável para a técnica.

Figura 25. Transcrição gênica dos receptores nucleares e fase I de biotransformação em fígados de peixes *P. vivipara* machos expostos ao 4-n-Nonilfenol em doses de 15 µg/g e 150 µg/g por 24 h e o seu respectivo grupo controle. Os níveis dos transcritos dos genes *AhR*, *PXR*, *ER*, *CYP1A1*, *CYP2K1* e *CYP3A30* estão normalizados pelo gene referência *EF2* e relativizados pelo grupo controle. Os dados estão apresentados em média ± desvio padrão. Letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).



Fonte: Acervo do Autor.

Figura 26. Transcrição dos genes de biotransformação de fase II, transportadores e relacionados à desregulação endócrina em fígados de peixes *P. vivipara* machos expostos ao 4-n-Nonilfenol em doses de 15 µg/g e 150 µg/g por 24 h e o seu respectivo grupo controle. Os níveis dos transcritos dos genes *UGT1a1*, *GSTa3*, *ABCC1*, *MRP2* e *SOX9* estão normalizados pelo gene referência *EF2* e relativizados pelo grupo controle. Os dados estão apresentados em média ± desvio padrão. Letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

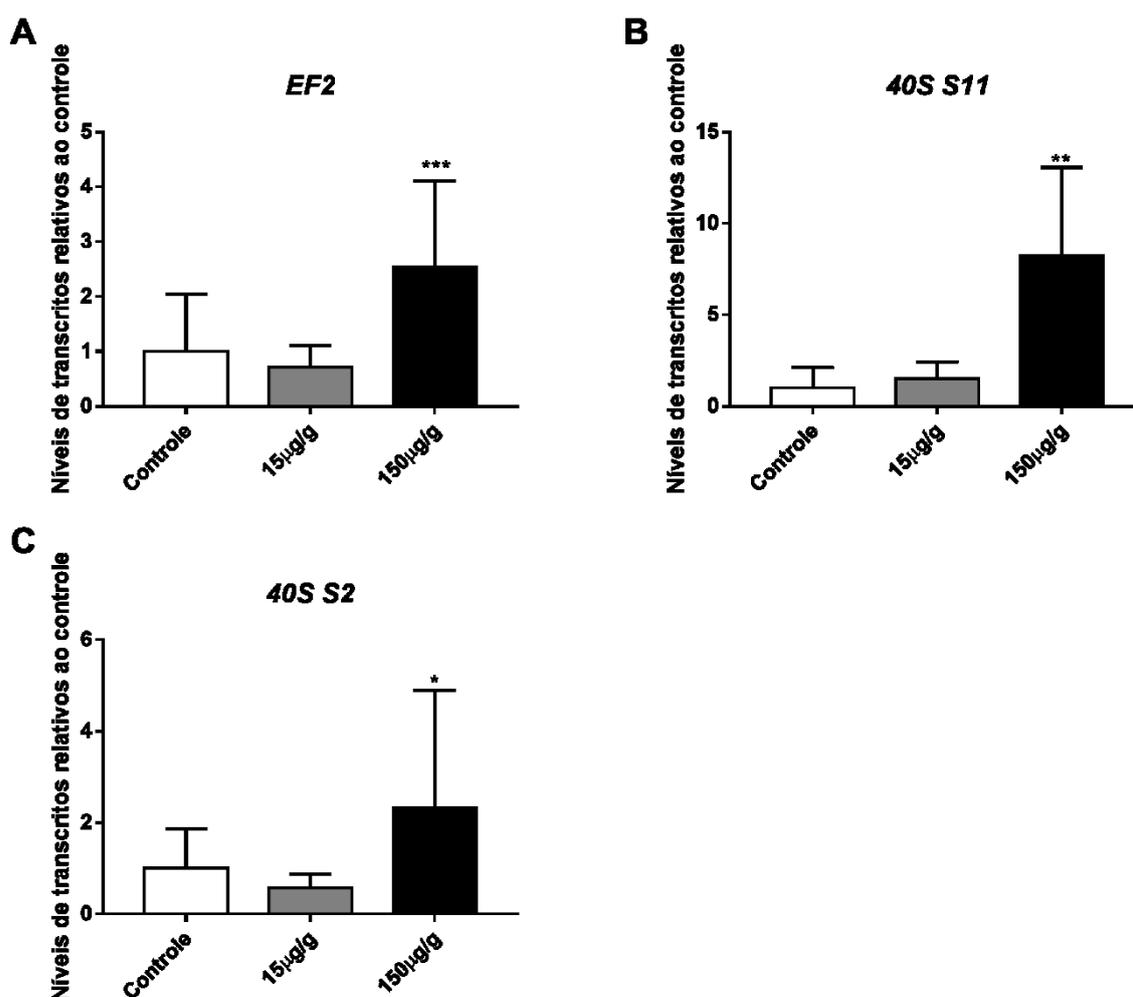


Fonte: Acervo do Autor.

Mais uma vez os genes referência candidatos foram testados para normalização dos resultados de qPCR obtidos para as gônadas de *P. vivipara*. Para as fêmeas os três genes testados não passaram no teste do 2^{-Cq} (**Figura 27**), o que exigiu um teste de avaliação de estabilidade da transcrição gênica pelo software RefFinder. Os resultados do teste para os genes candidatos a normalizadores estão apresentados nas **Figuras 27 e 28**.

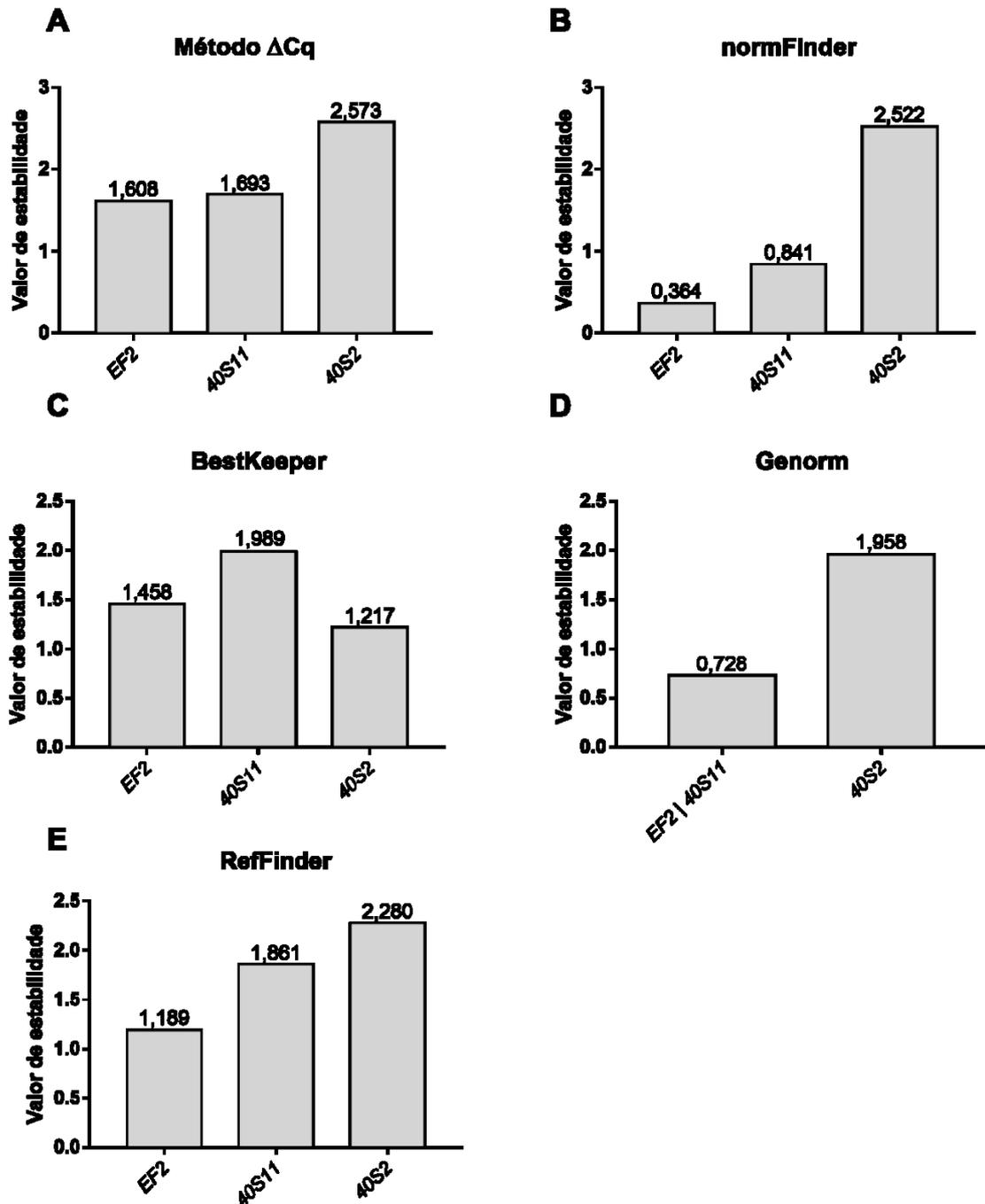
De acordo com o resultado da estabilidade gênica, o gene referência utilizado para normalização dos valores de Cq em gônadas de fêmeas foi o *EF2* (**Figura 28E**).

Figura 27. Transcrição dos genes candidatos a referência em gônadas de *P. vivipara* fêmeas expostas ao 4-n-Nonilfenol em doses de 15 $\mu\text{g/g}$ e 150 $\mu\text{g/g}$ por 24 h e o seu respectivo grupo controle. **(A)** fator de alongação 2 (*EF2*), **(B)** proteína ribossomal 40S S11 (*40S11*) e **(C)** proteína ribossomal 40S S2 (*40S2*). O asterisco (*) significa diferença significativa ($p < 0,05$). Os dados estão apresentados em média \pm desvio padrão.



Fonte: Acervo do Autor.

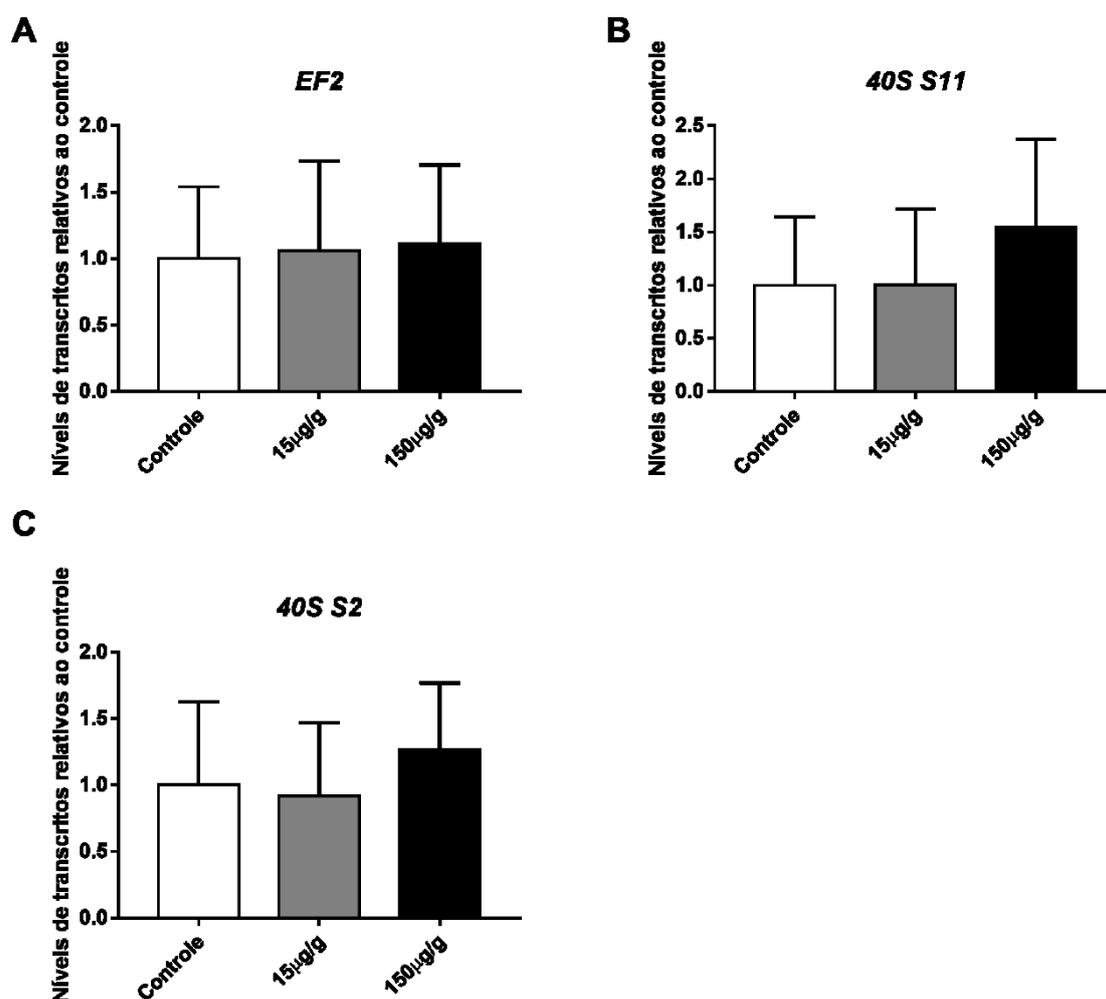
Figura 28. Análise da estabilidade da transcrição gênica dos genes referência *fator de alongação 2* (EF2), *proteína ribossomal 40S S2* (40S2) e *proteína ribossomal 40S S11* (40S11) em gônadas de *P. vivipara* fêmeas, após 24 h de exposição ao 4-n-Nonilfenol em doses de 15 µg/g e 150 µg/g. Os valores de estabilidade dos genes candidatos foram calculados pelo método ΔCq (A), normFinder (B), BestKeeper (C), Genorm (D) e RefFinder (E). Valores menores indicam maior estabilidade da transcrição.



Fonte: Acervo do Autor.

Para a normalização da técnica de qPCR em gônadas de *P. vivipara* machos, os três genes candidatos foram considerados adequados, portanto, foi considerada a média geométrica de *EF2*, *40S2* e *40S11* como normalizador (**Figura 29**).

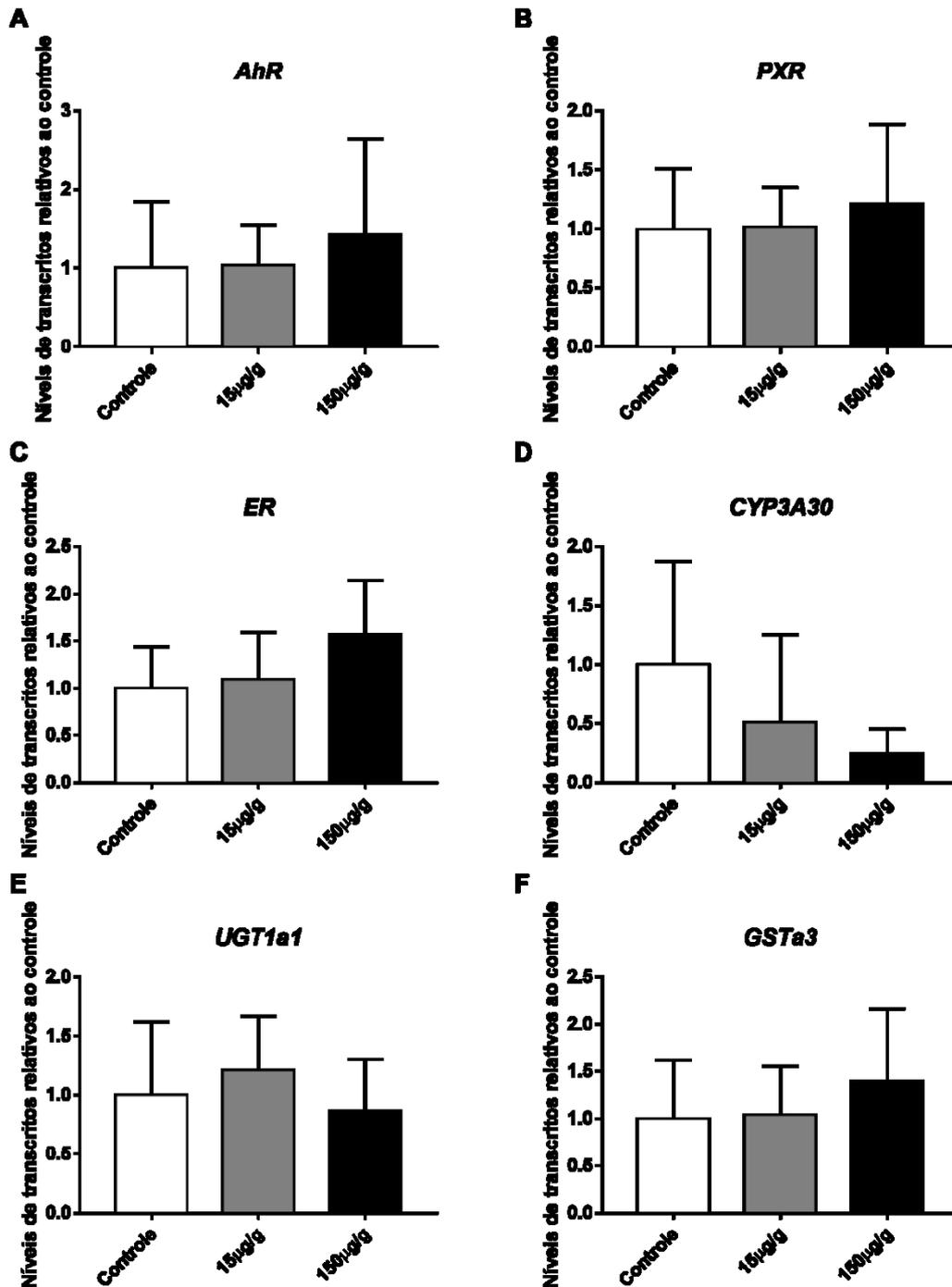
Figura 29. Transcrição dos genes candidatos a referência em gônadas de *P. vivipara* machos expostos ao 4-n-Nonilfenol em doses de 15 $\mu\text{g/g}$ e 150 $\mu\text{g/g}$ por 24 h e o seu respectivo grupo controle. **(A)** fator de alongação 2 (*EF2*), **(B)** proteína ribossomal 40S S11 (*40S11*) e **(C)** proteína ribossomal 40S S2 (*40S2*). Os dados estão apresentados em média \pm desvio padrão.



Fonte: Acervo do Autor.

Os genes analisados foram os mesmos utilizados nos ensaios com fígados. Destes, as isoformas *CYP1A1* e *CYP2K1* não foram incluídas por não cumprirem os requisitos mínimos para análise. Os resultados da transcrição gênica em gônadas de fêmeas de *P. vivipara* podem ser observados na **Figura 30**.

Figura 30. Transcrição gênica dos receptores nucleares e biotransformação de fase I e II em gônadas de peixes *P. vivipara* fêmeas expostas ao 4-n-Nonilfenol em doses de 15 µg/g e 150 µg/g por 24 h e o seu respectivo grupo controle. Os níveis dos transcritos dos genes *AhR*, *PXR*, *ER*, *CYP3A30* e *GSTa3* estão normalizados pelo gene referência *EF2* e relativizados pelo grupo controle. Os dados estão apresentados em média ± desvio padrão.



Fonte: Acervo do Autor.

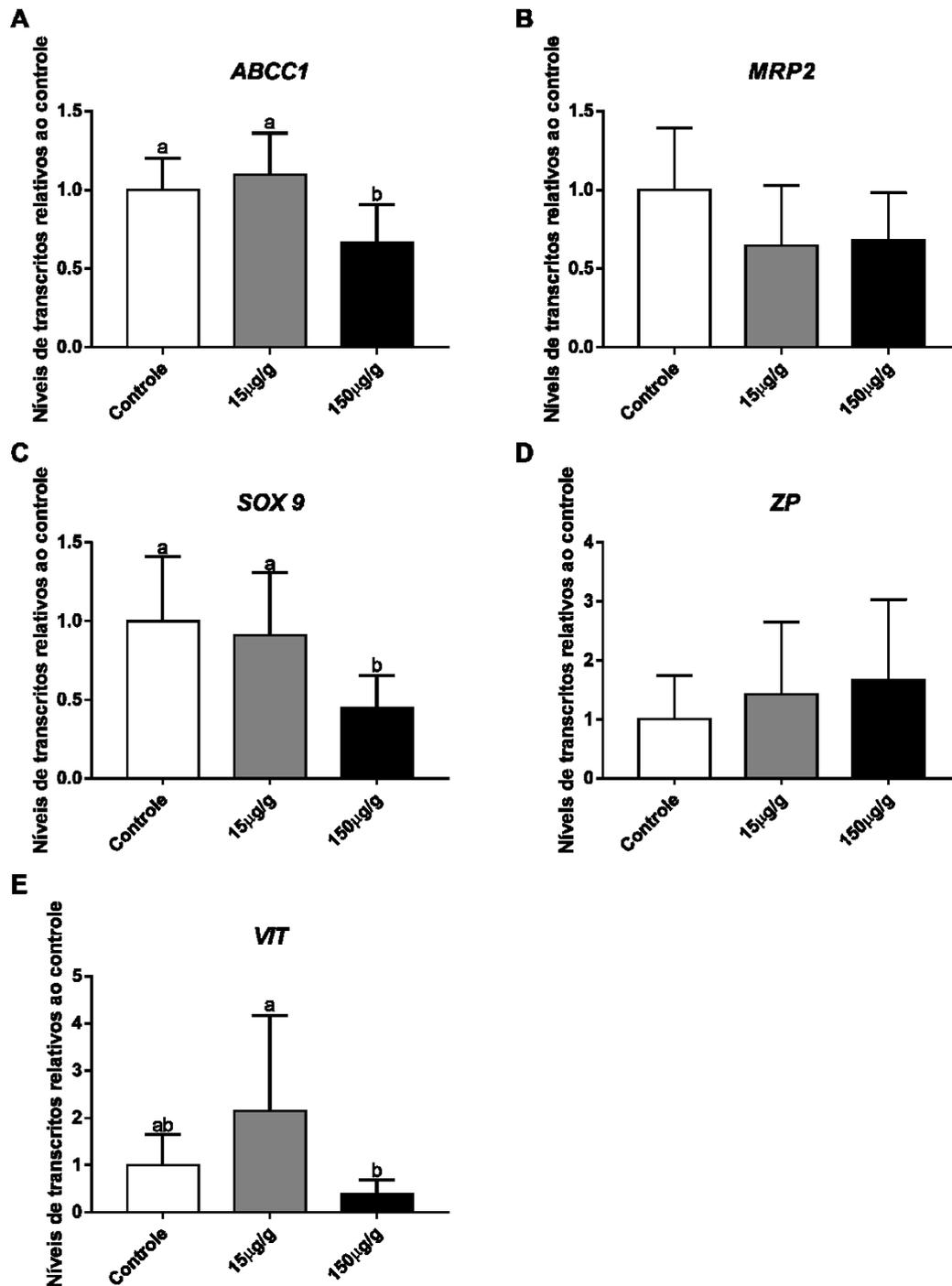
Aparentemente os iniciadores desenhados para os genes *CYP1A1* e *CYP2K1*, a partir de sequências de fígados anelam em mais de uma região em amostras de gônadas, o que justifica mais de um produto encontrado. Em contrapartida, o gene que codifica para ZP, que não foi possível analisar em fígados, em gônadas mostrou-se dentro dos requisitos, apesar de não apresentar diferenças significativas entre os grupos analisados (**Figura 31D**).

Os demais genes analisados não apresentaram diferenças significativas, exceto para o gene transportador *ABCC1* que diminuiu a transcrição 1,2 vez no grupo exposto a maior dose de 4-n-nonilfenol (150 µg/g) em relação ao controle (**Figura 31A**), e para *SOX9*, também diminuído no grupo exposto de maior dose (150 µg/g) com 2,8 vezes menos transcritos que o grupo controle (**Figura 31C**).

Em gônadas de machos além dos *CYPs* citados anteriormente, a isoforma *CYP3A30* também foi descartada das análises, juntamente com o gene *ZP*. Estes dois genes não cumpriram os requisitos mínimos necessários para a análise da transcrição diferencial. Os valores de Cq ficaram abaixo do limite de detecção dentro do aceitável para a técnica, o que acabou por invalidar os resultados obtidos evitando interpretações errôneas de efeitos biológicos possivelmente associados a um viés técnico.

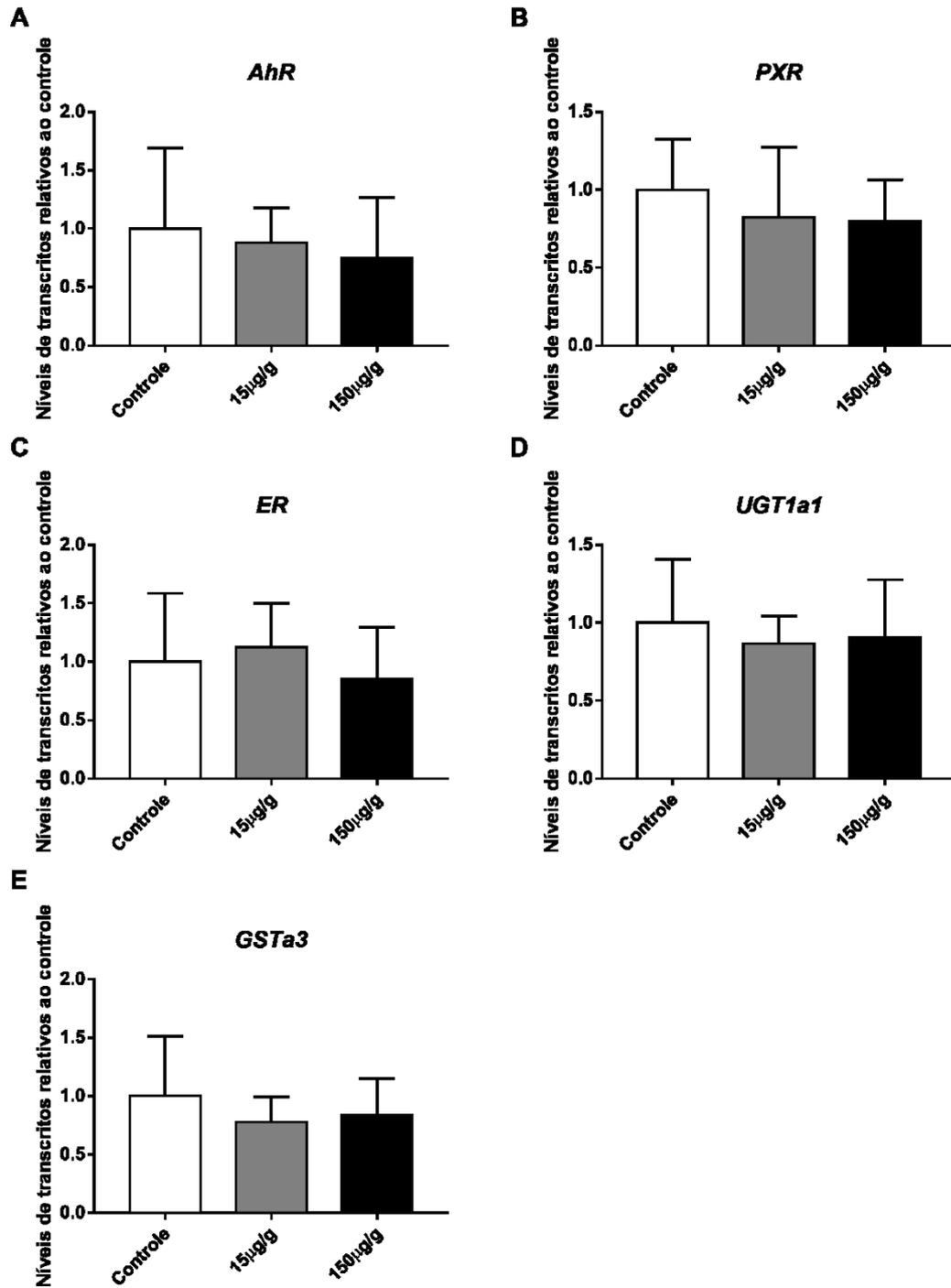
Em gônadas de machos de *P. vivipara* expostos ao 4-n-nonilfenol, não houve diferenças significativas na transcrição de nenhum dos genes analisados (**Figuras 32 e 33**).

Figura 31. Transcrição dos genes transportadores e relacionados a disruptores endócrinos em gônadas de peixes *P. vivipara* fêmeas expostas ao 4-n-Nonilfenol em doses de 15 $\mu\text{g/g}$ e 150 $\mu\text{g/g}$ por 24 h e o seu respectivo grupo controle. Os níveis dos transcritos dos genes *ABCC1*, *MRP2*, *SOX9*, *ZP* e *VIT* estão normalizados pelo gene referência *EF2* e relativizados pelo grupo controle. Os dados estão apresentados em média \pm desvio padrão. Letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).



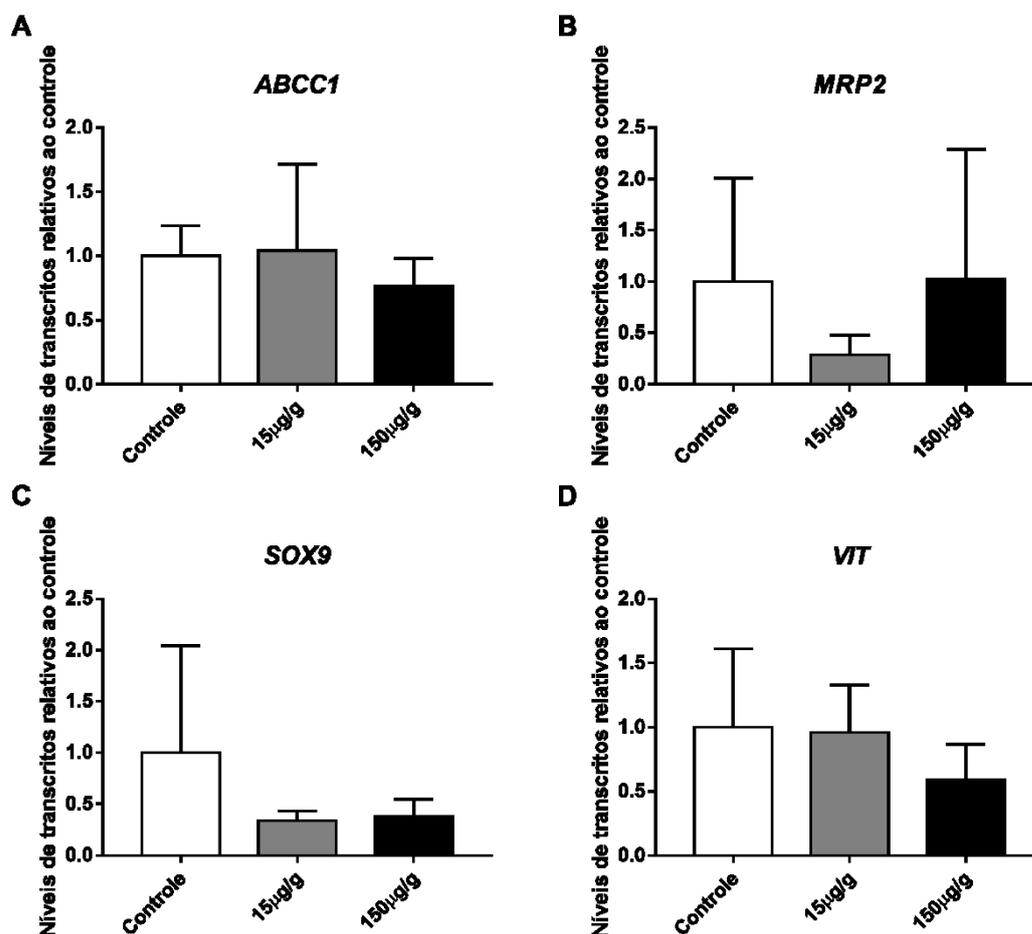
Fonte: Acervo do Autor.

Figura 32. Transcrição gênica dos receptores nucleares e biotransformação de fase II em gônadas de peixes *P. vivipara* machos expostos ao 4-n-Nonilfenol em doses de 15 $\mu\text{g/g}$ e 150 $\mu\text{g/g}$ por 24 h e o seu respectivo grupo controle. Os níveis dos transcritos dos genes *AhR*, *PXR*, *ER*, *UGT1a1* e *GSTa3* estão normalizados pela média geométrica dos genes referência *EF2*, *40S11* e *40S2*, e relativizados pelo grupo controle. Os dados estão apresentados em média \pm desvio padrão.



Fonte: Acervo do Autor.

Figura 33. Transcrição dos genes transportadores e relacionados a desreguladores endócrinos em gônadas de peixes *P. vivipara* machos expostos ao 4-n-Nonilfenol em doses de 15 µg/g e 150 µg/g por 24 h e o seu respectivo grupo controle. Os níveis dos transcritos dos genes *ABCC1*, *MRP2*, *SOX9* e *VIT* estão normalizados pela média geométrica dos genes referência *EF2*, *40S11* e *40S2*, e relativizados pelo grupo controle.



Fonte: Acervo do Autor.

13 DISCUSSÃO

A exposição de peixes *P. vivipara* a duas doses de 4-n-nonilfenol (NP) resultou em alterações na transcrição hepática dos animais. Em fêmeas, foi observado o aumento da transcrição dos genes *AhR*, *PXR*, *SOX9* e *GSTa3* em fígados dos peixes submetidos a menor dose (15 µg/g), enquanto em machos, nessa mesma dose, houve aumento da transcrição gênica de *ABCC1* e diminuição da transcrição de *MRP2*. A *GSTa3* hepática em machos diminuiu em

ambas as doses (15 e 150 $\mu\text{g/g}$). Apesar de apresentar respostas opostas, *GSTa3* foi o único gene alterado significativamente nos dois sexos e o único com alterações na dose maior para o fígado. Em contraste, nas gônadas, foram observadas apenas duas alterações significativas, em fêmeas e na maior dose (150 $\mu\text{g/g}$). *ABCC1* e *SOX9* apresentaram uma diminuição da transcrição.

O *PXR* é importante na regulação de enzimas de detoxificação que estão envolvidas na metabolização e eliminação de NP (MOTA et al., 2011). Além disso, estudos demonstraram a ativação de *PXR* por NP em camundongos (MASUYAMA et al., 2000), ratos, humanos (MOTA et al., 2011) e peixes (MEUCCI; ARUKWE, 2006). Mortensen e Arukwe (2007) encontraram *ER* induzido em hepatócitos de salmão expostos ao NP em uma concentração de 5 μM por 48 h, em contraste, *AhR*, *CYP1A* e *UGT* não apresentaram diferenças. Em um segundo experimento, *ER*, *AhR* e *UGT* foram inibidos após 24, 48 e 72 h. Em *Xenopus laevis*, NP em concentrações dependentes aumentou a atividade AhR (XU; PARK; CHAN GYE, 2019). Em *Salmo salar*, NP causou uma diminuição na transcrição hepática de *CYP1A1* e *AhR* após três dias de exposição, e após sete, um aumento de *AhR*, *PXR*, *CYP1A1* e *CYP3A* (MEUCCI; ARUKWE, 2006). De fato, NPs ligam-se a receptores de estrógeno e podem bloquear ou alterar funções endócrinas endógenas em vários estágios de desenvolvimento e reprodutivos, também afetando as funções do receptor AhR (ADEMOLLO et al., 2018; BONEFELD-JØRGENSEN et al., 2007). Os peixes expostos ao NP deste trabalho apresentaram um aumento da transcrição hepática de *PXR* e *AhR* em fêmeas na dose menor (15 $\mu\text{g/g}$), o que pode sugerir a participação destas duas vias na detoxificação de NP em *P. vivipara*, entretanto, não foram observadas alterações significativas para estes dois genes em machos.

A atividade GST em brânquias de *Mytilus galloprovincialis* expostos por 15, 20 e 30 dias ao NP em concentrações de 50, 75 e 100 mg.L^{-1} foi aumentada significativamente (VIDAL-LIÑÁN et al., 2015). Em fígados de ratos expostos ao NP, foram observados aumentos significativos das atividades de enzimas de biotransformação de fase II, GST e UGT (LIU et al., 2017). Estes estudos evidenciam a atividade de GST na detoxificação de NP. No presente estudo, apesar de não ter sido medida a atividade GST em peixes, foi observado um aumento na transcrição de *GSTa3* em fígado de fêmeas, indicando uma possível atividade de conjugação de glutathiona com metabólitos de NP. Entretanto, em fígado de machos, houve uma inibição dos transcritos nas duas doses de NP. A diminuição da transcrição de *GSTa3* pode ser o resultado de uma depleção dos fatores de indução e/ou uma falha no metabolismo em sintetizar precursores, ou controlar a ativação das moléculas de GSH, isto é, em um curto período de

exposição, NP leva a um aumento da transcrição de *Nrf2* e uma indução das atividades de biotransformação de fase II, entretanto, a glutathiona e o ácido glicurônico endógenos são consumidos e suas sínteses são afetadas pelo NP (LIU et al., 2017). Do mesmo modo que em machos de *P. vivipara*, uma dose de 5 mg/Kg de NP resultou em um decréscimo das concentrações de mRNA de *GSTa* em *Micropterus salmoides* (HUGHES; GALLAGHER, 2004).

Com relação aos genes que codificam para transportadores, a habilidade de inibir o nível proteico de transportadores ABC em organismos aquáticos já foi descrita para contaminantes emergentes como os produtos de higiene pessoal, fármacos, pesticidas, fragrâncias, entre outros, entretanto ainda não se sabe as consequências que esta quimiossensibilização terá em níveis de população e ecossistema (FERREIRA; COSTA; REIS-HENRIQUES, 2014). Dentre os membros dos *transportadores ABC*, pelo menos cinco estão potencialmente envolvidos na mediação de resistência a drogas (*ABCC1* ou *MRP1*, *ABCC2* ou *MRP2*, *ABCC3*, *ABCC4* e *ABCC5*), destes, *ABCC1* e *MRP2* são os melhores caracterizados e com evidências em modelos animais de função de defesa nos órgãos (FERREIRA; COSTA; REIS-HENRIQUES, 2014).

Os transportadores *ABCC1* e *ABCC2* já foram demonstrados expressos em fígados de tilápia (COSTA et al., 2012), robalo europeu (FERREIRA et al., 2014), truta (ASSEF; DI PRINZIO; HORAK, 2019), zebrafish (LONG; LI; CUI, 2011), tainha vermelha (DELLA TORRE et al., 2010), entre outros teleósteos, o que corrobora o importante papel destes genes no processo de detoxificação e cooperação com as enzimas de biotransformação de fase I e II (FERREIRA; COSTA; REIS-HENRIQUES, 2014). Reações de biotransformação de fase I envolvem a introdução de grupos polares no composto químico, enquanto as reações de fase II compreendem conjugações de compostos endógenos como glutathiona, sulfato ou ácido glicurônico. Os produtos do metabolismo de biotransformação são removidos das células por transportadores de drogas que aceitam substratos menos hidrofóbicos, que incluem outros tipos de proteínas ABC (FLORES; MANAUTOU; RENFRO, 2017; LUCKENBACH; FISCHER; STURM, 2014). Além do papel de transportar metabólitos conjugados, *ABCC1* e *ABCC2* também são capazes de transportar GSH livre (FERREIRA; COSTA; REIS-HENRIQUES, 2014; LUCKENBACH; FISCHER; STURM, 2014), enquanto GSH por sua vez, pode estimular

o transporte de outros substratos por ABCC1 e ABCC2 (LUCKENBACH; FISCHER; STURM, 2014).

Em *P. vivipara*, *ABCC1* apresentou um aumento na transcrição em fígado de machos na menor dose de NP (15 µg/g) concomitantemente com a diminuição da transcrição de *MRP2* (*ABCC2*) e de *GSTa3* nas duas doses. Em fêmeas, houve uma diminuição dos transcritos de *ABCC1* em gônadas na maior dose de NP (150 µg/g). Este resultado em machos encontra-se de acordo com o aumento da transcrição observada de *ABCC1* em machos expostos ao esgoto sanitário 33 % por 96 h. Em contrapartida, em brânquias de tilápias expostas a B[a]P por 14 dias foi observado o oposto: um aumento nos níveis de mRNA de *ABCC2* e ausência de diferenças para *ABCC1* (LUCKENBACH; FISCHER; STURM, 2014). Segundo Luckenbach, Fischer e Sturm (2014), compostos conjugados com glutatona são os principais substratos para os transportadores ABCC. A ausência de respostas nos genes de biotransformação de fase I, bem como a diminuição da transcrição de *GSTa3*, de fase II, provavelmente não estão garantindo a detoxificação necessária para manutenção da homeostase dos animais expostos. Esta baixa atividade relacionada aos baixos níveis de transcritos acarretaria uma menor quantidade de metabólitos conjugados a serem excretados com o auxílio dos *transportadores ABC*, que por consequência explicaria a transcrição de *MRP2* diminuída. Entretanto, um aumento dos transcritos de *ABCC1* nestas mesmas condições pode refletir um caminho preferencial por esta via para efluxo de metabólitos nos fígados de machos expostos. Mota e colaboradores (2011) sugerem que *MRP2* é um gene envolvido na detoxificação de NP enquanto Daidoji e colaboradores (2003) sugerem que estes transportadores não têm a capacidade de transportar nonilfenol-glicuronidado por conta do formato ou hidrofobicidade da cadeia alquila longa (C9), apenas alquilfenóis de cadeias alquilas curtas.

Muitos estudos têm investigado os efeitos da exposição de compostos químicos nos níveis de transcrição dos *transportadores ABC* em tecidos de peixes teleósteos, mas apesar de estes trabalhos auxiliarem na elucidação da regulação destes transportadores em peixes, é necessário enfatizar que a relação entre a abundância de mRNA, expressão das proteínas transportadoras e a atividade transportadora propriamente dita não é necessariamente direta, refletindo a complexidade dos diferentes modos de regulação genômicos e não-genômicos dos transportadores ABC (LUCKENBACH; FISCHER; STURM, 2014).

O fator de transcrição *SOX9* é amplamente aceito como o regulador mestre da condrogênese em vertebrados, além de estar envolvido no desenvolvimento de diversos outros órgãos e tecidos como o pâncreas e intestino (PAGANELLI et al., 2014; YUAN et al., 2014).

Adicionalmente, a sua superexpressão foi relatada em carcinoma hepatocelular (PAGANELLI et al., 2014).

O nonilfenol ocasiona toxicidade e injúria hepática, incluindo morte celular de hepatócitos, estresse oxidativo e inflamação em ratos (JUBENDRADASS et al., 2012; KAZEMI et al., 2016; KOUROUMA et al., 2015). Em peixes *Chalcalburnus tarichi*, há relatos de aumento da apoptose em fígados e gônadas de fêmeas (KAPTANER; ÜNAL, 2011). Em tilápias *Oreochromus spilurs*, a exposição ao NP levou a bioacumulação, biomagnificação, alteração da estrutura hepática, com lise, perda de núcleo, necrose e esteatose hepática, sendo que estes efeitos tornaram-se mais pronunciados em doses maiores (ABDULLA BIN-DOHAISH, 2012). Fan e colaboradores (2018) reportaram que eventos inflamatórios em fígado de camundongos e respostas apoptóticas aumentaram a transcrição do gene *SOX9*. Em embriões de *D. rerio*, houve um aumento da transcrição de *SOX9* quando comparado ao controle no grupo exposto a concentração de 2 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de NP, e uma inibição na maior concentração 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (SUN et al., 2017). A exposição de *P. vivipara* ao NP na menor dose ocasionou um aumento da transcrição hepática desse gene em fêmeas, justamente a dose onde ocorreram a maior parte das alterações transcricionais. Provavelmente as alterações transcricionais observadas no fígado das fêmeas expostas ao NP correspondem a uma resposta fisiológica para manutenção da homeostase frente às possíveis injúrias sofridas e processo inflamatório induzido, ainda que estes parâmetros não tenham sido medidos.

Apesar de um aumento na transcrição hepática, nas gônadas de fêmeas houve uma diminuição da transcrição de *SOX9*. Yuan e colaboradores (2014) apontaram que em ovários de *Gobiocypris rarus* expostos por três dias ao EE2 entre 5 e 125 ng/L, houve uma diminuição dos transcritos de *SOX9* quando comparados ao controle. Essa diminuição foi associada com a possibilidade de EE2 ligar-se ao ER α e então o ER α ligar-se a região promotora de *SOX9* suprimindo a transcrição gênica, o que já foi observado em modelo murino (YUAN et al., 2014). Esta pode ser uma das possibilidades para os resultados observados em gônadas de fêmeas de *P. vivipara*, sendo que o NP é um xenoestrógeno com um grupo fenólico que mimetiza o anel A do 17 β -estradiol que lhe permite ligar-se aos ER (BAKER; LATHE, 2018; RASTGAR et al., 2019). Além disso, conforme observado na exposição de *P. vivipara* ao esgoto sanitário 33 %, após 96 h, as fêmeas apresentaram um aumento da transcrição do gene em fígados, possivelmente relacionada aos compostos miméticos de estrógenos.

14 CONCLUSÕES

Apesar do NP ser considerado um xenoestrógeno, os efeitos observados nesse estudo parecem mais relacionados à injúria hepática, sem indicação de um potencial estrogênico comumente atribuído ao NP. As maiores alterações transcricionais foram observadas em fêmeas enquanto em machos, que possuem naturalmente menor concentração de estrógeno, não foram observadas alterações relevantes, com exceção da diminuição de *GSTa3* hepático em ambas as doses. A ausência de alterações transcricionais mais marcantes pode estar relacionada ao curto período de exposição ao NP.

Ficou evidente a importância de se buscar isoformas tecido-específicas para as análises de qPCR, visto que alguns dos iniciadores, como *CYP1A1* e *CYP2K1*, cujos genes são oriundos do transcriptoma hepático, não funcionaram para estudos nas gônadas. A utilização de isoformas específicas para gônadas possibilitaria maior especificidade e sensibilidade da análise.

A exposição ao NP em duas doses de relevância ambiental foi suficiente para causar alterações transcricionais em peixes *P. vivipara*. Essas alterações a curto prazo e em baixas doses podem servir como indicadores precoces de processos deletérios.

A espécie *P. vivipara* mais uma vez mostrou-se um organismo apto para ser utilizado como sentinela em programas de biomonitoramento.

15 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

No presente estudo foram gerados os primeiros transcriptomas hepáticos do peixe *P. vivipara*, a partir do sequenciamento RNA-Seq. Os resultados obtidos são um grande avanço na manutenção da espécie como um promissor modelo de organismo sentinela em estudos de ecotoxicologia, e nas informações nucleotídicas já produzidas para a espécie.

Também foram apresentados os primeiros estudos de exposição da espécie a xenobióticos levando em consideração o fator sexo. Este conhecimento quanto ao modo de resposta de biomarcadores em relação ao gênero é fundamental para evitar interpretações equivocadas quanto aos efeitos dos poluentes.

As estratégias de sequenciamento NGS neste trabalho foram bem-sucedidas, porém é importante levar em conta a aplicação de cada plataforma. Em estudos futuros, recomenda-se utilizar leituras ‘curtas’ mais longas e pareadas, como as geradas pelo Illumina, para a montagem do transcriptoma, enquanto as leituras curtas simples, como as geradas pelo Ion Torrent, sejam utilizadas para mapeamento e expressão diferencial, quando um genoma ou transcriptoma referência seja disponível.

Por fim, a quantidade de informação gerada neste trabalho pelos dois sequenciamentos NGS poderão ser revisitados ilimitadas vezes, seja para estudar diferentes vias metabólicas, estudar filogenias, ou simplesmente para desenhar iniciadores específicos dos genes anotados. Além disso, as leituras brutas estarão disponíveis em bancos de dados públicos, possibilitando qualquer pesquisador utilizar o potencial destes dados conforme a demanda.

REFERÊNCIAS

ABBASPOUR, K. C.; ROUHOLAHNEJAD, E.; VAGHEFI, S.; SRINIVASAN, R.; YANG, H.; KLØVE, B. A continental-scale hydrology and water quality model for Europe: Calibration and uncertainty of a high-resolution large-scale SWAT model. **Journal of Hydrology**, v. 524, p. 733–752, 2015.

ABDULLA BIN-DOHAISH, E. J. The effects of 4-nonylphenol contamination on livers of Tilapia fish (*Oreochromis spilurs*) in Jeddah. **Biological Research**, v. 45, n. 1, p. 15–20, 2012.

ABESSA, D. M. S.; CARR, R. S.; RACHID, B. R. F.; SOUSA, E. C. P. M.; HORTELANI, M. A.; SARKIS, J. E. 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.

ACIR, I.-H.; GUENTHER, K. Endocrine-disrupting metabolites of alkylphenol ethoxylates – A critical review of analytical methods, environmental occurrences, toxicity, and regulation. **Science of The Total Environment**, v. 635, p. 1530–1546, 2018.

ADAM, M. L.; TORRES, R. A.; SPONCHIADO, G.; MOTTA, T. S.; OLIVEIRA, C. M. R.; CARVALHO-FILHO, M. A.; CORREIA, M. T. S. 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**, v. 211, n. 1–4, p. 61–68, 2010.

ADEMOLLO, N.; PATROLECCO, L.; RAUSEO, J.; NIELSEN, J. CORSOLINI, S. Bioaccumulation of nonylphenols and bisphenol A in the Greenland shark *Somniosus microcephalus* from the Greenland seawaters. **Microchemical Journal**, v. 136, p. 106–112, 2018.

ADEOGUN, A. O.; IBOR, O. R.; ONOJA, A. B.; ARUKWE, A. Fish condition factor, peroxisome proliferator activated receptors and biotransformation responses in *Sarotherodon melanotheron* from a contaminated freshwater dam (Awba Dam) in Ibadan, Nigeria. **Marine Environmental Research**, v. 121, p. 74–86, 2016.

ADOLFI, M. C.; CARREIRA, A. C.; JESUS, L. W.; BOGERD, J.; FUNES, R. M.; SCHARTL, M.; SOGAYAR, M. C.; BORELLA, M. I. Molecular cloning and expression analysis of *dmrt1* and *sox9* during gonad development and male reproductive cycle in the lambari fish, *Astyanax altiparanae*. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 13, n. 1, p. 2, 2015.

AGUILAR-BETANCOURT, C. M.; GONZÁLEZ-SANSÓN, G.; KIDD, K. A.; MUNKITTRICK, K. R.; CURRY, R. A.; KOSONOY-ACEVES, D.; LUCANO-RAMÍREZ, G.; RUIZ-RAMÍREZ, S.; FLORES-ORTEGA, J. R.. Fishes as indicators of untreated sewage contamination in a Mexican coastal lagoon. **Marine Pollution Bulletin**, v. 113, n. 1–2, p. 100–109, 2016.

AHEL, M.; GIGER, W.; KOCH, M. Behavior of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment - I. occurrence and transformation in sewage treatment. **Water research**, v. 28, n. 5, p. 1131–1142, 1994.

ALAK, G.; YELTEKIN, A. Ç.; TAS, I. H.; UCAR, A.; PARLAK, V.; TOPAL, A.; KOCAMAN, E. M.; ATAMANALP, M. Investigation of 8-OHdG, CYP1A, HSP70 and transcriptional analyses of antioxidant defence system in liver tissues of rainbow trout exposed to eprinomectin. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 65, p. 136–144, 2017.

ALFONSO, S.; BLANC, M.; JOASSARD, L.; KEITER, S. H.; MUNSCHY, C.; LOIZEAU, V.; BÉGOUT, M. L.; COUSIN, X. Examining multi- and transgenerational behavioral and molecular alterations resulting from parental exposure to an environmental PCB and PBDE mixture. **Aquatic Toxicology**, v. 208, n. July 2018, p. 29–38, 2019.

ANDERSEN, C. L.; JENSEN, J. L.; ØRNTOFT, T. F. Normalization of Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Data: A Model-Based Variance Estimation Approach to Identify Genes Suited for Normalization, Applied to Bladder and Colon Cancer Data Sets. **Cancer Research**, v. 64, n. 15, p. 5245 LP – 5250, 2004.

ANDERSSON, T.; FÖRLIN, L. Regulation of the cytochrome P450 enzyme system in fish. **Aquatic Toxicology**, v. 24, n. 1–2, p. 1–19, 1992.

ANNI, I. S. A.; ZEBRAL, Y. D.; AFONSO, S. B.; JORGE, M. B. MORENO ABRIL, S. I.; BIANCHINI, A. Life-time exposure to waterborne copper II: Patterns of tissue accumulation and gene expression of the metal-transport proteins *ctr1* and *atp7b* in the killifish *Poecilia vivipara*. **Chemosphere**, v. 223, p. 257–262, 2019a.

ANNI, I. S. A.; ZEBRAL, Y. D.; AFONSO, S. B.; JORGE, M. B. MORENO ABRIL, S. I.; LAUER, M. M.; BIANCHINI, A. Life-time exposure to waterborne copper III: Effects on the energy metabolism of the killifish *Poecilia vivipara*. **Chemosphere**, v. 227, p. 580–588, 2019b.

ARUKWE, A.; CELIUS, T.; WALTHER, B.T.; GOKSØYR, A. Plasma levels of vitellogenin and eggshell *zona radiata* proteins in 4-nonylphenol and o,p'-DDT treated juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Marine Environmental Research**, v. 46, n. 1–5, p. 133–136, 1998.

ARUKWE, A.; CELIUS, T.; WALTHER, B.T.; GOKSØYR, A. Effects of xenoestrogen treatment on *zona radiata* protein and vitellogenin expression in Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Aquatic Toxicology**, v. 49, n. 3, p. 159–170, 2000a.

ARUKWE, A.; GOKSØYR, A.; THIBAUT, R.; CRAVEDI, J.P. Metabolism and organ distribution of nonylphenol in Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Marine Environmental Research**, v. 50, n. 1–5, p. 141–145, 2000b.

ARUKWE, A.; THIBAUT, R.; INGEBRIGTSEN, K.; CELIUS, T.; GOKSØYR, A.; CRAVEDI, J. P. In vivo and in vitro metabolism and organ distribution of nonylphenol in Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Aquatic Toxicology**, v. 49, n. 4, p. 289–304, 2000c.

ARUKWE, A.; FÖRLIN, L.; GOKSØYR, A. Xenobiotic and steroid biotransformation enzymes in Atlantic salmon (*Salmo salar*) liver treated with an estrogenic compound, 4-nonylphenol. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 16, n. 12, p. 2576–2583, 1997.

ARUKWE, A.; KULLMAN, S. W.; HINTON, D. E. Differential biomarker gene and protein expressions in nonylphenol and estradiol-17 β treated juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 129, n. 1, p. 1–10, 2001.

ASHBURNER, M.; BALL, C. A.; BLAKE, J. A.; BOTSTEIN, D.; BUTLER, H.; CHERRY, J. M.; DAVIS, A. P.; DOLINSKI, K.; DWIGHT, S. S.; EPPIG, J. T.; HARRIS, M. A.; HILL, D. P.; ISSEL-TARVER, L.; KASARSKIS, A.; LEWIS, S.; MATESE, J. C.; RICHARDSON, J. E.; RINGWALD, M.; RUBIN, G. M.; SHERLOCK, G. Gene Ontology: tool for the unification of biology. **Nature Genetics**, v. 25, n. 1, p. 25–29, 2000.

ASKER, N.; KRISTIANSOON, E.; ALBERTSSON, E.; LARSSON, D. G.J.; FÖRLIN, L. Hepatic transcriptome profiling indicates differential mRNA expression of apoptosis and immune related genes in eelpout (*Zoarces viviparus*) caught at Göteborg harbor, Sweden. **Aquatic Toxicology**, v.130-131, p. 58-67, 2013.

ASSEF, Y. A.; DI PRINZIO, C. Y.; HORAK, C. N. Differential activities of the multixenobiotic resistance mechanism in freshwater fishes inhabiting environments of Patagonia Argentina. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 217, p. 32–40, 2019.

AZZOUZ, A.; BALLESTEROS, E. Determination of 13 endocrine disrupting chemicals in environmental solid samples using microwave-assisted solvent extraction and continuous solid-phase extraction followed by gas chromatography-mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 408, n. 1, p. 231–241, 2016.

AZZURRO, E.; MATIDDI, M.; FANELLI, E.; GUIDETTI, P.; MESA, G. L.; SCARPATO, A.; AXIAK, V. Sewage pollution impact on Mediterranean rocky-reef fish assemblages. **Marine Environmental Research**, v. 69, n. 5, p. 390–397, 2010.

BABA, T.; MIMURA, J.; NAKAMURA, N.; HARADA, N.; YAMAMOTO, M.; MOROHASHI, K.-I.; FUJII-KURIYAMA, Y. Intrinsic Function of the Aryl Hydrocarbon (Dioxin) Receptor as a Key Factor in Female Reproduction. **Molecular and Cellular Biology**, v. 25, n. 22, p. 10040–10051, 2005.

BAINY, A. C. D.; SAITO, E.; CARVALHO, P. S. M.; JUNQUEIRA, V. B. C. Oxidative stress in gill, erythrocytes, liver and kidney of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a polluted site. **Aquatic Toxicology**, v. 34, n. 2, p. 151–162, 1996.

BAKER, M. E.; HARDIMAN, G. Transcriptional analysis of endocrine disruption using zebrafish and massively parallel sequencing. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 52, n. 3, p. R241–R256, 2014.

BAKER, M. E.; LATHE, R. The promiscuous estrogen receptor: Evolution of physiological estrogens and response to phytochemicals and endocrine disruptors. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 184, p. 29–37, 2018.

- BALDWIN, W. S.; ROLING, J. A.; PETERSON, S.; CHAPMAN, L. M. Effects of nonylphenol on hepatic testosterone metabolism and the expression of acute phase proteins in winter flounder (*Pleuronectes americanus*): Comparison to the effects of Saint John's Wort. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 140, n. 1, p. 87–96, 2005.
- BAO, S.; NIE, X.; LIU, Y.; WANG, C.; LI, W.; LIU, S. Diclofenac exposure alter the expression of PXR and its downstream target genes in mosquito fish (*Gambusia affinis*). **Science of The Total Environment**, v. 616–617, p. 583–593, 2018.
- BARAHONA, F.; TURIEL, E.; MARTÍN-ESTEBAN, A. Determination of nonylphenol and nonylphenol ethoxylates in powdered milk infant formula by HPLC-FL. **Journal of Chromatographic Science**, v. 49, n. 3, p. 243–248, 2011.
- BARRIONUEVO, F. J.; HURTADO, A.; KIM, G-J.; REAL, F. M.; BAKKALI, M.; KOPP, J. L.; SANDER, M.; SCHERER, G.; BURGOS, M.; JIMÉNEZ, R.. *Sox9* and *Sox8* protect the adult testis from male-to-female genetic reprogramming and complete degeneration. **eLife**, v. 5, p. 1–23, 2016.
- BARRIOS-ESTRADA, C.; DE JESÚS ROSTRO-ALANIS, M.; MUÑOZ-GUTIÉRREZ, B. D.; IQBAL, H. M. N.; KANNAN, S.; PARRA-SALDÍVAR, R. Emergent contaminants: Endocrine disruptors and their laccase-assisted degradation – A review. **Science of the Total Environment**, v. 612, p. 1516-1531, 2018.
- BARRON, M. G.; HEINTZ, R.; RICE, S. D. Relative potency of PAHs and heterocycles as aryl hydrocarbon receptor agonists in fish. **Marine Environmental Research**, v. 58, n. 2–5, p. 95–100, 2004.
- BARŠIENĖ, J.; DEDONYTĖ, V.; RYBAKOVAS, A.; ANDREIKĖNAITĖ, L.; ANDERSEN, O. K. Investigation of micronuclei and other nuclear abnormalities in peripheral blood and kidney of marine fish treated with crude oil. **Aquatic Toxicology**, v. 78S, p. S99–S104, 2006.
- BARSKE, L. A.; CAPEL, B. Estrogen represses SOX9 during sex determination in the red-eared slider turtle *Trachemys scripta*. **Developmental Biology**, v. 341, n. 1, p. 305–314, 2010.
- BEBIANNI, M.J.; MELLO, A.C.P.; SERRANO, M.A.S.; FLORES-NUNES, F.; MATTOS, J.J.; ZACCHI, F.L.; PIAZZA, C.E.; SIEBERT, M.N.; PIAZZA, R.S.; GOMES, C.H.A.M.; MELO, C.M.R.; BAINY, A.C.D. Transcriptional and cellular effects of paracetamol in the oyster *Crassostrea gigas*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 144, n. June, p. 258–267, 2017.
- BEHERA, B. K.; DAS, A.; SARKAR, D. J.; WEERATHUNGE, P.; PARIDA, P. K.; DAS, B. K.; THAVAMANI, P.; RAMANATHAN, R.; BANSAL, V. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in inland aquatic ecosystems: Perils and remedies through biosensors and bioremediation. **Environmental Pollution**, v. 241, p. 212–233, 2018.

BEIJER, K.; ABRAHAMSON, A.; BRUNSTRÖM, B.; BRANDT, I. CYP1A inhibition in fish gill filaments: A novel assay applied on pharmaceuticals and other chemicals. **Aquatic Toxicology**, v. 96, n. 2, p. 145–150, 2010.

BEIJER, K.; BJÖRLENIUS, B.; SHAIK, S.; LINDBERG, R. H.; BRUNSTRÖM, B.; BRANDT, I. Removal of pharmaceuticals and unspecified contaminants in sewage treatment effluents by activated carbon filtration and ozonation: Evaluation using biomarker responses and chemical analysis. **Chemosphere**, v. 176, p. 342-351, 2017.

BEIJER, K.; JÖNSSON, M.; SHAIK, S.; BEHRENS, D.; BRUNSTRÖM, B.; BRANDT, I. Azoles additively inhibit cytochrome P450 1 (EROD) and 19 (aromatase) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquatic Toxicology**, v. 198, p. 73–81, 2018.

BENNIE, D. T. Review of the environmental occurrence of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates. **Water Quality Research Journal of Canada**, v. 34, n. 1, p. 79–122, 1999.

BERBEL-FILHO, W. M.; BARROS-NETO, L. F.; DIAS, R. M.; MENDES, L. F.; FIGUEIREDO, C. A. A.; TORRES, R. A.; LIMA, S. M. Q. *Poecilia vivipara* bloch & schneider, 1801 (Cyprinodontiformes, poeciliidae), a guppy in an oceanic archipelago: From where did it come? **ZooKeys**, v. 746, p. 91–104, 2018.

BEUTLER, E. (1975) Reduced Glutathione (GSH). In: BERGMMEYEN, H. V., Ed., **Red Blood Cell Metabolism: A Manual of Biochemical Methods**, 2nd Edition, Grune and Stratton, New York, 112-114.

BLEIDORN, C. Third generation sequencing: technology and its potential impact on evolutionary biodiversity research. **Systematics and Biodiversity**, v. 14, n. 1, p. 1–8, 2 jan. 2016.

BOECKMANN, B.; BAIROCH, A.; APWEILER, R.; BLATTER, M. C.; ESTREICHER, A.; GASTEIGER, E.; MARTIN, M. J.; MICHOU, K.; O'DONOVAN, C.; PHAN, I.; PILBOUT, S.; SCHNEIDER, M. The SWISS-PROT protein knowledgebase and its supplement TrEMBL in 2003. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 1, p. 365–370, 2003.

BOEHM, F. R.; SANDRINI-NETO, L.; MOENS, T.; DA CUNHA LANA, P. Sewage input reduces the consumption of Rhizophora mangle propagules by crabs in a subtropical mangrove system. **Marine Environmental Research**, v. 122, p. 23-32, 2016.

BOIX, C.; IBÁÑEZ, M.; FABREGAT-SAFONT, D.; MORALES, E.; PASTOR, L.; SANCHO, J. V.; SÁNCHEZ-RAMÍREZ, J. E.; HERNÁNDEZ, F. Behaviour of emerging contaminants in sewage sludge after anaerobic digestion. **Chemosphere**, v. 193, p. 296-304, 2016.

BOLASINA, S. N.; DE AZEVEDO, A.; PETRY, A. C. Comparative efficacy of benzocaine, tricaine methanesulfonate and eugenol as anesthetic agents in the guppy *Poecilia vivipara*. **Aquaculture Reports**, v. 6, p.56-60, 2017.

BONEFELD-JØRGENSEN, E. C.; LONG, M.; HOFMEISTER, M. V.; VINGGAARD, A. M.. Endocrine-disrupting potential of Bisphenol A, Bisphenol A dimethacrylate, 4-n-nonylphenol, and 4-n-octylphenol *in vitro*: New data and a brief review. **Environmental Health Perspectives**, v. 115, n. SUPPL1, p. 69–76, 2007.

BONIN-FONT, F.; LALUCAT, J.; OLIVER-CODINA, G.; MASSOT-CAMPOS, M.; FONT, E. G.; CARRASCO, P. L. N. Evaluating the impact of sewage discharges on the marine environment with a lightweight AUV ☆. **Marine Pollution Bulletin**, v. 135, p. 714–722, 2018.

BONOMO, M. M.; MOROZESK, M.; DUARTE, I. D.; ROCHA, L. D.; FERNANDES, M. N.; MATSUMOTO, S. T. Sewage sludge hazardous assessment: chemical evaluation and cytological effects in CHO-k1 cells. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 11, p. 11069–11075, 2016.

BORGWARDT, F.; ROBINSON, L.; TRAUNER, D.; TEIXEIRA, H.; NOGUEIRA, A. J. A.; LILLEBØ, A. I.; PIET, G.; KUEMMERLEN, M.; O'HIGGINS, T.; MCDONALD, H.; AREVALO-TORRES, J.; BARBOSA, A. L.; IGLESIAS-CAMPOS, A.; HEIN, T.; CULHANE, F. Exploring variability in environmental impact risk from human activities across aquatic ecosystems. **Science of The Total Environment**, v. 652, p. 1396–1408, 2019.

BOSKER, T.; SANTORO, G.; MELVIN, S. D. Salinity and sensitivity to endocrine disrupting chemicals: A comparison of reproductive endpoints in small-bodied fish exposed under different salinities. **Chemosphere**, v. 183, p. 186–196, 2017.

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

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.

BRANCO, V.; CARVALHO, C. The thioredoxin system as a target for mercury compounds. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1863, n. 12, p.129255. 2018.

BRASIL. MINISTÉRIO DAS CIDADES. SECRETARIA NACIONAL DE SANEAMENTO AMBIENTAL. Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento: Diagnóstico dos Serviços de Água e Esgoto. **MCidades**, p. 220, 2018.

BRAY, N. L.; PIMENTEL, H.; MELSTED, P.; PACHTER, L. Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. **Nature biotechnology**, v. 34, n. 5, p. 525–7, 2016.

BREVES, J. P.; DUFFY, T. A.; EINARSDOTTIR, I. E.; BJÖRNSSON, B. T.; MCCORMICK, S. D. *In vivo* effects of 17 α -ethinylestradiol, 17 β -estradiol and 4-nonylphenol on *insulin-like growth-factor binding proteins (igfbps)* in Atlantic salmon. **Aquatic Toxicology**, v. 203, p. 28–39, 2018.

BRINKMANN, M.; KOGLIN, S.; EISNER, B.; WISEMAN, S.; HECKER, M.; EICHBAUM, K.; THALMANN, B.; BUCHINGER, S.; REIFFERSCHIED, G.; HOLLERT, H. Characterisation of transcriptional responses to dioxins and dioxin-like contaminants in roach (*Rutilus rutilus*) using whole transcriptome analysis. **Science of the Total Environment**, v. 541, p. 412–423, 2016.

BRYANT, D. M.; JOHNSON, K.; DITOMMASO, T.; TICKLE, T.; COUGER, M. B.; PAYZIN-DOGRU, D.; LEE, T. J.; LEIGH, N. D.; KUO, T. H.; DAVIS, F. G.; BATEMAN, J.; BRYANT, S.; GUZIKOWSKI, A. R.; TSAI, S. L.; COYNE, S.; YE, W. W.; FREEMAN, R. M.; PESHKIN, L.; TABIN, C. J.; REGEV, A.; HAAS, B. J.; WHITED, J. L. A Tissue-Mapped Axolotl *De Novo* Transcriptome Enables Identification of Limb Regeneration Factors. **Cell Reports**, v. 18, n. 3, p. 762–776, 2017.

BURGOS-ACEVES, M. A.; COHEN, A.; PAOLELLA, G.; LEPRETTI, M.; SMITH, Y.; FAGGIO, C.; LIONETTI, L. Modulation of mitochondrial functions by xenobiotic-induced microRNA: From environmental sentinel organisms to mammals. **Science of the Total Environment**, v. 645, p. 79–88, 2018.

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

BURKINA, V.; ZLABEK, V.; ZAMARATSKAIA, G. Effects of pharmaceuticals present in aquatic environment on Phase I metabolism in fish. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 40, n. 2, p. 430–444, 2015.

BURNETT, K. G.; BAIN, L. J.; BALDWIN, W. S.; CALLARD, G. V.; COHEN, S.; DI GIULIO, R. T.; EVANS, D. H.; GÓMEZ-CHIARRI, M.; HAHN, M. E.; HOOVER, C. A.; KARCHNER, S. I.; KATOH, F.; MACLATCHY, D. L.; MARSHALL, W. S.; MEYER, J. N.; NACCI, D. E.; OLEKSIK, M. F.; REES, B. B.; SINGER, T. D.; STEGEMAN, J. J.; TOWLE, D. W.; VAN VELD, P. A.; VOGELBEIN, W. K.; WHITEHEAD, A.; WINN, R. N.; CRAWFORD, D. L. *Fundulus* as the premier teleost model in environmental biology: Opportunities for new insights using genomics. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part D: Genomics and Proteomics**, v. 2, n. 4, p. 257–286, 2007.

BUSTIN, S. A.; BENES, V.; GARSON, J. A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, M. W.; SHIPLEY, G. L.; VANDESOMPELE, J.; WITTEWER, C. T. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611–622, 2009.

CAI, L.; LI, J.; YU, L.; WEI, Y.; MIAO, Z.; CHEN, M.; HUANG, R. *De novo* transcriptome assembly of the new marine fish model of goby, *Mugilogobius chulae*. **Marine Genomics**, v. 40, p. 18–20, 2018.

CAJARAVILLE, M. P.; BEBIANNO, M. J.; BLASCO, J.; PORTE, C.; SARASQUETE, C.; VIARENGO, A. 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, n. 2–3, p. 295–311, 2000.

CAMACHO, C.; COULOURIS, G.; AVAGYAN, V.; MA, N.; PAPADOPOULOS, J.; BEALER, K.; MADDEN, T. L. BLAST+: architecture and applications. **BMC bioinformatics**, v. 10, p. 421, 2009.

CAMARGO, M. Z.; SANDRINI-NETO, L.; CARREIRA, R. S.; CAMARGO, M. G. Effects of hydrocarbon pollution in the structure of macrobenthic assemblages from two large estuaries in Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 125, n. 1–2, p. 66–76, 2017.

CAPOLUPO, M.; FRANZELLITTI, S.; KIWAN, A.; VALBONESI, P.; DINELLI, E.; PIGNOTTI, E.; BIRKE, M.; FABBRI, E.. A comprehensive evaluation of the environmental quality of a coastal lagoon (Ravenna, Italy): Integrating chemical and physiological analyses in mussels as a biomonitoring strategy. **Science of the Total Environment**, v. 598, p. 146–159, 2017.

CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Glutathione reductase. **Methods in Enzymology**, v. 113, p. 484–490, 1985.

CARMALIN, S. A.; LIMA, E. C. Ecotoxicology and Environmental Safety Removal of emerging contaminants from the environment by adsorption. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 150, p. 1–17, 2018.

CARREIRA, R. S.; ALBERGARIA-BARBOSA, A. C. R.; ARGUELHO, M. L. P. M.; GARCIA, C. A. B. Evidence of sewage input to inner shelf sediments in the NE coast of Brazil obtained by molecular markers distribution. **Marine Pollution Bulletin**, v. 90, n. 1–2, p. 312–316, 2015.

CARVALHO, C. S.; BERNUSSO, V. A.; ARAÚJO, H. S. S.; ESPÍNDOLA, E. L. G.; FERNANDES, M. N. Biomarker responses as indication of contaminant effects in *Oreochromis niloticus*. **Chemosphere**, v. 89, n. 1, p. 60–69, 2012.

CENNAMO, N.; ZENI, L.; RICCA, E.; ISTRICATO, R.; MARZULLO, V. M.; CAPO, A.; STAIANO, M.; D'AURIA, S.; VARRIALE, A. Detection of naphthalene in sea-water by a label-free plasmonic optical fiber biosensor. **Talanta**, v. 194, p. 289–297, 2019.

CHANDRASEKAR, G.; ARNER, A.; KITAMBI, S. S.; DAHLMAN-WRIGHT, K.; LENDAHL, M. A. Developmental toxicity of the environmental pollutant 4-nonylphenol in zebrafish. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 33, n. 6, p. 752–764, 2011.

CHAPMAN, R. W.; MANCIA, A.; BEAL, M.; VELOSO, A.; RATHBURN, C.; BLAIR, A.; HOLLAND, A. F.; WARR, G. W.; DIDINATO, G.; SOKOLOVA, I. M.; WIRTH, E. F.; DUFFY, E.; SANGER, D. The transcriptomic responses of the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, to environmental conditions. **Molecular Ecology**, v. 20, n. 7, p. 1431–1449, 2011.

CHAURASIA, M. K.; RAVICHANDRAN, G.; NIZAM, F.; ARASU, M. V.; AL-DHABI, N. A.; ARSHAD, A.; HARIKRISHNAN, R.; AROCKIARAJ, J. *In-silico* analysis and mRNA modulation of detoxification enzymes GST delta and kappa against various biotic and abiotic oxidative stressors. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 54, p. 353–363, 2016.

CHE, M.; WANG, R.; LI, X.; WANG, H-Y.; ZHENG, X. F. S. Expanding roles of superoxide dismutases in cell regulation and cancer. **Drug Discovery Today**, v. 21, n. 1, p. 143–149, 2016.

CHEN, Y. Y.; CHAN, K. M. Modulations of TCDD-mediated induction of zebrafish *cyp1a1* and the AHR pathway by administering Cd²⁺ in vivo. **Chemosphere**, v. 210, p. 577–587, 2018.

CHEVREUX, B., WETTER, T. AND SUHAI, S. Genome Sequence Assembly Using Trace Signals and Additional Sequence Information. **Computer Science and Biology: Proceedings of the German Conference on Bioinformatics (GCB)**, v. 99, n. 1995, p. 45–56, 1999.

CHIANG, G.; MUNKITTRICK, K. R.; URRUTIA, R.; CONCHA, C.; RIVAS, M.; DIAZ-JARAMILLO, M.; BARRA, R. Liver ethoxyresorufin-O-deethylase and brain acetylcholinesterase in two freshwater fish species of South America; the effects of seasonal variability on study design for biomonitoring. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 86, p. 147–155, 2012.

CHRISTENSEN, L. J.; KORSGAARD, B.; BJERREGAARD, P. The effect of 4-nonylphenol on the synthesis of vitellogenin in the flounder *Platichthys flesus*. **Aquatic Toxicology**, v. 46, n. 3–4, p. 211–219, 1999.

COCCI, P.; MOSCONI, G.; PALERMO, F. A. Effects of 4-nonylphenol on hepatic gene expression of peroxisome proliferator-activated receptors and cytochrome P450 isoforms (CYP1A1 and CYP3A4) in juvenile sole (*Solea solea*). **Chemosphere**, v. 93, n. 6, p. 1176–1181, 2013.

COLLI-DULA, R. C.; FANG, X.; MORAGA-AMADOR, D.; ALBORNOZ-ABUD, N.; ZAMORA-BUSTILLOS, R.; CONESA, A.; ZAPATA-PEREZ, O.; MORENO, D.; HERNANDEZ-NUÑEZ, E. Transcriptome analysis reveals novel insights into the response of low-dose benzo(a)pyrene exposure in male tilapia. **Aquatic Toxicology**, v. 201, p. 162–173, 2018.

CONESA, A.; MADRIGAL, P.; TARAZONA, S.; GOMEZ-CABRERO, D.; CERVERA, A.; MCPHERSON, A.; SZCZEŚNIAK, M. W.; GAFFNEY, D. J.; ELO, L. L.; ZHANG, X.; MORTAZAVI, A. A survey of best practices for RNA-seq data analysis. **Genome Biology**, v. 17, n. 1, p. 13, 2016.

COSTA, J.; REIS-HENRIQUES, M. A.; CASTRO, L. F. C.; FERREIRA, M. Gene expression analysis of ABC efflux transporters, CYP1A and GST α in Nile tilapia after exposure to benzo(a)pyrene. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 155, n. 3, p. 469–482, 2012.

COSTA, L. A. DE A.; PESSOA, D. M. M.; CARREIRA, R. DA S. Chemical and biological indicators of sewage river input to an urban tropical estuary (Guanabara Bay, Brazil). **Ecological Indicators**, v. 90, p. 513–518, 2018.

COUTO, N.; WOOD, J.; BARBER, J. The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 95, p. 27–42, 2016.

CRAVO, A.; FERNANDES, D.; DAMIÃO, T.; PEREIRA, C.; REIS, M. P. Determining the footprint of sewage discharges in a coastal lagoon in South-Western Europe. **Marine Pollution Bulletin**, v. 96, n. 1–2, p. 197–209, 2015.

CRIBBIN, K. M.; QUACKENBUSH, C. R.; TAYLOR, K.; ARIAS-RODRIGUEZ, L.; KELLEY, J. L. Sex-specific differences in transcriptome profiles of brain and muscle tissue of the tropical gar. **BMC Genomics**, v. 18, n. 1, p. 283, 2017.

CUI, H.; GU, X.; CHEN, J.; XIE, Y.; KE, S.; WU, J.; GOLOVKO, A.; MORPURGO, B.; YAN, C.; PHILLIPS, T. D.; XIE, W.; LUO, J.; ZHOU, Z.; TIAN, Y. Pregnane X receptor regulates the AhR/Cyp1A1 pathway and protects liver cells from benzo-[α]-pyrene-induced DNA damage. **Toxicology Letters**, v. 275, p. 67–76, 2017.

DA SILVA, E. S.; ABRIL, S. I. M.; ZANETTE, J.; BIANCHINI, A. Salinity-dependent copper accumulation in the guppy *Poecilia vivipara* is associated with *CTR1* and *ATP7B* transcriptional regulation. **Aquatic Toxicology**, 2014.

DAIDOJI, T.; INOUE, H.; KATO, S.; YOKOTA, H. Glucuronidation and excretion of nonylphenol in perfused rat liver. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 31, n. 8, p. 993 LP – 998, 2003.

DAUGHTON, C. G. Monitoring wastewater for assessing community health: Sewage Chemical-Information Mining (SCIM). **Science of the Total Environment**, v. 619–620, p. 748–764, 2018.

DE ANDRÉS, M.; BARRAGÁN, J. M.; SCHERER, M. Urban centres and coastal zone definition: Which area should we manage? **Land Use Policy**, v. 71, p. 121–128, 2018.

DE BRUIN, W.; KRITZINGER, Q.; BORNMAN, R.; KORSTEN, L. Occurrence, fate and toxic effects of the industrial endocrine disrupter, nonylphenol, on plants - A review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 181, p. 419–427, 2019.

DE LA CRUZ, N.; GIMÉNEZ, J.; ESPLUGAS, S.; GRANDJEAN, D.; DE ALENCASTRO, L. F.; PULGARÍN, C. Degradation of 32 emergent contaminants by UV and neutral photo-fenton in domestic wastewater effluent previously treated by activated sludge. **Water Research**, v. 46, n. 6, p. 1947–1957, 2012.

DE LA CRUZ, N.; ESQUIUS, L.; GRANDJEAN, D.; MAGNET, A.; TUNGLER, A.; DE ALENCASTRO, L.F.; PULGARÍN, C. Degradation of emergent contaminants by UV, UV/H₂O₂ and neutral photo-Fenton at pilot scale in a domestic wastewater treatment plant. **Water Research**, v. 47, n. 15, p. 5836–5845, 2013.

DE LOS RÍOS, A.; JUANES, J. A.; ORTIZ-ZARRAGOITIA, M.; LÓPEZ DE ALDA, M.; BARCELÓ, D.; CAJARAVILLE, M. P. Assessment of the effects of a marine urban outfall discharge on caged mussels using chemical and biomarker analysis. **Marine Pollution Bulletin**, v. 64, n. 3, p. 563–573, 2012.

DE MELO GURGEL, P.; NAVONI, J. A.; DE MORAIS FERREIRA, D., DO AMARAL, V. S. Ecotoxicological water assessment of an estuarine river from the Brazilian Northeast, potentially affected by industrial wastewater discharge. **Science of the Total Environment**, v. 572, p. 324–332, 2016.

DEANE, E. E.; VAN DE MERWE, J. P.; HUI, J. H. L.; WU, R. S. S.; WOO, N. Y. S. PBDE-47 exposure causes gender specific effects on apoptosis and heat shock protein expression in marine medaka, *Oryzias melastigma*. **Aquatic Toxicology**, v. 147, p. 57–67, 2014.

DECASTRO, B. R.; KORRICK, S. A.; SPENGLER, J. D.; SOTO, A. M. Estrogenic activity of polychlorinated biphenyls present in human tissue and the environment. **Environmental Science and Technology**, v. 40, n. 8, p. 2819–2825, 2006.

DELEVE, L. D.; KAPLOWITZ, N. Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 52, n. 3, p. 287–305, 1991.

DELLA TORRE, C.; CORSI, I.; NARDI, F.; PERRA, G.; TOMASINO, M. P.; FOCARDI, S. Transcriptional and post-transcriptional response of drug-metabolizing enzymes to PAHs contamination in red mullet (*Mullus barbatus*, Linnaeus, 1758): A field study. **Marine Environmental Research**, v. 70, n. 1, p. 95-101, 2010.

DENG, Y.; LI, B.; YU, K.; ZHANG, T. Biotransformation and adsorption of pharmaceutical and personal care products by activated sludge after correcting matrix effects. **Science of the Total Environment**, v. 544, p. 980-986, 2016.

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

DI BELLO, D.; VACCARO, E.; LONGO, V.; REGOLI, F.; NIGRO, M.; BENEDETTI, M.; GERVASI, P. G.; PRETTI, C. Presence and inducibility by β -naphthoflavone of CYP1A1, CYP1B1 and phase II enzymes in *Trematomus bernacchii*, an Antarctic fish. **Aquatic Toxicology**, v. 84, n. 1, p. 19–26, 2007.

DI PROFIO, F.; MELEGARI, I.; PALOMBIERI, A.; SARCHESE, V.; ARBUATTI, A.; FRUCI, P.; MARSILIO, F.; MARTELLA, V.; DI MARTINO, B. High prevalence of hepatitis E virus in raw sewage in Southern Italy. **Virus Research**, v. 272, p. 197710, 2019.

DIATCHENKO, L.; LAU, Y. F.; CAMPBELL, A. P.; CHENCHIK, A.; MOQADAM, F.; HUANG, B.; LUKYANOV, S.; LUKYANOV, K.; GURSKAYA, N.; SVERDLOV, E. D.; SIEBERT, P. D. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 12, p. 6025–6030, 1996.

DIETRICH, C. Antioxidant Functions of the Aryl Hydrocarbon Receptor. **Stem Cells International**, v. 2016, p. 1–10, 2016.

DOOLEY, H.; BUCKINGHAM, E. B.; CRISCITIELLO, M. F.; FLAJNIK, M. F. Emergence of the acute-phase protein hemopexin in jawed vertebrates. **Molecular Immunology**, v. 48, n. 1–3, p. 147–152, 2010.

DORRINGTON, T.; ZANETTE, J.; ZACCHI, F. L.; STEGEMAN, J. J.; BAINY, A. C. D. Basal and 3-methylcholanthrene-induced expression of cytochrome P450 1A, 1B and 1C genes in the Brazilian guppy, *Poecilia vivipara*. **Aquatic Toxicology**, v. 124-125, p. 106-113, 2012.

DU, Y.; WU, Q. Y.; LV, X. T.; WANG, Q. P.; LU, Y.; HU, H. Y. Exposure to solar light reduces cytotoxicity of sewage effluents to mammalian cells: Roles of reactive oxygen and nitrogen species. **Water Research**, v. 143, p. 570–578, 2018.

DUDEK, J.; PFEFFER, S.; LEE, P.; JUNG, M.; CAVALIÉ, A.; HELMS, V.; FÖRSTER, F.; ZIMMERMANN, R. Protein Transport into the Human Endoplasmic Reticulum. **Journal of Molecular Biology**, v. 427, n. 6, p. 1159–1175, 2015.

DUVAL, C.; ARIËNS, R. A. S. Fibrinogen splice variation and cross-linking: Effects on fibrin structure/function and role of fibrinogen γ' as thrombomodulin II. **Matrix Biology**, v. 60–61, p. 8–15, 2017.

EGANHOUSE, R. .; SHERBLOM, P. . Anthropogenic organic contaminants in the effluent of a combined sewer overflow: impact on Boston Harbor. **Marine Environmental Research**, v. 51, n. 1, p. 51–74, 2001.

EGANHOUSE, R. P.; OLAGUER, D. P.; GOULD, B. R.; PHINNEY, C. S. Use of molecular markers for the detection of municipal sewage sludge at sea. **Marine Environmental Research**, v. 25, n. 1, p. 1–22, 1988.

EGANHOUSE, R. P.; BLUMFIELD, D. L.; KAPLAN, I. R. Long-chain alkylbenzenes as molecular tracers of domestic wastes in the marine environment. **Environmental Science & Technology**, v. 17, n. 9, p. 523–530, 1983.

EKBLOM, R.; GALINDO, J. Applications of next generation sequencing in molecular ecology of non-model organisms. **Heredity**, v. 107, n. 1, p. 1–15, 2011.

EKELUND, R.; BERGMAN, A.; GRANMO, A.; BERGGREN, M. Bioaccumulation of 4-Nonylphenol in Marine Animals – A Re-evaluation. **Environmental pollution**, v. 64, n. 2, p. 107–20, 1990.

ELIE, M. R.; CHOI, J.; NKURUMAH-ELIE, Y. M.; GONNERMAN, G. D.; STEVENS, J. F.; TANGUAY, R. L. Metabolomic analysis to define and compare the effects of PAHs and oxygenated PAHs in developing zebrafish. **Environmental Research**, v. 140, p. 502–510, 2015.

ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, n. 2, p. 88–95, 1961.

ELSKUS, A. A. Estradiol and estriol suppress CYP1A expression in rainbow trout primary hepatocytes. **Marine Environmental Research**, v. 58, n. 2–5, p. 463–467, 2004.

ESCARRONE, A. L. V.; CALDAS, S. S.; PRIMEL, E. G.; MARTINS, S. E.; NERY, L. E. M. Uptake, tissue distribution and depuration of triclosan in the guppy *Poecilia vivipara* acclimated to freshwater. **Science of the Total Environment**, v. 560-561, p. 218-224, 2016.

FABER-HAMMOND, J.; SAMANTA, M. P.; WHITCHURCH, E. A.; MANNING, D.; SISNEROS, J. A.; COFFIN, A. B. Saccular Transcriptome Profiles of the Seasonal Breeding Plainfin Midshipman Fish (*Porichthys notatus*), a Teleost with Divergent Sexual Phenotypes. **PLOS ONE**, v. 10, n. 11, p. e0142814, 2015.

FAN, X-D.; ZHENG, H.; FAN, X.; LU, S. Increase of SOX9 promotes hepatic ischemia/reperfusion (IR) injury by activating TGF- β 1. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 503, n. 1, p. 215–221, 2018.

FEITOSA, R. S.; SODRÉ, F. F.; MALDANER, A. O. Drogas de abuso em águas naturais e residuárias urbanas: Ocorrência, determinação e aplicações forenses. **Química Nova**, v. 36, n. 2, p. 291–305, 2013.

FENT, K.; SUMPTER, J. P. Progress and promises in toxicogenomics in aquatic toxicology: Is technical innovation driving scientific innovation? **Aquatic Toxicology**, v. 105, n. 3–4, p. 25–39, 2011.

FERNANDEZ-CASSI, X.; TIMONEDA, N.; MARTÍNEZ-PUCHOL, S.; RUSIÑOL, M.; RODRIGUEZ-MANZANO, J.; FIGUEROLA, N.; BOFILL-MAS, S.; ABRIL, J.F.; GIRONES, R. Metagenomics for the study of viruses in urban sewage as a tool for public health surveillance. **Science of The Total Environment**, v. 618, p. 870–880, 2018.

FERNÁNDEZ, I.; GAVAIA, P. J.; LAIZÉ, V.; CANCELA, M. L. Fish as a model to assess chemical toxicity in bone. **Aquatic Toxicology**, v. 194, p. 208–226, 2018.

FERREIRA, M.; SANTOS, P.; REY-SALGUEIRO, L.; ZAJA, R.; REIS-HENRIQUES, M. A.; SMITAL, T. The first demonstration of CYP1A and the ABC protein(s) gene expression and activity in European seabass (*Dicentrarchus labrax*) primary hepatocytes. **Chemosphere**, v. 100, p. 152–159, 2014.

FERREIRA, M.; COSTA, J.; REIS-HENRIQUES, M. A. ABC transporters in fish species: A review. **Frontiers in Physiology**, v. 5, p. 1–12, 2014.

FERREIRA, R. S.; MONSERRAT, J. M.; FERREIRA, J. L. R.; KALB, A. C.; STEGEMAN, J.; BAINY, A. C. D.; ZANETTE, J. Biomarkers of Organic Contamination in the South American Fish *Poecilia vivipara* and *Jenynsia multidentata*. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 75, n. 16–17, p. 1023–1034, 2012.

FERRO-AZCONA, H.; ESPINOZA-TENORIO, A.; CALDERÓN-CONTRERAS, R.; RAMENZONI, V. C.; GÓMEZ PAÍS, M. M.; MESA-JURADO, M. A. Adaptive capacity and social-ecological resilience of coastal areas: A systematic review. **Ocean & Coastal Management**, v. 173, p. 36–51, 2019.

FIGUEIREDO-FERNANDES, A.; FONTAÍNHAS-FERNANDES, A.; PEIXOTO, F.; ROCHA, E.; REIS-HENRIQUES, M.A. Effects of gender and temperature on oxidative stress enzymes in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* exposed to paraquat. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 85, n. 2, p. 97–103, 2006.

FINN, R. D.; CLEMENTS, J.; EDDY, S. R. HMMER web server: Interactive sequence similarity searching. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. SUPPL. 2, p. 29–37, 2011.

FITZSIMMONS, P. N.; HOFFMAN, A. D.; FAY, K. A.; NICHOLS, J. W. Allometric scaling of hepatic biotransformation in rainbow trout. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 214, p. 52–60, 2018.

FITZSIMMONS, P. N.; LIEN, G. J.; NICHOLS, J. W. A compilation of *in vitro* rate and affinity values for xenobiotic biotransformation in fish, measured under physiological conditions. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 145, n. 4, p. 485–506, 2007.

FLORES-NUNES, F.; MATTOS, J. J.; ZACCHI, F. L.; SERRANO, M. A. S.; PIAZZA, C. E.; SASAKI, S. T.; TANIGUCHI, S.; BICEGO, M. C.; MELO, C. M. R.; BAINY, A. C. D. Effect of linear alkylbenzene mixtures and sanitary sewage in biochemical and molecular responses in pacific oyster *Crassostrea gigas*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 22, p. 17386–17396, 2015.

FLORES, K.; MANAUTOU, J. E.; RENFRO, J. L. Gender-specific expression of ATP-binding cassette (*Abc*) transporters and cytoprotective genes in mouse choroid plexus. **Toxicology**, v. 386, p. 84–92, 2017.

FONSECA, V. F.; FRANÇA, S.; SERAFIM, A.; COMPANY, R.; LOPES, B.; BEBIANNO, M. J.; CABRAL, H. N. Multi-biomarker responses to estuarine habitat contamination in three fish species: *Dicentrarchus labrax*, *Solea senegalensis* and *Pomatoschistus microps*. **Aquatic Toxicology**, v. 102, n. 3–4, p. 216–227, 2011a.

FONSECA, V. F.; FRANÇA, S.; VASCONCELOS, R. P.; SERAFIM, A.; COMPANY, R.; LOPES, B.; BEBIANNO, M. J.; CABRAL, H. N. Short-term variability of multiple biomarker response in fish from estuaries: Influence of environmental dynamics. **Marine Environmental Research**, v. 72, n. 4, p. 172–178, 2011b.

FOX, S. E.; CHRISTIE, M. R.; MARINE, M.; PRIEST, H. D.; MOCKLER, T. C.; BLOUIN, M. S. Sequencing and characterization of the anadromous steelhead (*Oncorhynchus mykiss*) transcriptome. **Marine Genomics**, v. 15, p. 13–15, 2014.

FRANCO, M. E.; LAVADO, R. Applicability of *in vitro* methods in evaluating the biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in fish: Advances and challenges. **Science of the Total Environment**, v. 671, p. 685–695, 2019.

FRANKLIN, C. C.; BACKOS, D. S.; MOHAR, I.; WHITE, C. C.; FORMAN, H. J.; KAVANAGH, T. J. Structure, function, and post-translational regulation of the catalytic and modifier subunits of glutamate cysteine ligase. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 30, n. 1–2, p. 86–98, 2009.

FRASER, B. A.; WEADICK, C. J.; JANOWITZ, I.; RODD, F. H.; HUGHES, K. A. Sequencing and characterization of the guppy (*Poecilia reticulata*) transcriptome. **BMC Genomics**, v. 12, 2011.

FRASER, B. A.; JANOWITZ, I.; THAIRU, M.; TRAVIS, J.; HUGHES, K. A. Phenotypic and genomic plasticity of alternative male reproductive tactics in sailfin mollies. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 281, n. 1781, p. 20132310–20132310, 2014.

FREIRE, M. M.; SANTOS, V. G.; GINUINO, I. S. F.; ARIAS, A. R. L. Biomarcadores na avaliação da saúde ambiental dos ecossistemas aquáticos. **Oecologia Australis**, v. 12, n. 03, p. 347–354, 2009.

FREITAS-JÚNIOR, A. C. V.; COSTA, H. M. S.; ICIMOTO, M. Y.; HIRATA, I. Y.; MARCONDES, M.; CARVALHO, L. B.; OLIVEIRA, V.; BEZERRA, R. S. Giant Amazonian fish pirarucu (*Arapaima gigas*): Its viscera as a source of thermostable trypsin. **Food Chemistry**, v. 133, n. 4, p. 1596–1602, 2012.

FROEHNER, S.; MACHADO, K. S.; STEFAN, E.; BLENINGER, T.; DA ROSA, E. C.; DE CASTRO MARTINS, C. Occurrence of selected estrogens in mangrove sediments. **Marine Pollution Bulletin**, v. 64, n. 1, p. 75–79, 2012.

FROESE, R.; PAULY, D. FishBase. World Wide Web electronic publication (2018) www.fishbase.org, version (06/2018).). *Poecilia vivipara* Bloch & Schneider, 1801, available at: <http://www.fishbase.org/Summary/SpeciesSummary.php?ID=23359&AT=Poecilie> (acessado 17.02.18). p. 1801, 2018.

FUMIAN, T. M.; FIORETTI, J. M.; LUN, J. H.; DOS SANTOS, I. A. L.; WHITE, P. A.; MIAGOSTOVICH, M. P. Detection of norovirus epidemic genotypes in raw sewage using next generation sequencing. **Environment International**, v. 123, p. 282–291, 2019.

GAGNÉ, F.; ANDRÉ, C.; CEJKA, P.; GAGNON, C.; BLAISE, C. Toxicological effects of primary-treated urban wastewaters, before and after ozone treatment, on freshwater mussels (*Elliptio complanata*). **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 145, n. 4, p. 542–552, 2007.

GAGNON, M. M.; RAWSON, C. A. Bioindicator species for EROD activity measurements: A review with Australian fish as a case study. **Ecological Indicators**, v. 64, p. 166–180, 2017.

GHAZALA; MAHBOOB, S.; AHMAD, L.; SULTANA, S.; ALGHANIM, K.; AL-MISNED, F.; AHMAD, Z. Fish Cholinesterases as Biomarkers of Sublethal Effects of Organophosphorus and Carbamates in Tissues of *Labeo rohita*. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 28, n. 3, p. 137–142, 2014.

GIL, A.; GARCÍA, A. M.; FERNÁNDEZ, M.; VICENTE, M. A.; GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, B.; RIVES, V.; KORILLI, S. A. Effect of dopants on the structure of titanium oxide used as a photocatalyst for the removal of emergent contaminants. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 53, p. 183-191, 2017.

GLOCK, G. E.; MCLEAN, P. Further studies on the properties and assay of glucose 6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase of rat liver. **Biochemical Journal**, v. 55, n. 3, p. 400–408, 1953.

GODAHEWA, G.I.; WICKRAMAARACHCHI, W. D. N.; WHANG, I.; BATHIGE, S. D. N. K.; LIM, B-S.; CHOI, C. Y.; DE ZOYSA, M.; NOH, J. K.; LEE, J. Two carboxypeptidase counterparts from rock bream (*Oplegnathus fasciatus*): Molecular characterization, genomic arrangement and immune responses upon pathogenic stresses. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 162, n. 3–4, p. 180–191, 2014.

GOMES, J. L.; MONTEIRO, L. R. Size and fecundity variation in populations of *Poecilia vivipara* Block & Schneider (Teleostei; Poeciliidae) inhabiting an environmental gradient. **Journal of Fish Biology**, v. 71, n. 6, p. 1799–1809, 2007.

GONZALEZ-REY, M.; MATTOS, J. J.; PIAZZA, C. E.; BAINY, A. C. D.; BEBIANNO, M. J. Effects of active pharmaceutical ingredients mixtures in mussel *Mytilus galloprovincialis*. **Aquatic Toxicology**, v. 153, p. 12–26, 2014.

GRABHERR, M. G.; HAAS, B. J.; YASSOUR, M.; LEVIN, J. Z.; THOMPSON, D. A.; AMIT, I.; ADICONIS, X.; FAN, L.; RAYCHOWDHURY, R.; ZENG, Q.; CHEN, Z.; MAUCELI, E.; HACHOEN, N.; GNIRKE, A.; RHIND, N.; DI PALMA, F.; BIRREN, B. W.; NUSBAUM, C.; LINDBLAD-TOH, K.; FRIEDMAN, N.; REGEV, A. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. **Nature biotechnology**, v. 29, n. 7, p. 644–52, 2011.

GRABICOVA, K.; LINDBERG, R. H.; ÖSTMAN, M.; GRABIC, R.; RANDAK, T.; JOAKIM LARSSON, D. G.; FICK, J. Tissue-specific bioconcentration of antidepressants in fish exposed to effluent from a municipal sewage treatment plant. **Science of the Total Environment**, v. 488–489, n. 1, p. 46–50, 2014.

GRABICOVA, K.; GRABIC, R.; BLAHA, M.; KUMAR, V.; CERVENY, D.; FEDOROVA, G.; RANDAK, T. Presence of pharmaceuticals in benthic fauna living in a small stream affected by effluent from a municipal sewage treatment plant. **Water Research**, v. 72, p. 145–153, 2015.

GRUNG, M.; PETERSEN, K.; FJELD, E.; ALLAN, I.; HRISTENSEN, J. H.; MALMQVIST, L. M. V.; MELAND, S.; RANNEKLEV, S. PAH related effects on fish in sedimentation ponds for road runoff and potential transfer of PAHs from sediment to biota. **Science of the Total Environment**, v. 566–567, n. 0349, p. 1309–1317, 2016.

GWOREK, B.; KIJEŃSKA, M.; ZABOROWSKA, M.; WRZOSEK, J.; TOKARZ, L.; CHMIELEWSKI, J. Pharmaceuticals in aquatic environment. Fate and behaviour, ecotoxicology and risk assessment – A review. **Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research**, v. 76, n. 3, p. 397–407, 2019.

HAAS, B. J.; PAPANICOLAOU, A.; YASSOUR, M.; GRABHERR, M.; BLOOD, P. D.; BOWDEN, J.; COUGER, M. B.; ECCLES, D.; LI, B.; LIEBER, M.; MACMANES, M. D.; OTT, M.; ORVIS, J.; POCHE, N.; STROZZI, F.; WEEKS, N.; WESTERMAN, R.; WILLIAM, T.; DEWEY, C. N.; HENSCHER, R.; LEDUC, R. D.; FRIEDMAN, N.; REGEV, A. *De novo* transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. **Nature Protocols**, v. 8, n. 8, p. 1494–1512, 2013.

HAHN, C. M.; IWANOWICZ, L. R.; CORNMAN, R. S.; MAZIK, P. M.; BLAZER, V. S. Transcriptome discovery in non-model wild fish species for the development of quantitative transcript abundance assays. **Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics**, v. 20, p. 27–40, 2016.

HAHN, M. E. Aryl hydrocarbon receptors: diversity and evolution. **Chemico-Biological Interactions**, v. 141, p. 131–160, 2002.

HAMLIN, H. J.; MARCIANO, K.; DOWNS, C. A. Migration of nonylphenol from food-grade plastic is toxic to the coral reef fish species *Pseudochromis fridmani*. **Chemosphere**, v. 139, p. 223–228, 2015.

HARAYASHIKI, C. A. Y.; JUNIOR, A. S. V.; MACHADO, A. A. S.; CABRERA, L. C.; PRIMEL, E. G.; BIANCHINI, A.; CORCINI, C. D. Toxic effects of the herbicide Roundup in the guppy *Poecilia vivipara* acclimated to fresh water. **Aquatic Toxicology**, v. 142–143, p. 176–184, 2013.

HASSELBERG, L.; MEIER, S.; SVARDAL, A.; HEGELUND, T.; CELANDER, M. C. Effects of alkylphenols on CYP1A and CYP3A expression in first spawning Atlantic cod (*Gadus morhua*). **Aquatic Toxicology**, v. 67, n. 4, p. 303–313, 2004.

HASSELBERG, L.; MEIER, S.; SVARDAL, A. Effects of alkylphenols on redox status in first spawning Atlantic cod (*Gadus morhua*). **Aquatic Toxicology**, v. 69, n. 1, p. 95–105, 2004.

HE, Z.; XU, Y.; WANG, W.; LIU, X. Stereoselective bioaccumulation and elimination of chiral PCBs 95 and 149 in earthworm *Eisenia fetida*. **Chemosphere**, v. 212, p. 497–503, 2018.

HÉBERT, N.; GAGNÉ, F.; CYR, D.; PELLERIN, J.; BLAISE, C.; FOURNIER, M. Effects of 4-nonylphenol on the immune system of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Fresenius Environmental Bulletin**, v. 18, n. 5 A, p. 757–761, 2009.

HEINK, A. E.; PARRISH, A. N.; THORGAARD, G. H.; CARTER, P. A. Oxidative stress among *SOD-1* genotypes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquatic Toxicology**, v. 144–145, p. 75–82, 2013.

HEMMER, M. J.; BOWMAN, C. J.; HEMMER, B. L.; FRIEDMAN, S. D.; MARCOVICH, D.; KROLL, K. J.; DENSLOW, N. D. Vitellogenin mRNA regulation and plasma clearance in male sheepshead minnows, (*Cyprinodon variegatus*) after cessation of exposure to 17 β -estradiol and *p*-nonylphenol. **Aquatic Toxicology**, v. 58, n. 1–2, p. 99–112, 2002.

HERNÁNDEZ, F.; BAKKER, J.; BIJLSMA, L.; DE BOER, J.; BOTERO-COY, A. M.; BRUINEN DE BRUIN, Y.; FISCHER, S.; HOLLENDER, J.; KASPRZYK-HORDERN, B.; LAMOREE, M.; LÓPEZ, F. J.; TER LAAK, T. L.; VAN LEERDAM, J. A.; SANCHO, J. V.; SCHYMANSKI, E. L.; DE VOOGT, P.; HOGENDOORN, E. A. The role of analytical chemistry in exposure science: Focus on the aquatic environment. **Chemosphere**, v. 222, p. 564–583, 2019.

HETT, A. K.; PITRA, C.; JENNECKENS, I.; LUDWIG, A. Characterization of Sox9 in European Atlantic Sturgeon (*Acipenser sturio*). **Journal of Heredity**, v. 96, n. 2, p. 150–154, 2005.

HINTON, D. E.; HARDMAN, R. C.; KULLMAN, S. W.; LAW, J. M. M.; SCHMALE, M. C.; WALTER, R. B.; WINN, R. N.; YODER, J. A. Aquatic animal models of human disease: Selected papers and recommendations from the 4th Conference. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 149, n. 2, p. 121–128, 2009.

HO, A. L. F. C.; PRUETT, C. L.; LIN, J. Phylogeny and biogeography of *Poecilia* (Cyprinodontiformes: Poeciliinae) across Central and South America based on mitochondrial and nuclear DNA markers. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 101, p. 32–45, 2016.

HO, H-Y.; CHENG, M-L.; SHIAO, M-S.; CHIU, D. T-Y. Characterization of global metabolic responses of glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient hepatoma cells to diamide-induced oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 54, p. 71–84, 2013.

HORNETT, E. A.; WHEAT, C. W. Quantitative RNA-Seq analysis in non-model species: assessing transcriptome assemblies as a scaffold and the utility of evolutionary divergent genomic reference species. **BMC Genomics**, v. 13, n. 1, p. 361, 2012.

HOYDAL, K. S.; JENSSEN, B. M.; LETCHER, R. J.; DAM, M.; ARUKWE, A. Hepatic phase I and II biotransformation responses and contaminant exposure in long-finned pilot whales from the Northeastern Atlantic. **Marine Environmental Research**, v. 134, p. 44–54, 2018.

HUANG, Q.; BU, L.; YANG, T.; YANG, Y.; HUANG, S.; YANG, J.; GUO, Y.; LIU, C. Effects of nonylphenol administration on serum, liver and testis estrogen metabolism. **Chemosphere**, v. 235, p. 543–549, 2019.

HUERTA, B.; RODRIGUEZ-MOZAZ, S.; LAZORCHAK, J.; BARCELO, D.; BATT, A.; WATHEN, J.; STAHL, L. Presence of pharmaceuticals in fish collected from urban rivers in the U.S. EPA 2008–2009 National Rivers and Streams Assessment. **Science of The Total Environment**, v. 634, p. 542–549, 2018.

HUGHES, E. M.; GALLAGHER, E. P. Effects of 17- β estradiol and 4-nonylphenol on phase II electrophilic detoxification pathways in largemouth bass (*Micropterus salmoides*) liver. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 137, n. 3, p. 237–247, 2004.

IBOR, O. R.; ADEOGUN, A. O.; REGOLI, F.; ARUKWE, A. Xenobiotic biotransformation, oxidative stress and obesogenic molecular biomarker responses in *Tilapia guineensis* from Eleyele Lake, Nigeria. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 169, p. 255–265, 2019.

IGUCHI, T.; WATANABE, H.; KATSU, Y. Toxicogenomics and ecotoxicogenomics for studying endocrine disruption and basic biology. **General and Comparative Endocrinology**, v. 153, n. 1–3, p. 25–29, 2007.

ISMAIL, N. A. H.; WEE, S. Y.; ARIS, A. Z. Multi-class of endocrine disrupting compounds in aquaculture ecosystems and health impacts in exposed biota. **Chemosphere**, v. 188, p. 375–388, 2017.

ISOBE, K. O.; ZAKARIA, M. P.; CHIEM, N. H.; MINH, L. Y.; PRUDENTE, M.; BOONYATUMANOND, R.; SAHA, M.; SARKAR, S.; TAKADA, H. Distribution of linear alkylbenzenes (LABs) in riverine and coastal environments in South and Southeast Asia. **Water Research**, v. 38, n. 9, p. 2449–2459, 2004.

JIA, C.; BATTERMAN, S. A Critical Review of Naphthalene Sources and Exposures Relevant to Indoor and Outdoor Air. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 7, n. 7, p. 2903–2939, 2010.

JIMÉNEZ-DÍAZ, I.; VELA-SORIA, F.; RODRÍGUEZ-GÓMEZ, R.; ZAFRA-GÓMEZ, A.; BALLESTEROS, O.; NAVALÓN, A. Analytical methods for the assessment of endocrine disrupting chemical exposure during human fetal and lactation stages: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 892, p. 27–48, 2015.

JIN, H.; JI, C.; REN, F.; ANIAGU, S.; TONG, J.; JIANG, Y.; CHEN, T. AHR-Mediated oxidative stress contributes to the cardiac developmental toxicity of trichloroethylene in zebrafish embryos. **Journal of Hazardous Materials**, p. 121521, 2019.

JIN, Y.; CHEN, R.; LIU, W.; FU, Z. Effect of endocrine disrupting chemicals on the transcription of genes related to the innate immune system in the early developmental stage of zebrafish (*Danio rerio*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 28, n. 5–6, p. 854–861, 2010.

JUBENDRADASS, R.; D'CRUZ, S. C.; JUDITH AMALA RANI, S.; MATHUR, P. P. Nonylphenol induces apoptosis via mitochondria- and Fas-l-mediated pathways in the liver of adult male rat. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 62, n. 3, p. 405–411, 2012.

KAMMANN, U.; AKCHA, F.; BUDZINSKI, H.; BURGEOT, T.; GUBBINS, M. J.; LANG, T.; LE MENACH, K.; VETHAAK, A. D.; HYLLAND, K. PAH metabolites in fish bile: From the Seine estuary to Iceland. **Marine Environmental Research**, v. 124, p. 41–45, 2017.

KANEHISA, M.; GOTO, S. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 1, p. 27–30, 2000.

KANIA-KORWEL, I.; LEHMLER, H. J. Chiral polychlorinated biphenyls: absorption, metabolism and excretion—a review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 3, p. 2042–2057, 2016.

KANNAN, K.; KEITH, T. L.; NAYLOR, C. G.; STAPLES, C. A.; SNYDER, S. A.; GIESY, J. P. Nonylphenol and nonylphenol ethoxylates in fish, sediment, and water from the Kalamazoo river, Michigan. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 44, n. 1, p. 77–82, 2003.

KAPTANER, B.; ÜNAL, G. Effects of 17 α -ethynylestradiol and nonylphenol on liver and gonadal apoptosis and histopathology in *Chalcalburnus tarichi*. **Environmental Toxicology**, v. 26, n. 6, p. 610–622, 2011.

KARAMI, A.; TEH, S. J.; ZAKARIA, M. P.; COURTENAY, S. C. Ploidy-, gender-, and dose-dependent alteration of selected biomarkers in *Clarias gariepinus* treated with benzo[a]pyrene. **Journal of Environmental Sciences**, v. 38, p. 95–102, 2015.

KATSIADAKI, I.; SANDERS, M. B.; HENRYS, P. A.; SCOTT, A. P.; MATTHIESSEN, P.; POTTINGER, T. G. Field surveys reveal the presence of anti-androgens in an effluent-receiving river using stickleback-specific biomarkers. **Aquatic Toxicology**, v. 122–123, p. 75–85, 2012.

KAZEMI, S.; MOUSAVI KANI, S. N.; GHASEMI-KASMAN, M.; AGHAPOUR, F.; KHORASANI, H.; MOGHADAMNIA, A. A. Nonylphenol induces liver toxicity and oxidative stress in rat. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 479, n. 1, p. 17–21, 2016.

KEEN, J. H.; HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Mechanism for the several activities of the glutathione S transferases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 251, n. 20, p. 6183–6188, 1976.

KENNISH, M. J. Environmental threats and environmental future of estuaries. **Environmental Conservation**, v. 29, n. 1, p. 78–107, 2002.

KIM, R. O.; KIM, B. M.; HWANG, D. S.; AU, D. W. T.; JUNG, J. H.; SHIM, W. J.; LEUNG, K. M. Y.; WU, R. S. S.; RHEE, J. S.; LEE, J. S. Evaluation of biomarker potential of cytochrome P450 1A (*CYP1A*) gene in the marine medaka, *Oryzias melastigma* exposed to water-accommodated fractions (WAFs) of Iranian crude oil. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 157, n. 2, p. 172–182, 2013.

KIRBY, M. F.; SMITH, A. J.; ROOKE, J.; NEALL, P.; SCOTT, A. P.; KATSIADAKI, I. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) and vitellogenin (VTG) in flounder (*Platichthys flesus*): System interaction, crosstalk and implications for monitoring. **Aquatic Toxicology**, v. 81, n. 3, p. 233–244, 2007.

KLAPER, R.; WELCH, L. Emerging contaminant threats and the Great Lakes. **Alliance for the Great Lakes.**, p. 34, 2011.

KLEINOW, K. M.; MELANCON, M. J.; LECH, J. J. Biotransformation and Induction: Implications for Toxicity, Bioaccumulation and Monitoring of Environmental Xenobiotics in Fish. **Environmental Health Perspectives**, v. 71, p. 105, 1987.

KLOTZ, L.-O.; STEINBRENNER, H. Cellular adaptation to xenobiotics: Interplay between xenosensors, reactive oxygen species and FOXO transcription factors. **Redox Biology**, v. 13, p. 646–654, 2017.

KNOEBL, I.; HEMMER, M. J.; DENSLOW, N. D. Induction of zona radiata and vitellogenin genes in estradiol and nonylphenol exposed male sheepshead minnows (*Cyprinodon variegatus*). **Marine Environmental Research**, v. 58, n. 2–5, p. 547–551, 2004.

KOENIG, S.; PORTE, C.; SOLÉ, M.; STURVE, J.. Biliary PAH and alkylphenol metabolites, biomarker enzyme activities, and gene expression levels in the deep-sea fish *Alepocephalus rostratus*. **Environmental Science and Technology**, v. 47, n. 6, p. 2854–2861, 2013.

KOENIG, S.; FERNÁNDEZ, P.; SOLÉ, M. Differences in cytochrome P450 enzyme activities between fish and crustacea: Relationship with the bioaccumulation patterns of polychlorobiphenyls (PCBs). **Aquatic Toxicology**, v. 108, n. 2, p. 11–17, 2012.

KOIVUSAARI, U.; HARRI, M.; HÄNNINEN, O. Seasonal variation of hepatic biotransformation in female and male rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology**, v. 70, n. 2, p. 149–157, 1981.

KONG, H. J.; LEE, I. K.; KIM, J.; KIM, W. J.; KIM, H. S.; CHO, W. S.; KIM, D. W.; PARK, J. Y.; AN, C. M. RNA-Seq-based transcriptome analysis of Korean rose bitterling (*Rhodeus uyekii*) exposed to synthetic estrogen 17- α -ethinylestradiol (EE₂). **Marine Genomics**, v. 24, p. 233–236, 2015.

KOPECKA-PILARCZYK, J.; CORREIA, A. D. Biochemical response in gilthead seabream (*Sparus aurata*) to *in vivo* exposure to pyrene and fluorene. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 372, n. 1–2, p. 49–57, 2009.

KOUROUMA, A.; KEITA, H.; DUAN, P.; QUAN, C.; BILIVOGUI, K. K.; QI, S.; CHRISTIANE, N. A.; OSAMUYIMEN, A.; YANG, K. Effects of 4-nonylphenol on oxidant/antioxidant balance system inducing hepatic steatosis in male rat. **Toxicology Reports**, v. 2, p. 1423–1433, 2015.

KROGH, A.; LARSSON, B.; VON HEIJNE, G.; SONNHAMMER, E. L. L. Predicting transmembrane protein topology with a hidden markov model: application to complete genomes. **Journal of Molecular Biology**, v. 305, n. 3, p. 567–580, 2001.

KU, P.; WU, X.; NIE, X.; OU, R.; WANG, L.; SU, T.; LI, Y. Effects of triclosan on the detoxification system in the yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*): Expressions of *CYP* and *GST* genes and corresponding enzyme activity in phase I, II and antioxidant system. **Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology**, v. 166, p. 105-114, 2014.

KUBOTA, A.; GOLDSTONE, J. V.; LEMAIRE, B.; TAKATA, M.; WOODIN, B. R.; STEGEMAN, J. J. Role of pregnane x receptor and aryl hydrocarbon receptor in transcriptional regulation of *pxr*, *CYP2*, and *CYP3* genes in developing zebrafish. **Toxicological Sciences**, v. 143, n. 2, p. 398–407, 2015.

LAHENS, N. F.; RICCIOTTI, E.; SMIRNOVA, O.; TOORENS, E.; KIM, E. J.; BARUZZO, G.; HAYER, K. E.; GANGULY, T.; SCHUG, J.; GRANT, G. R. A comparison of Illumina and Ion Torrent sequencing platforms in the context of differential gene expression. **BMC Genomics**, v. 18, n. 1, p. 602, 2017.

LAIZÉ, V.; GAVAIA, P. J.; TARASCO, M.; VIEGAS, M. N.; CARIA, J.; LUIS, N.; CANCELA, M. L. Osteotoxicity of 3-methylcholanthrene in fish. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 161, p. 721–728, 2018.

LAM, P. K. S.; GRAY, J. S. The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. **Marine Pollution Bulletin**, v. 46, n. 2, p. 182–186, 2003.

LANGE, A.; CORCORAN, J.; MIYAGAWA, S.; IGUCHI, T.; WINTER, M. J.; TYLER, C. R. Development of a common carp (*Cyprinus carpio*) pregnane X receptor (cPXR) transactivation reporter assay and its activation by azole fungicides and pharmaceutical chemicals. **Toxicology in Vitro**, v. 41, p. 114–122, 2017.

LARA-MARTÍN, P. A.; GONZÁLEZ-MAZO, E.; BROWNAWELL, B. J. Environmental analysis of alcohol ethoxylates and nonylphenol ethoxylate metabolites by ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 402, n. 7, p. 2359–2368, 2012.

LARIGOT, L.; JURICEK, L.; DAIROU, J.; COUMOUL, X. AhR signaling pathways and regulatory functions. **Biochimie Open**, v. 7, p. 1–9, 2018.

LARKIN, P.; SABO-ATTWOOD, T.; KELSO, J.; DENSLOW, N. D. Gene expression analysis of largemouth bass exposed to estradiol, nonylphenol, and *p,p'*-DDE. **Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology**, v. 133, n. 4, p. 543–557, 2002.

LEE, J.; PROKOPEC, S. D.; WATSON, J. D.; SUN, R. X.; POHJANVIRTA, R.; BOUTROS, P. C. Male and female mice show significant differences in hepatic transcriptomic response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. **BMC Genomics**, v. 16, n. 1, p. 625, 2015a.

LEE, S.; SHIN, W. H.; HONG, S.; KANG, H.; JUNG, D.; YIM, U. H.; SHIM, W. J.; KHIM, J. S.; SEOK, C.; GIESY, J. P.; CHOI, K. Measured and predicted affinities of binding and relative potencies to activate the AhR of PAHs and their alkylated analogues. **Chemosphere**, v. 139, p. 23–29, 2015b.

LI, H.; WANG, H. Activation of xenobiotic receptors: driving into the nucleus. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v. 6, n. 4, p. 409–426, 2010.

LI, W.; SCHULMAN, S.; BOYD, D.; ERLANDSON, K.; BECKWITH, J.; RAPOPORT, T. A. The Plug Domain of the SecY Protein Stabilizes the Closed State of the Translocation Channel and Maintains a Membrane Seal. **Molecular Cell**, v. 26, n. 4, p. 511–521, 2007.

LI, Z. H.; ZLABEK, V.; GRABIC, R.; LI, P.; RANDAK, T. Modulation of glutathione-related antioxidant defense system of fish chronically treated by the fungicide propiconazole. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 152, n. 3, p. 392–398, 2010.

LIANG, Q.; SHENG, Y.; JIANG, P.; JI, L.; XIA, Y.; MIN, Y.; WANG, Z. The gender-dependent difference of liver GSH antioxidant system in mice and its influence on isoline-induced liver injury. **Toxicology**, v. 280, n. 1–2, p. 61–69, 2011.

LICATA, P.; PICCIONE, G.; FAZIO, F.; LAURIANO, E. R.; CALÒ, M. Protective effects of genistein on cytochrome P-450 and vitellogenin expression in liver of zebrafish after PCB-126 exposure. **Science of the Total Environment**, v. 674, p. 71–76, 2019.

LIMA, D.; MATTOS, J. J.; PIAZZA, R. S.; RIGHETTI, B. P. H.; MONTEIRO, J. S.; GROTT, S. C.; ALVES, T. C.; TANIGUCHI, S.; BÍCEGO, M. C.; DE ALMEIDA, E. A.; BEBIANNO, M. J.; MEDEIROS, I. D.; BAINY, A. C. D. Stress responses in *Crassostrea gasar* exposed to combined effects of acute pH changes and phenanthrene. **Science of The Total Environment**, v. 678, p. 585–593, 2019.

LIN, Y.; TAN, K. T.; LIU, J.; KONG, X.; HUANG, Z.; XU, X. Q. Global profiling of Rbm24 bound RNAs uncovers a multi-tasking RNA binding protein. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 94, p. 10–21, 2018.

LINDE-ARIAS, A. R.; INÁCIO, A. F.; NOVO, L. A.; DE ALBURQUERQUE, C.; MOREIRA, J. C. Multibiomarker approach in fish to assess the impact of pollution in a large Brazilian river, Paraíba do Sul. **Environmental Pollution**, v. 156, n. 3, p. 974–979, 2008.

LIU, H.; HE, J.; CHI, C.; GU, Y. Identification and analysis of icCu/Zn-SOD, Mn-SOD and ecCu/Zn-SOD in superoxide dismutase multigene family of *Pseudosciaena crocea*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 43, n. 2, p. 491–501, 2015.

LIU, H.; YANG, J.; HUANG, S.; LIU, R.; HE, Y.; ZHENG, D.; LIU, C.. Mulberry crude extracts induce Nrf2 activation and expression of detoxifying enzymes in rat liver: Implication for its protection against NP-induced toxic effects. **Journal of Functional Foods**, v. 32, p. 367–374, 2017.

LIVINGSTONE, D. R. Biotechnology and pollution monitoring: Use of molecular biomarkers in the aquatic environment. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 57, n. 3, p. 195–211, 1993.

LIVINGSTONE, D. R. Contaminant-stimulated Reactive Oxygen Species Production and Oxidative Damage in Aquatic Organisms. **Marine Pollution Bulletin**, v. 42, n. 8, p. 656–666, 2001.

LONG, Y.; LI, Q.; CUI, Z. Molecular analysis and heavy metal detoxification of ABC1/MRP1 in zebrafish. **Molecular Biology Reports**, v. 38, n. 3, p. 1703–1711, 2011.

LOPES, K. C.; FERRÃO-FILHO, A. S.; DOS SANTOS, E. G. N.; CUNHA, R. A.; SANTOS, C. P. Effects of crude extracts of a saxitoxin-producer strain of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* on the swimming behavior of wild and laboratory reared guppy *Poecilia vivipara*. **Toxicon**, v. 129, p. 44-51, 2017.

LU, J.; HOLMGREN, A. Free Radical Biology and Medicine The thioredoxin antioxidant system. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 66, p. 1–13, 2013.

LUCKENBACH, T.; FISCHER, S.; STURM, A. Current advances on ABC drug transporters in fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 165, p. 28–52, 2014.

LUSHCHAK, V. I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. **Aquatic Toxicology**, v. 101, n. 1, p. 13–30, 2011.

LV, Y-Z.; YAO, L.; WANG, L.; LIU, W-R.; ZHAO, J-L.; HE, L-Y.; YING, G-G. Bioaccumulation, metabolism, and risk assessment of phenolic endocrine disrupting chemicals in specific tissues of wild fish. **Chemosphere**, v. 226, p. 607–615, 2019.

MACHADO, A. A. DE S.; HOFF, M. L. M.; KLEIN, R. D.; CARDOZO, J. G.; GIACOMIN, M. M.; PINHO, G. L. L.; BIANCHINI, A. Biomarkers of waterborne copper exposure in the guppy *Poecilia vivipara* acclimated to salt water. **Aquatic Toxicology**, v. 138–139, p. 60–69, 2013.

MACHADO, A. A. DE S.; COSTA, P. G.; CORDEIRO, G. J.; KLEIN, R. D.; BIANCHINI, A.; HOFF, M. L. M.; LENCINA AVILA, J. M. Oxidative stress and DNA damage responses to phenanthrene exposure in the estuarine guppy *Poecilia vivipara*. **Marine Environmental Research**, v. 98, p. 96-105, 2014.

MACHADO, A. M.; FELÍCIO, M.; FONSECA, E.; DA FONSECA, R. R.; CASTRO, L. F. C. A resource for sustainable management: *De novo* assembly and annotation of the liver transcriptome of the Atlantic chub mackerel, *Scomber colias*. **Data in Brief**, v. 18, p. 276–284, 2018.

MACHADO, A. M.; FERRAZ, R.; RIBEIRO, R. DO A.; OZÓRIO, R.; CASTRO, L. F. C. From the Amazon: A comprehensive liver transcriptome dataset of the teleost fish tambaqui, *Colossoma macropomum*. **Data in Brief**, v. 23, p. 1–7, 2019.

MACLEOD, W. D. (WILLIAM D. . **Standard analytical procedures of the NOAA National Analytical Facility, 1985-1986 : extractable toxic organic compounds** (N. and A. F. C. (U.S.) et al., Eds.): NOAA technical memorandum NMFS F/NWC ; 92. National Oceanic and Atmospheric Administration, National Marine Fisheries Service, Northwest and Alaska Fisheries Center, Environmental Conservation Division, 1985. Disponível em: <<https://repository.library.noaa.gov/view/noaa/5671>>

MAHMOUD, M. A.; ABDELSALAM, M.; MAHDY, O. A.; EL MINIAWY, H. M. F.; AHMED, Z. A. M.; OSMAN, A. H.; MOHAMED, H. M. H.; KHATTAB, A. M.; ZAKI EWISS, M. A. Infectious bacterial pathogens, parasites and pathological correlations of sewage pollution as an important threat to farmed fishes in Egypt. **Environmental Pollution**, v. 219, p. 939–948, 2016.

MAKRINOS, D. L.; BOWDEN, T. J. Natural environmental impacts on teleost immune function. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 53, p. 50–57, 2016.

MANSETH, E.; SKJERVOLD, P. O.; FJÆRA, S. O.; BROSSTAD, F. R.; BJØRNSEN, S.; FLENGSRUD, R. Purification and characterization of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fibrinogen. **Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology**, v. 138, n. 2, p. 169–174, 2004.

MANZETTI, S.; VAN DER SPOEL, D. Impact of sludge deposition on biodiversity. **Ecotoxicology**, v. 24, n. 9, p. 1799–1814, 2015.

MAO, Z.; ZHENG, X. F.; ZHANG, Y. Q.; TAO, X. X.; LI, Y.; WANG, W. Occurrence and biodegradation of nonylphenol in the environment. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 1, p. 491–505, 2012.

MARDIS, E. R. Next-Generation DNA Sequencing Methods. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 9, n. 1, p. 387–402, 2008.

MARINE, R. L.; MAGAÑA, L. C.; CASTRO, C. J.; ZHAO, K.; MONTMAYEUR, A. M.; SCHMIDT, A.; DIEZ-VALCARCE, M.; NG, T. F. F.; VINJÉ, J.; BURNS, C. C.; NIX, W. A.; ROTA, P. A.; OBERSTE, M. S. Comparison of Illumina MiSeq and the Ion Torrent PGM and S5 platforms for whole-genome sequencing of picornaviruses and caliciviruses. **bioRxiv**, p. 705632, 2019.

MARTÍN-POZO, L.; DE ALARCÓN-GÓMEZ, B.; RODRÍGUEZ-GÓMEZ, R.; GARCÍA-CÓRCOLES, M. T.; ÇIPA, M.; ZAFRA-GÓMEZ, A. Analytical methods for the determination of emerging contaminants in sewage sludge samples. A review. **Talanta**, v. 192, p. 508–533, 2019.

MARTIN, J. A.; WANG, Z. Next-generation transcriptome assembly. **Nature Reviews Genetics**, v. 12, n. 10, p. 671–682, 2011.

MARTIN, L. B. B.; FEI, Z.; GIOVANNONI, J. J.; ROSE, J. K. C. Catalyzing plant science research with RNA-seq. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, p. 1–10, 2013.

MARTINS, C. C.; BÍCEGO, M; C.; MAHIQUES, M; M.; FIGUEIRA, R. C.L.; TESSLER, M. G.; MONTONE, R. C. Depositional history of sedimentary linear alkylbenzenes (LABs) in a large South American industrial coastal area (Santos Estuary, Southeastern Brazil). **Environmental Pollution**, v. 158, n. 11, p. 3355–3364, 2010.

MARTINS, C. C.; CABRAL, A. C.; BARBOSA-CINTRA, S. C. T.; DAUNER, A. L. L.; SOUZA, F. M. An integrated evaluation of molecular marker indices and linear alkylbenzenes (LABs) to measure sewage input in a subtropical estuary (Babitonga Bay, Brazil). **Environmental Pollution**, v. 188, p. 71–80, 2014.

MARTYNIUK, C. J.; HOULAHAN, J. Assessing gene network stability and individual variability in the fathead minnow (*Pimephales promelas*) transcriptome. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part D: Genomics and Proteomics**, v. 8, n. 4, p. 283–291, 2013.

MASUO, Y.; ISHIDO, M. Neurotoxicity of endocrine disruptors: Possible involvement in brain development and neurodegeneration. **Journal of Toxicology and Environmental Health - Part B: Critical Reviews**, v. 14, n. 5–7, p. 346–369, 2011.

MASUYAMA, H.; HIRAMATSU, Y.; KUNITOMI, M.; KUDO, T.; MACDONALD, P. N. Endocrine Disrupting Chemicals, Phthalic Acid and Nonylphenol, Activate Pregnane X Receptor-Mediated Transcription. **Molecular Endocrinology**, v. 14, n. 3, p. 421–428, 2000.

MATSON, C. W.; CLARK, B. W.; JENNY, M. J.; FLEMING, C. R.; HAHN, M. E.; DI GIULIO, R. T. Development of the morpholino gene knockdown technique in *Fundulus heteroclitus*: A tool for studying molecular mechanisms in an established environmental model. **Aquatic Toxicology**, v. 87, n. 4, p. 289–295, 2008.

MATTHIESSEN, P.; WELTJE, L. A review of the effects of azole compounds in fish and their possible involvement in masculinization of wild fish populations. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 45, n. 5, p. 453–467, 2015.

MATTOS, J. J.; SIEBERT, M. N.; LUCHMANN, K. H.; GRANUCCI, N.; DORRINGTON, T.; STOCO, P. H.; GRISARD, E. C.; BAINY, A. C. D. Differential gene expression in *Poecilia vivipara* exposed to diesel oil water accommodated fraction. **Marine Environmental Research**, v. 69, p. 31–33, 2010.

MCARDLE, M.; ELSKUS, A.; MCELROY, A.; LARSEN, B.; BENSON, W.; SCHLENK, D. Estrogenic and CYP1A response of mummichogs and sunshine bass to sewage effluent. **Marine Environmental Research**, v. 50, n. 1–5, p. 175–179, 2000.

- MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). **The Journal of biological chemistry**, v. 244, n. 22, p. 6049–6055, 1969.
- MCELROY, A.; CLARK, C.; DUFFY, T.; CHENG, B.; GONDEK, J.; FAST, M.; COOPER, K.; WHITE, L. Interactions between hypoxia and sewage-derived contaminants on gene expression in fish embryos. **Aquatic Toxicology**, v. 108, p. 60–69, 2012.
- MCFARLAND, V. A.; CLARKE, J. U. Environmental Occurrence, Abundance, and Potential Toxicity of Polychlorinated Biphenyl Congeners: Considerations for a Congener-Specific Analysis. **Environmental Health Perspectives**, v. 81, p. 225–239, 1989.
- MDEGELA, R. H.; BRAATHEN, M.; MOSHA, R. D.; SKAARE, J. U.; SANDVIK, M. Assessment of pollution in sewage ponds using biomarker responses in wild African sharp-tooth catfish (*Clarias gariepinus*) in Tanzania. **Ecotoxicology**, v. 19, n. 4, p. 722–734, 2010.
- MEDEIROS, I. D.; SIEBERT, M. N.; DE TOLEDO E SILVA, G.; MORAES, M. O.; MARQUES, M. R. F.; BAINY, A. C. D. Differential gene expression in oyster exposed to sewage. **Marine Environmental Research**, v. 66, n. 1, p. 156–157, 2008.
- MEHINTO, A. C.; MARTYNIUK, C. J.; SPADE, D. J.; DENSLOW, N. D. Applications for next-generation sequencing in fish ecotoxicogenomics. **Frontiers in Genetics**, v. 3, p. 1–10, 2012.
- MEKKAWY, I. A.; MAHMOUD, U. M.; SAYED, A. E.-D. H. Effects of 4-nonylphenol on blood cells of the African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). **Tissue and Cell**, v. 43, n. 4, p. 223–229, 2011.
- MENDONÇA, J. P.; ANDREATA, J. V. Aspectos reprodutivos de *Poecilia vivipara* (Bloch & Schneider) (Poeciliidae) da Lagoa Rodrigo de Freitas, Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 18, n. 4, p. 1041–1047, 2001.
- MEREDITH, R. W.; PIRES, M. N.; REZNICK, D. N.; SPRINGER, M. S. Molecular phylogenetic relationships and the evolution of the placenta in *Poecilia* (Micropoecilia) (Poeciliidae: Cyprinodontiformes). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 55, n. 2, p. 631–639, 2010.
- MESSINA, A.; PUCCINELLI, E.; GERVASI, P. G.; LONGO, V. Expression and inducibility of CYP1A1, 1A2, 1B1 by β -naphthoflavone and CYP2B22, CYP3As by rifampicin in heart regions and coronary arteries of pig. **Research in Veterinary Science**, v. 94, n. 1, p. 77–83, 2013.
- MEUCCI, V.; ARUKWE, A. Detection of vitellogenin and *zona radiata* protein expressions in surface mucus of immature juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) exposed to waterborne nonylphenol. **Aquatic Toxicology**, v. 73, n. 1, p. 1–10, 2005.

MEUCCI, V.; ARUKWE, A. The xenoestrogen 4-nonylphenol modulates hepatic gene expression of pregnane X receptor, aryl hydrocarbon receptor, CYP3A and CYP1A1 in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 142, n. 1–2, p. 142–150, 2006.

MIAO, L.; ST. CLAIR, D. K. Regulation of superoxide dismutase genes: Implications in disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 47, n. 4, p. 344–356, 2009.

MIRACLE, A. L.; ANKLEY, G. T. Ecotoxicogenomics: Linkages between exposure and effects in assessing risks of aquatic contaminants to fish. **Reproductive Toxicology**, v. 19, n. 3 SPEC. ISS., p. 321–326, 2005.

MONTAGNER, C. C.; VIDAL, C.; ACAYABA, R. Contaminantes emergentes em matrizes aquáticas do Brasil: cenário atual e aspectos analíticos, ecotoxicológicos e regulatórios. **Química Nova**, v. 40, n. 9, p. 1094–1110, 2017.

MONTESDEOCA-ESPONDA, S.; ÁLVAREZ-RAYA, C.; TORRES-PADRÓN, M. E.; SOSA-FERRERA, Z.; SANTANA-RODRÍGUEZ, J. J. Monitoring and environmental risk assessment of benzotriazole UV stabilizers in the sewage and coastal environment of Gran Canaria (Canary Islands, Spain). **Journal of Environmental Management**, v. 233, p. 567–575, 2019.

MOROZOVA, O.; MARRA, M. A. Applications of next-generation sequencing technologies in functional genomics. **Genomics**, v. 92, n. 5, p. 255–264, 2008.

MOTA, L. C.; BARFIELD, C.; HERNANDEZ, J. P.; BALDWIN, W. S. Nonylphenol-mediated CYP induction is PXR-dependent: The use of humanized mice and human hepatocytes suggests that hPXR is less sensitive than mouse PXR to nonylphenol treatment. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 252, n. 3, p. 259–267, 2011.

MUTZ, K-O.; HEILKENBRINKER, A.; LÖNNE, M.; WALTER, J-G.; STAHL, F. Transcriptome analysis using next-generation sequencing. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 24, n. 1, p. 22–30, 2013.

MUZZIO, A. M.; NOYES, P. D.; STAPLETON, H. M.; LEMA, S. C. Tissue distribution and thyroid hormone effects on mRNA abundance for membrane transporters Mct8, Mct10, and organic anion-transporting polypeptides (Oatps) in a teleost fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 167, p. 77–89, 2014.

NADERI, M.; ZARGHAM, D.; ASADI, A.; BASHTI, T.; KAMAYI, K. Short-term responses of selected endocrine parameters in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to 4-nonylphenol. **Toxicology and Industrial Health**, v. 31, n. 12, p. 1218–1228, 2015.

NAGAI, T.; INADA, J.; HAMADA, M.; KAI, N.; TANOUE, Y.; KAMINISHI, Y.; NAKAGAWA, H.; FUJIKI, K.; NAKAO, M.; YANO, T. Distribution of Glutathione Peroxidase Activity in Fish. **Fisheries science**, v. 65, n. 4, p. 665–666, 1999.

NAIDU, R.; ARIAS ESPANA, V. A.; LIU, Y.; JIT, J. Emerging contaminants in the environment: Risk-based analysis for better management. **Chemosphere**, v. 154, p. 350–357, 2016.

NASCI, C.; CAMPESAN, G.; FOSSATO, V. U.; TALLANDINI, L.; TURCHETTO, M. Induction of cytochrome *P*-450 and mixed function oxygenase activity by low concentrations of polychlorinated biphenyls in marine fish *Zosterisessor ophiocephalus* (Pall.). **Aquatic Toxicology**, v. 19, n. 4, p. 281–290, 1991.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. PubChem Database. 4-Nonylphenol, PubChem Identifier: **CID 1752**
URL:<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4-Nonylphenol>

NAVAS, J. .; SEGNER, H. Modulation of trout 7-ethoxyresorufin-*O*-deethylase (EROD) activity by estradiol and octylphenol. **Marine Environmental Research**, v. 50, n. 1–5, p. 157–162, 2000.

NAVAS, J. M.; SEGNER, H. Estrogen-mediated suppression of cytochrome P4501A (CYP1A) expression in rainbow trout hepatocytes: Role of estrogen receptor. **Chemico-Biological Interactions**, v. 138, n. 3, p. 285–298, 2001.

NEEDHAM, T. P.; GHOSH, U. Four decades since the ban, old urban wastewater treatment plant remains a dominant source of PCBs to the environment. **Environmental Pollution**, v. 246, p. 390–397, 2019.

NERIS, J. B.; OLIVARES, D. M. M.; VELASCO, F. G.; LUZARDO, F. H. M.; CORREIA, L. O.; GONZÁLEZ, L. N. HHRISK: A code for assessment of human health risk due to environmental chemical pollution. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 170, p. 538–547, 2019.

NEVES, J. V.; WILSON, J. M.; RODRIGUES, P. N. S. Transferrin and ferritin response to bacterial infection: The role of the liver and brain in fish. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 33, n. 7, p. 848–857, 2009.

NIMROD, A. C.; BENSON, W. H. Environmental estrogenic effects of alkylphenol ethoxylates. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 26, n. 3, p. 335–364, 1996.

NOS, D.; NAVARRO, J.; BARRÍA, C.; SOLÉ, M. Carboxylesterase activities in chondrichthyans of the western Mediterranean Sea. **Marine Pollution Bulletin**, v. 119, n. 1, p. 332–335, 2017.

OH, M.; UMASUTHAN, N.; ELVITIGALA, D. A. S.; WAN, Q.; JO, E.; KO, J.; NOH, G. E.; SHIN, S.; RHO, S.; LEE, J. First comparative characterization of three distinct ferritin subunits from a teleost: Evidence for immune-responsive mRNA expression and iron depriving activity of seahorse (*Hippocampus abdominalis*) ferritins. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 49, p. 450–460, 2016.

OHTAKE, F.; BABA, A.; FUJII-KURIYAMA, Y.; KATO, S. Intrinsic AhR function underlies cross-talk of dioxins with sex hormone signalings. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 370, n. 4, p. 541-546, 2008.

OLIVEIRA, M.; PACHECO, M.; SANTOS, M. A. Organ specific antioxidant responses in golden grey mullet (*Liza aurata*) following a short-term exposure to phenanthrene. **Science of The Total Environment**, v. 396, n. 1, p. 70-78, 2008.

ÖMEROĞLU, S.; KARA MURDOCH, F.; DILEK SANIN, F. Investigation of nonylphenol and nonylphenol ethoxylates in sewage sludge samples from a metropolitan wastewater treatment plant in Turkey. **Talanta**, v. 131, p. 650-655, 2015.

ÖSTMAN, M.; LINDBERG, R. H.; FICK, J.; BJÖRN, E.; TYSKLIND, M. Screening of biocides, metals and antibiotics in Swedish sewage sludge and wastewater. **Water Research**, v. 115, p. 318-328, 2017.

OSWALD, S. Organic Anion Transporting Polypeptide (OATP) transporter expression, localization and function in the human intestine. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 195, p. 39-53, 2019.

OUZOUNIS, C.; SANDER, C. Homology of the NifS family of proteins to a new class of pyridoxal phosphate-dependent enzymes. **FEBS Letters**, v. 322, n. 2, p. 159-164, 1993.

PACITTI, D.; WANG, T.; MARTIN, S. A. M.; SWEETMAN, J.; SECOMBES, C.J. Insights into the fish thioredoxin system: Expression profile of thioredoxin and thioredoxin reductase in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during infection and *in vitro* stimulation. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 42, n. 2, p. 261-277, 2014.

PAGANELLI, M.; NYABI, O.; SID, B.; EVRAERTS, J.; EL MALMI, I.; HEREMANS, Y.; DOLLÉ, L.; BENTON, C.; CALDERON, P-B.; VAN GRUNSVEN, L.; HEIMBERG, H.; CAMPARD, D.; SOKAL, E.; NAJIMI, M. Downregulation of Sox9 Expression Associates with Hepatogenic Differentiation of Human Liver Mesenchymal Stem/Progenitor Cells. **Stem Cells and Development**, v. 23, n. 12, p. 1377-1391, 2014.

PATEL, R. K.; JAIN, M. NGS QC toolkit: A toolkit for quality control of next generation sequencing data. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, 2012.

PEREIRA, B. V. R.; SILVA-ZACARIN, E. C. M.; COSTA, M. J.; DOS SANTOS, A. C. A.; DO CARMO, J. B.; NUNES, B. Cholinesterases characterization of three tropical fish species, and their sensitivity towards specific contaminants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 173, p. 482-493, 2019.

PEREIRA, C. D. S.; MARTIN-DÍAZ, M. L.; ZANETTE, J.; CESAR, A.; CHOUERI, R. B.; ABESSA, D. M. S.; CATHARINO, M. G. M.; VASCONCELLOS, M. B. A.; BAINY, A. C. D.; DE SOUSA, E. C. P. M.; DEL VALLS, T. A. Integrated biomarker responses as environmental status descriptors of a coastal zone (São Paulo, Brazil). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 5, p. 1257-1264, 2011.

PEREIRA, C. D. S.; MARANHO, L. A.; CORTEZ, F. S.; PUSCEDDU, F. H.; SANTOS, A. R.; RIBEIRO, D. A.; CESAR, A.; GUIMARÃES, L. L. Occurrence of pharmaceuticals and cocaine in a Brazilian coastal zone. **Science of The Total Environment**, v. 548–549, p. 148–154, 2016.

PERERA, N. C. N.; GODAHEWA, G. I.; JUNG, S.; KIM, M-J.; NAM, B-H.; LEE, J. Identification and characterization of a carboxypeptidase N1 from red lip mullet (*Liza haematocheila*); revealing its immune relevance. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 84, p. 223–232, 2019.

PESCI PEREIRA, C.; DA CONCEIÇÃO PEREIRA, T.; GOMES, G.; QUINTAES, B. R.; BILA, D. M.; CAMPOS, J. C. Evaluation of reduction estrogenic activity in the combined treatment of landfill leachate and sanitary sewage. **Waste Management**, v. 80, p. 339–348, 2018.

PESSATTI, T. B.; LÜCHMANN, K. H.; FLORES-NUNES, F.; MATTOS, J. J.; SASAKI, S. T.; TANIGUCHI, S.; BÍCEGO, M. C.; BAINY, A. C. D. Upregulation of biotransformation genes in gills of oyster *Crassostrea brasiliiana* exposed *in situ* to urban effluents, Florianópolis Bay, Southern Brazil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 131, p. 172–180, 2016.

PETERSEN, T. N.; BRUNAK, S.; VON HEIJNE, G.; NIELSEN, H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. **Nature Methods**, v. 8, n. 10, p. 785–786, 2011.

PETITJEAN, Q.; JEAN, S.; GANDAR, A.; CÔTE, J.; LAFFAILLE, P.; JACQUIN, L. Stress responses in fish: From molecular to evolutionary processes. **Science of The Total Environment**, v. 684, p. 371–380, 2019.

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

PFAFFL, M. W.; TICHOPAD, A.; PRGOMET, C.; NEUVIANS, T. P. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper - Excel-based tool using pair-wise correlations. **Biotechnology Letters**, v. 26, n. 6, p. 509–515, 2004.

PIAZZA, C. E. **IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DA TRANSCRIÇÃO GÊNICA DIFERENCIAL EM PEIXES *Poecilia vivipara* Bloch & Schneider, 1801, EXPOSTOS AO ESGOTO SANITÁRIO**. 2012. 91 f. Dissertação (Mestrado) - em Biotecnologia e Biociências, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

PIAZZA, C. E.; MATTOS, J. J.; DE TOLEDO-SILVA, G.; FLORES-NUNES, F.; TADRASFEIR, M. Z.; TREVISAN, R.; BITTENCOURT, A. C.; BÍCEGO, M. C.; TANIGUCHI, S.; MARQUES, M. R. F.; DAFRÉ, A. L.; BIANCHINI, A.; SOUZA, E. M.; BAINY, A. C. D. Transcriptional effects in the estuarine guppy *Poecilia vivipara* exposed to sanitary sewage in laboratory and *in situ*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 182, p. 109411, 2019.

PIAZZA, R. S.; TREVISAN, R.; FLORES-NUNES, F.; TOLEDO-SILVA, G.; WENDT, N.; MATTOS, J. J.; LIMA, D.; TANIGUCHI, S.; SASAKI, S. T.; MELLO, Á. C. P.; ZACCHI, F. L.; SERRANO, M. A. S.; GOMES, C. H. A. M.; BÍCEGO, M. C.; ALMEIDA, E. A.; BAINY, A. C. D. Exposure to phenanthrene and depuration: Changes on gene transcription, enzymatic activity and lipid peroxidation in gill of scallops *Nodipeecten nodosus*. **Aquatic Toxicology**, v. 177, p. 146–155, 2016.

POLLENZ, R. S. The mechanism of AH receptor protein down-regulation (degradation) and its impact on AH receptor-mediated gene regulation. **Chemico-Biological Interactions**, v. 141, n. 1–2, p. 41–61, 2002.

PORSERYD, T.; REYHANIAN CASPILLO, N.; VOLKOVA, K.; ELABBAS, L.; KÄLLMAN, T.; DINNÉZ, P.; OLSSON, P-E.; PORSCHE-HÄLLSTRÖM, I. Testis transcriptome alterations in zebrafish (*Danio rerio*) with reduced fertility due to developmental exposure to 17 α -ethinyl estradiol. **General and Comparative Endocrinology**, v. 262, p. 44–58, 2018.

POWELL, S.; SZKLARCZYK, D.; TRACHANA, K.; ROTH, A.; KUHN, M.; MULLER, J.; ARNOLD, R.; RATTEI, T.; LETUNIC, I.; DOERKS, T.; JENSEN, L. J.; VON MERING, C.; BORK, P. eggNOG v3.0: Orthologous groups covering 1133 organisms at 41 different taxonomic ranges. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. D1, p. 284–289, 2012.

PRIAC, A.; MORIN-CRINI, N.; DRUART, C.; GAVOILLE, S.; BRADU, C.; LAGARRIGUE, C.; TORRI, G.; WINTERTON, P.; CRINI, G. Alkylphenol and alkylphenol polyethoxylates in water and wastewater: A review of options for their elimination. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, p. S3749–S3773, 2014.

PUNTA, M.; COGGILL, P. C.; EBERHARDT, R. Y.; MISTRY, J.; TATE, J.; BOURSNEILL, C.; PANG, N.; FORSLUND, K.; CERIC, G.; CLEMENTS, J.; HEGER, A.; HOLM, L.; SONNHAMMER, E. L. L.; EDDY, S. R.; BATEMAN, A.; FINN, R. D. The Pfam protein families database. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. D1, p. 290–301, 2012.

QU, X.; HU, M.; SHANG, Y.; PAN, L.; JIA, P.; FU, C.; LIU, Q.; WANG, Y. Liver transcriptome and miRNA analysis of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) intraperitoneally injected with microcystin-LR. **Frontiers in Physiology**, v. 9, p. 1–12, 2018.

QUAIL, M. A.; SMITH, M.; COUPLAND, P.; OTTO, T. D.; HARRIS, S. R.; CONNOR, T. R.; BERTONI, A.; SWERDLOW, H. P.; GU, Y. A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. **BMC Genomics**, v. 13, n. 1, p. 1, 2012a.

QUAIL, M. A.; OTTO, T. D.; GU, Y.; HARRIS, S. R.; SKELLY, T. F.; MCQUILLAN, J. A.; SWERDLOW, H. P.; OYOLA, S. O. Optimal enzymes for amplifying sequencing libraries. **Nature Methods**, v. 9, n. 1, p. 10–11, 2012b.

RADICE, S.; CHIESARA, E.; FUCILE, S.; MARABINI, L. Different effects of PCB101, PCB118, PCB138 and PCB153 alone or mixed in MCF-7 breast cancer cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 7, p. 2561–2567, 2008.

RASTGAR, S.; ALIJANI ARDESHIR, R.; ZABIHI, E.; MOVAHEDINIA, A.; SALATI, A. P. Immunotoxicity of estrogen and nonylphenol on apoptosis and expression of ERs in goldfish macrophage: Opening new avenue for discovering the role of experimental model systems and sexes. **Aquatic Toxicology**, v. 209, p. 159–167, 2019.

RAVASCHIERE, A.; CUTLER, C.; EDLESON, K.; HALEM, Z.; MAGUN, H.; MECKLER, F.; COX, R. Quantification of heat shock protein 70 and acetylcholinesterase over a time course suggests environmental adaptation in a foundational molluscan species. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 142, p. 222–229, 2017.

REBOA, A.; MANDICH, A.; CUTRONEO, L.; CARBONE, C.; MALATESTA, A.; CAPELLO, M. Baseline evaluation of metal contamination in teleost fishes of the Gulf of Tigullio (north-western Italy): Histopathology and chemical analysis. **Marine Pollution Bulletin**, v. 141, p. 16–23, 2019.

REGOLI, F.; GIULIANI, M. E.; BENEDETTI, M.; ARUKWE, A. Molecular and biochemical biomarkers in environmental monitoring: A comparison of biotransformation and antioxidant defense systems in multiple tissues. **Aquatic Toxicology**, v. 105, n. 3- 4 SUPPL., p. 56–66, 2011.

REGOLI, F.; GIULIANI, M. E. Oxidative pathways of chemical toxicity and oxidative stress biomarkers in marine organisms. **Marine Environmental Research**, v. 93, p. 106–117, 2014.

REMPEL, M. A.; SCHLENK, D. Effects of Environmental Estrogens and Antiandrogens on Endocrine Function, Gene Regulation, and Health in Fish. **International Review of Cell and Molecular Biology**, v. 267, p. 207–252, 2008.

RENAUD, L.; AGARWAL, N.; RICHARDS, D. J.; FALCINELLI, S.; HAZARD, E. S.; CARNEVALI, O.; HYDE, J.; HARDIMAN, G. Transcriptomic analysis of short-term 17 α -ethynylestradiol exposure in two Californian sentinel fish species sardine (*Sardinops sagax*) and mackerel (*Scomber japonicus*). **Environmental Pollution**, v. 244, p. 926–937, 2019.

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

RIBALTA, C.; SANCHEZ-HERNANDEZ, J. C.; SOLE, M. Hepatic biotransformation and antioxidant enzyme activities in Mediterranean fish from different habitat depths. **Science of the Total Environment**, v. 532, p. 176-183, 2015.

RIZZI, J.; TANIGUCHI, S.; MARTINS, C. C. Polychlorinated biphenyls (PCBs) and organochlorine pesticides (OCPs) in sediments from an urban- and industrial-impacted subtropical estuary (Babitonga Bay, Brazil). **Marine Pollution Bulletin**, v. 119, n. 1, p. 390–395, 2017.

ROBERTS, C. M.; O'LEARY, B. C.; MCCAULEY, D. J.; CURY, P. M.; DUARTE, C. M.; LUBCHENCO, J.; PAULY, D.; SÁENZ-ARROYO, A.; SUMAILA, U. R.; WILSON, R. W.; WORM, B.; CASTILLA, J. C. Marine reserves can mitigate and promote adaptation to climate change. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 24, p. 6167–6175, 2017.

ROBERTSON, L. S.; MCCORMICK, S. D. The effect of nonylphenol on gene expression in Atlantic salmon smolts. **Aquatic Toxicology**, v. 122–123, p. 36–43, 2012.

ROTH, F.; LESSA, G. C.; WILD, C.; KIKUCHI, R. K. P.; NAUMANN, M. S. Impacts of a high-discharge submarine sewage outfall on water quality in the coastal zone of Salvador (Bahia, Brazil). **Marine Pollution Bulletin**, v. 106, n. 1–2, p. 43–48, 2016.

ROY, N. K.; CANDELMO, A.; DELLATORRE, M.; CHAMBERS, R. C.; NÁDAS, A.; WIRGIN, I. Characterization of AHR2 and CYP1A expression in Atlantic sturgeon and shortnose sturgeon treated with coplanar PCBs and TCDD. **Aquatic Toxicology**, v. 197, p. 19–31, 2018.

RUAN, Y.; WU, R.; LAM, J. C. W.; ZHANG, K.; LAM, P. K. S. Seasonal occurrence and fate of chiral pharmaceuticals in different sewage treatment systems in Hong Kong: Mass balance, enantiomeric profiling, and risk assessment. **Water Research**, v. 149, p. 607–616, 2019.

RUGGERI, B.; UBALDI, M.; LOURDUSAMY, A.; SOVERCHIA, L.; CICCOCIOPPO, R.; HARDIMAN, G.; BAKER, M. E.; PALERMO, F.; POLZONETTI-MAGNI, A. M. Variation of the genetic expression pattern after exposure to estradiol-17 β and 4-nonylphenol in male zebrafish (*Danio rerio*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 158, n. 1, p. 138–144, 2008.

RUIZ, M. L.; MOTTINO, A. D.; CATANIA, V. A.; VORE, M. Hormonal Regulation of Hepatic Drug Biotransformation and Transport Systems. In: **Comprehensive Physiology**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2013. v. 3p. 1721–1740.

SAAD, M.; VERBUEKEN, E.; PYPE, C.; CASTELEYN, C.; VAN GINNEKEN, C.; MAES, L.; COS, P.; VAN CRUCHTEN, S. *In vitro* CYP1A activity in the zebrafish: temporal but low metabolite levels during organogenesis and lack of gender differences in the adult stage. **Reproductive Toxicology**, v. 64, p. 50–56, 2016.

SAARISTO, M.; WONG, B. B. M.; MINCARELLI, L.; CRAIG, A.; JOHNSTONE, C. P.; ALLINSON, M.; LINDSTRÖM, K.; CRAFT, J. A. Characterisation of the transcriptome of male and female wild-type guppy brains with RNA-Seq and consequences of exposure to the pharmaceutical pollutant, 17 α -ethinyl estradiol. **Aquatic Toxicology**, v. 186, p. 28–39, 2017.

SANCHEZ, W.; SREMSKI, W.; PICCINI, B.; PALLUEL, O.; MAILLOT-MARÉCHAL, E.; BETOULLE, S.; JAFFAL, A.; AÏT-AÏSSA, S.; BRION, F.; THYBAUD, E.; HINFRAY, N.; PORCHER, J. M. Adverse effects in wild fish living downstream from pharmaceutical manufacture discharges. **Environment International**, v. 37, n. 8, p. 1342–1348, 2011.

SANDHOLT, G. B.; STEFANSSON, B.; SCHEVING, R.; GUDMUNSDOTTIR, Á. Biochemical characterization of a native group III trypsin ZT from Atlantic cod (*Gadus morhua*). **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 125, p. 847–855, 2019.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, n. 12, p. 5463–5467, 1977.

SANNI, S.; LYNG, E.; PAMPANIN, D. M.; SMIT, M. G. D. II. Species sensitivity distributions based on biomarkers and whole organism responses for integrated impact and risk assessment criteria. **Marine Environmental Research**, v. 127, p. 11–23, 2017a.

SANNI, S.; BJÖRKBLUM, C.; JONSSON, H.; GODAL, B. F.; LIEWENBORG, B.; LYNG, E.; PAMPANIN, D. M. I: Biomarker quantification in fish exposed to crude oil as input to species sensitivity distributions and threshold values for environmental monitoring. **Marine Environmental Research**, v. 125, p. 10–24, 2017b.

SANTANA, M. S.; SANDRINI-NETO, L.; FILIPAK NETO, F.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; DI DOMENICO, M.; PRODOCIMO, M. M. Biomarker responses in fish exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): Systematic review and meta-analysis. **Environmental Pollution**, v. 242, p. 449–461, 2018.

SCHEDINA, I. M.; GROTH, D.; SCHLUPP, I.; TIEDEMANN, R. The gonadal transcriptome of the unisexual Amazon molly *Poecilia formosa* in comparison to its sexual ancestors, *Poecilia mexicana* and *Poecilia latipinna*. **BMC Genomics**, v. 19, n. 1, p. 12, 2018.

SCHLENK, D.; CELANDER, M.; GALLAGHER, E. P.; GEORGE, S.; JAMES, M.; KULLMAN, S. W.; VAN DEN HURK, P.; WILLETT, K. Biotransformation in fishes. *In*: DI GIULIO, R. T.; HINTON, D. E. (Eds.), **The Toxicology of Fishes**, Taylor and Francis, New York (2008), pp. 153-234, 2008.

SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. **Nature protocols**, v. 3, n. 6, p. 1101–8, 2008.

SCHULZ, M. H.; ZERBINO, D. R.; VINGRON, M.; BIRNEY, E. Oases: Robust *de novo* RNA-seq assembly across the dynamic range of expression levels. **Bioinformatics**, v. 28, n. 8, p. 1086–1092, 2012.

SEABRA PEREIRA, C. D.; ABESSA, D. M. S.; CHOUERI, R. B.; ALMAGRO-PASTOR, V.; CESAR, A.; MARANHO, L. A.; MARTÍN-DÍAZ, M. L.; TORRES, R. J.; GUSSO-CHOUERI, P. K.; ALMEIDA, J. E.; CORTEZ, F. S.; MOZETO, A. A.; SILBINGER, H. L. N.; SOUSA, E. C. P. M.; DEL VALLS, T. A.; BAINY, A. C.D. Ecological relevance of Sentinels' biomarker responses: A multi-level approach. **Marine Environmental Research**, v. 96, p. 118–126, 2014.

SEDEÑO-DÍAZ, J. E.; LÓPEZ-LÓPEZ, E. Freshwater Fish as Sentinel Organisms: From the Molecular to the Population Level, a Review. *In*: TÜRKER, H, **New Advances and Contributions to Fish Biology**, InTechOpen, (2012), pp. 151-173, 2012.

SELLATHURAI, S.; PRIYATHILAKA, T. T.; LEE, J. Molecular cloning, characterization, and expression level analysis of a marine teleost homolog of catalase from big belly seahorse (*Hippocampus abdominalis*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 89, n. March, p. 647–659, 2019.

SHELLEY, L. K.; ROSS, P. S.; MILLER, K. M.; KAUKINEN, K. H.; KENNEDY, C. J. Toxicity of atrazine and nonylphenol in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Effects on general health, disease susceptibility and gene expression. **Aquatic Toxicology**, v. 124–125, p. 217–226, 2012.

SHELLEY, L. K.; ROSS, P. S.; KENNEDY, C. J. The effects of an in vitro exposure to 17 β -estradiol and nonylphenol on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) peripheral blood leukocytes. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 155, n. 3, p. 440–446, 2012.

SHEN, B. W.; HENNIG, M.; HOHENESTER, E.; JANSONIUS, J. N.; SCHIRMER, T. Crystal structure of human recombinant ornithine aminotransferase. **Journal of Molecular Biology**, v. 277, n. 1, p. 81–102, 1998.

SILVER, N.; BEST, S.; JIANG, J.; THEIN, S. L. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. **BMC Molecular Biology**, v. 7, p. 1–9, 2006.

SNAPE, J. R.; MAUND, S. J.; PICKFORD, D. B.; HUTCHINSON, T. H. Ecotoxicogenomics: The challenge of integrating genomics into aquatic and terrestrial ecotoxicology. **Aquatic Toxicology**, v. 67, n. 2, p. 143–154, 2004.

SOLÉ, M.; RALDUA, D.; BARCELÓ, D.; PORTE, C. 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**, v. 56, n. 3, p. 373–380, 2003.

SOLÉ, M.; SANCHEZ-HERNANDEZ, J. C. An *in vitro* screening with emerging contaminants reveals inhibition of carboxylesterase activity in aquatic organisms. **Aquatic Toxicology**, v. 169, p. 215–222, 2015.

STEGEMAN, J. J.; CHEVIONI, M. Sex differences in cytochrome P-450 and mixed-function oxygenase activity in gonadally mature trout. **Biochemical Pharmacology**, v. 29, n. 4, p. 553–558, 1980.

STEGEMAN, J. J. Influence of Environmental Contamination on Cytochrome P-450 Mixed-Function Oxygenases in Fish: Implications for Recovery in the Wild Harbor Marsh. **Journal of the Fisheries Research Board of Canada**, v. 35, n. 5, p. 668–674, 1978.

SUN, D.; CHEN, Q.; HE, N.; DIAO, P. P.; JIA, L. X.; DUAN, S. S. Effect of environmentally-relevant concentrations of nonylphenol on sexual differentiation in zebrafish: A multi-generational study. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1–8, 2017.

TALBOT, A. T.; POTTINGER, T. G.; SMITH, T. J.; CAIRNS, M. T. Acute phase gene expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after exposure to a confinement stressor: A comparison of pooled and individual data. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 27, n. 2, p. 309–317, 2009.

TARNAWSKA, M.; AUGUSTYNIAK, M.; ŁASZCZYCA, P.; MIGULA, P.; IRNAZAROW, I.; KRZYŻOWSKI, M.; BABCZYŃSKA, A. Immune response of juvenile common carp (*Cyprinus carpio* L.) exposed to a mixture of sewage chemicals. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 88, p. 17–27, 2019.

TELES, M.; GRAVATO, C.; PACHECO, M.; SANTOS, M. A. Juvenile sea bass biotransformation, genotoxic and endocrine responses to β -naphthoflavone, 4-nonylphenol and 17 β -estradiol individual and combined exposures. **Chemosphere**, v. 57, n. 2, p. 147–158, 2004.

THANH, N. M.; JUNG, H.; LYONS, R. E.; NJACI, I.; YOON, B.-H.; CHAND, V.; TUAN, N. V.; THU, V. T. M.; MATHER, P. Optimizing *de novo* transcriptome assembly and extending genomic resources for striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). **Marine Genomics**, v. 23, p. 87–97, 2015.

THIBAUT, R. E.; SCHULTZ, R. J. Reproductive adaptations among viviparous fishes (CYPRINODONTIFORMES: POECILIIDAE). **Evolution**, v. 32, n. 2, p. 320–333, 1978.

THIBAUT, R.; DEBRAUWER, L.; PERDU, E.; GOKSØYR, A.; CRAVEDI, J. P.; ARUKWE, A. Regio-specific hydroxylation of nonylphenol and the involvement of CYP2K- and CYP2M-like iso-enzymes in Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Aquatic Toxicology**, v. 56, n. 3, p. 177–190, 2002.

TOLOSANO, E.; ALTRUDA, F. Hemopexin: Structure, Function, and Regulation. **DNA and Cell Biology**, v. 21, n. 4, p. 297–306, 2002.

TORREIRO-MELO, A. G.; SILVA, J. S.; BIANCHINI, A.; ZANARDI-LAMARDO, E.; DE CARVALHO, P. S. M. Bioconcentration of phenanthrene and metabolites in bile and behavioral alterations in the tropical estuarine guppy *Poecilia vivipara*. **Chemosphere**, v. 132, p. 17-23, 2015.

TORRES-MALDONADO, L.; MORENO-MENDOZA, N.; LANDA, A.; MERCHANT-LARIOS, H. Timing of SOX9 downregulation and female sex determination in gonads of the sea turtle *Lepidochelys olivacea*. **Journal of Experimental Zoology**, v. 290, n. 5, p. 498–503, 2001.

TREVISAN, R.; FLORES-NUNES, F.; DOLORES, E. S.; MATTOS, J.J.; PIAZZA, C. E.; SASAKI, S. T.; TANIGUCHI, S.; MONTONE, R. C.; BÍCEGO, M. C.; DOS REIS, I. M. M.; ZACCHI, F. L.; OTHERO, B. N. M.; BASTOLLA, C. L. V.; MELLO, D. F.; FRAGA, A. P. M.; WENDT, N.; TOLEDO-SILVA, G.; RAZZERA, G.; DAFRE, A. L.; DE MELO, C. M. R.; BIANCHINI, A.; MARQUES, M. R. F.; BAINY, A. C. D. Thiol oxidation of hemolymph

proteins in oysters *Crassostrea brasiliiana* as markers of oxidative damage induced by urban sewage exposure. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 36, n. 7, p. 1833–1845, 2017.

TSAKOGIANNIS, A.; MANOUSAKI, T.; LAGNEL, J.; STERIOTI, A.; PAVLIDIS, M.; PAPANDROULAKIS, N.; MYLONAS, C. C.; TSIGENOPOULOS, C. S. The transcriptomic signature of different sexes in two protogynous hermaphrodites: Insights into the molecular network underlying sex phenotype in fish. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–17, 2018.

TYLER, C. R.; FILBY, A. L.; VAN AERLE, R.; LANGE, A.; BALL, J.; SANTOS, E. M. **Fish toxicogenomics**. In: HOGSTRAND, C.; KILLE, P. Comparative Toxicogenomics Local de publicação: Elsevier Scienc, (2008). pp. 75-132. 2008.

UGUZ, C.; ISCAN, M.; ERGÜVEN, A.; ISGOR, B.; TOGAN, I. The bioaccumulation of nonylphenol and its adverse effect on the liver of rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*). **Environmental Research**, v. 92, n. 3, p. 262–270, 2003.

UN. The sustainable development goals report 2016. **The sustainable development goals report 2018**, 2018.

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, n. 2, p. 57–149, 2003.

VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, v. 3, n. 7, p. research0034.1-0034.11, 2002.

VASUDEVAN, K.; DEVANGA RAGUPATHI, N. K.; JACOB, J. J.; VEERARAGHAVAN, B. Highly accurate-single chromosomal complete genomes using IonTorrent and MinION sequencing of clinical pathogens. **Genomics**, 10 abr. 2019.

VEGA-LÓPEZ, A.; GALAR-MARTÍNEZ, M.; JIMÉNEZ-OROZCO, F. A.; GARCÍA-LATORRE, E.; DOMÍNGUEZ-LÓPEZ, M. L. Gender related differences in the oxidative stress response to PCB exposure in an endangered goodeid fish (*Girardinichthys viviparus*). **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, v. 146, n. 4, p. 672–678, 2007.

VEGA-RETTTER, C.; VÉLIZ, D. Liver transcriptome characterization of the endangered freshwater silverside *Basilichthys microlepidotus* (Teleostei: Atherinopsidae) using next generation sequencing. **Marine Genomics**, v. 18, n. PB, p. 147–150, 2014.

VEIGA-DA-CUNHA, M.; HADI, F.; BALLIGAND, T.; STROOBANT, V.; VAN SCHAFTINGEN, E. Molecular identification of hydroxylysine kinase and of ammoniophospholyases acting on 5-phosphohydroxy-L-lysine and phosphoethanolamine. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 10, p. 7246–7255, 2012.

VERAS, T. B.; DE PAIVA, A. L. R.; DUARTE, M. M. M. B.; NAPOLEÃO, D. C.; PEREIRA CABRAL, J. J. DA S. Analysis of the presence of anti-inflammatories drugs in surface water: A case study in Beberibe river - PE, Brazil. **Chemosphere**, p. 961–969, 2019.

VIARENGO, A.; LOWE, D.; BOLOGNESI, C.; FABBRI, E.; KOEHLER, A. 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: Toxicology & Pharmacology**, v. 146, n. 3, p. 281–300, 2007.

VIDAL-LIÑÁN, L.; BELLAS, J.; SALGUEIRO-GONZÁLEZ, N.; MUNIATEGUI, S.; BEIRAS, R. Bioaccumulation of 4-nonylphenol and effects on biomarkers, acetylcholinesterase, glutathione-S-transferase and glutathione peroxidase, in *Mytilus galloprovincialis* mussel gills. **Environmental Pollution**, v. 200, p. 133–139, 2015.

VIEIRA, C. E. D.; COSTA, P. G.; CALDAS, S. S.; TESSER, M. E.; RISSO, W. E.; ESCARRONE, A. L. V.; PRIMEL, E. G.; BIANCHINI, A.; DOS REIS MARTINEZ, C. B. An integrated approach in subtropical agro-ecosystems: Active biomonitoring, environmental contaminants, bioaccumulation, and multiple biomarkers in fish. **Science of The Total Environment**, v. 666, p. 508–524, 2019.

VITA, N. A.; BROHEM, C. A.; CANAVEZ, A. D. P. M.; OLIVEIRA, C. F. S.; KRUGER, O.; LORENCINI, M.; CARVALHO, C. M. Parameters for assessing the aquatic environmental impact of cosmetic products. **Toxicology Letters**, v. 287, p. 70–82, 2018.

VUORINEN, P. J.; KEINÄNEN, M.; VUONTISJÄRVI, H.; BARŠIENE, J.; BROEG, K.; FÖRLIN, L.; GERCKEN, J.; KOPECKA, J.; KÖHLER, A.; PARKKONEN, J.; PEMPKOWIAK, J.; SCHIEDEK, D. Use of biliary PAH metabolites as a biomarker of pollution in fish from the Baltic Sea. **Marine Pollution Bulletin**, v. 53, n. 8-9, p. 479-487, 2006.

WALKER, C. H. Biochemical biomarkers in ecotoxicology - some recent developments. **Science of the Total Environment**, v. 171, n. 1–3, p. 189–195, 1995.

WANG, C.; KU, P.; NIE, X.; BAO, S.; WANG, Z.; LI, K. Effects of simvastatin on the PXR signaling pathway and the liver histology in *Mugilogobius abei*. **Science of The Total Environment**, v. 651, p. 399–409, 2019.

WANG, D.; ZOU, L.; JIN, Q.; HOU, J.; GE, G.; YANG, L. Human carboxylesterases: a comprehensive review. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 8, n. 5, p. 699–712, 2018.

WANG, L.; CAMUS, A. C.; DONG, W.; THORNTON, C.; WILLETT, K. L. Expression of CYP1C1 and CYP1A in *Fundulus heteroclitus* during PAH-induced carcinogenesis. **Aquatic Toxicology**, v. 99, n. 4, p. 439–447, 2010.

WANG, W.; ZHANG, M.; SUN, L. Ferritin M of *Cynoglossus semilaevis*: An iron-binding protein and a broad-spectrum antimicrobial that depends on the integrity of the ferroxidase center and nucleation center for biological activity. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 31, n. 2, p. 269–274, 2011.

- WARHURST, A. M. An Environmental Assessment of Alkylphenol Ethoxylates and Alkylphenols. **The Journal of Applied Ecology**, v. 32, n. 4, p. 890, 1995.
- WASSMUR, B.; GRÄNS, J.; KLING, P.; CELANDER, M. C. Interactions of pharmaceuticals and other xenobiotics on hepatic pregnane X receptor and cytochrome P450 3A signaling pathway in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquatic Toxicology**, v. 100, n. 1, p. 91–100, 2010.
- WEBER, L. P.; KIPARISSIS, Y.; HWANG, G. S.; NIIMI, A. J.; JANZ, D. M.; METCALFE, C. D. Increased cellular apoptosis after chronic aqueous exposure to nonylphenol and quercetin in adult medaka (*Oryzias latipes*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 131, n. 1, p. 51–59, 2002.
- WEI, G-L.; LIU, L-Y.; BAO, L-J.; ZENG, E. Y. Tracking anthropogenic influences on the continental shelf of China with sedimentary linear alkylbenzenes (LABs). **Marine Pollution Bulletin**, v. 80, n. 1-2, p. 80-87, 2014.
- WENDEL, A. Glutathione peroxidase. **Methods in Enzymology**, v. 77, p. 325–333, 1 jan. 1981.
- WILLIAMS, T. D.; GENSBERG, K.; MINCHIN, S. D.; CHIPMAN, J. K. A DNA expression array to detect toxic stress response in European flounder (*Platichthys flesus*). **Aquatic Toxicology**, v. 65, n. 2, p. 141–157, 2003.
- WILLIAMS, T. D.; MIRBAHAI, L.; CHIPMAN, J. K. The toxicological application of transcriptomics and epigenomics in zebrafish and other teleosts. **Briefings in Functional Genomics**, v. 13, n. 2, p. 157–171, 2014.
- WILLS, L. P.; ZHU, S.; WILLETT, K. L.; DI GIULIO, R. T. Effect of CYP1A inhibition on the biotransformation of benzo[a]pyrene in two populations of *Fundulus heteroclitus* with different exposure histories. **Aquatic Toxicology**, v. 92, n. 3, p. 195–201, 2009.
- WINZER, K.; VAN NOORDEN, C. J. F.; KÖHLER, A. Glucose-6-phosphate dehydrogenase: The key to sex-related xenobiotic toxicity in hepatocytes of European flounder (*Platichthys flesus* L.)? **Aquatic Toxicology**, v. 56, n. 4, p. 275–288, 2002.
- WU, T. Y.; WANG, Y. S.; SONG, Y. C.; CHEN, Z. Y.; CHEN, Y. T.; CHIU, C. C.; WU, C. Y. Fine-tune regulation of carboxypeptidase N1 controls vascular patterning during zebrafish development. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–14, 2017.
- XIE, F.; XIAO, P.; CHEN, D.; XU, L.; ZHANG, B. miRDeepFinder: A miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. **Plant Molecular Biology**, v. 80, n. 1, p. 75–84, 2012.

XIE, Y.; CHEN, H.; ZHENG, S.; ZHANG, X.; MU, S. Molecular characterization of cu/Zn SOD gene in Asian clam *Corbicula fluminea* and mRNA expression and enzymatic activity modulation induced by metals. **Gene**, v. 663, p. 189–195, 2018.

XU, C.; LI, C. Y.-T.; KONG, A.-N. T. Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. **Archives of pharmacal research**, v. 28, n. 3, p. 249–68, 2005.

XU, Y.; PARK, S. J.; CHAN GYE, M. Effects of nonylphenols on embryonic development and metamorphosis of *Xenopus laevis*: FETAX and amphibian metamorphosis toxicity test (OECD TG231). **Environmental Research**, v. 174, p. 14–23, 2019.

YADAV, S.; KUMAR, R.; KHARE, P.; TRIPATHI, M. Oxidative stress biomarkers in the freshwater fish, *Heteropneustes fossilis* (bloch) exposed to sodium fluoride: Antioxidant Defense and role of ascorbic acid. **Toxicology International**, v. 22, n. 1, p. 71, 2015.

YADETIE, F.; MALE, R. Effects of 4-nonylphenol on gene expression of pituitary hormones in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Aquatic Toxicology**, v. 58, n. 1–2, p. 113–129, 2002.

YAMASHITA, U.; SUGIURA, T.; KURODA, E. Effect of Endocrine Disrupters on Immune Responses *In Vitro*. **Journal of UOEH**, v. 24, n. 1, p. 1–10, 2002.

YAMASHITA, Y.; YABU, T.; TOUHATA, K.; YAMASHITA, M. Purification and characterization of glutathione peroxidase 1 in the red muscle of Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis*. **Fisheries Science**, v. 78, n. 2, p. 407–413, 2012.

YAN, Z.; LU, G.; HE, J. Reciprocal inhibiting interactive mechanism between the estrogen receptor and aryl hydrocarbon receptor signaling pathways in goldfish (*Carassius auratus*) exposed to 17 β -estradiol and benzo[a]pyrene. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 156, n. 1, p. 17–23, 2012.

YE, J.; FANG, L.; ZHENG, H.; ZHANG, Y.; CHEN, J.; ZHANG, Z.; WANG, J.; LI, S.; LI, R.; BOLUND, L.; WANG, J. WEGO: A web tool for plotting GO annotations. **Nucleic Acids Research**, v. 34, n. WEB. SERV. ISS., p. 293–297, 2006.

YE, R. R.; PETERSON, D. R.; KITAMURA, S. I.; SEGNER, H.; SEEMANN, F.; AU, D. W. T. Sex-specific immunomodulatory action of the environmental estrogen 17 α -ethynylestradiol alongside with reproductive impairment in fish. **Aquatic Toxicology**, v. 203, n. May, p. 95–106, 2018.

YEBRA-PIMENTEL, E. S.; GEBERT, M.; JANSSEN, H. J.; JONG-RAADSEN, S. A.; DIRKS, RON P. H. Deep transcriptome analysis of the heat shock response in an Atlantic sturgeon (*Acipenser oxyrinchus*) cell line. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 88, p. 508–517, 2019.

YOKOI, H.; KOBAYASHI, T.; TANAKA, M.; NAGAHAMA, Y.; WAKAMATSU, Y.; TAKEDA, H.; ARAKI, K.; MOROHASHI, K.-I.; OZATO, K. *sox9* in a teleost fish, medaka (*Oryzias latipes*): Evidence for diversified function of *Sox9* in gonad differentiation. **Molecular Reproduction and Development**, v. 63, n. 1, p. 5–16, 2002.

YUAN, C.; WU, T.; ZHANG, Y.; GAO, J.; YANG, Y.; QIN, F.; LIU, S.; ZHENG, Y.; WANG, Z. Responsiveness of four gender-specific genes, *figla*, *foxl2*, *scp3* and *sox9a* to 17 α -ethinylestradiol in adult rare minnow *Gobiocypris rarus*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 200, p. 44–53, 2014.

ZACCHI, F. L.; FLORES-NUNES, F.; MATTOS, J. J.; LIMA, D.; LÜCHMANN, K. H.; SASAKI, S. T.; BÍCEGO, M. C.; TANIGUCHI, S.; MONTONE, R. C.; DE ALMEIDA, E. A.; BAINY, A. C. D. Biochemical and molecular responses in oysters *Crassostrea brasiliiana* collected from estuarine aquaculture areas in Southern Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 135, n. July, p. 110–118, 2018.

ZEBRAL, Y. D.; ROZA, M.; FONSECA, J. S.; COSTA, P. G.; DE OLIVEIRA, C. S.; ZOCKE, T. G.; DAL PIZZOL, J. L.; BERTEAUX, R. R.; BIANCHINI, A. Waterborne copper is more toxic to the killifish *Poecilia vivipara* in elevated temperatures: Linking oxidative stress in the liver with reduced organismal thermal performance. **Aquatic Toxicology**, v. 209, p. 142–149, 2019a.

ZEBRAL, Y. D.; ANNI, I. S. A.; JUNIOR, A. S. V.; CORCINI, C. D.; DA SILVA, J. C.; CALDAS, J. S.; ACOSTA, I. B.; AFONSO, S. B.; BIANCHINI, A. Life-time exposure to waterborne copper IV: Sperm quality parameters are negatively affected in the killifish *Poecilia vivipara*. **Chemosphere**, v. 236, p. 124332, 2019b.

ZERBINO, D. R.; BIRNEY, E. Velvet: Algorithms for *de novo* short read assembly using de Bruijn graphs. **Genome Research**, v. 18, n. 5, p. 821–829, 2008.

ZHANG, J-L.; ZHANG, C-N.; LI, E-C.; JIN, M-M.; HUANG, M-X.; CUI, W.; LIN, Y-Y.; SHI, Y. J. Triphenyltin exposure affects mating behaviors and attractiveness to females during mating in male guppies (*Poecilia reticulata*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 169, p. 76–84, 2019.

ZHANG, Q.; ZHANG, Y.; DU, J.; ZHAO, M. Environmentally relevant levels of λ -cyhalothrin, fenvalerate, and permethrin cause developmental toxicity and disrupt endocrine system in zebrafish (*Danio rerio*) embryo. **Chemosphere**, v. 185, p. 1173–1180, 2017.

ZHOU, M.; MAITRA, S.; WANG, P. The potential role of transcription factor aryl hydrocarbon receptor in downregulation of hepatic cytochrome P-450 during sepsis. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 71, n. 2, p. 233–236, 2008.

ZHOU, R.; TARDIVEL, A.; THORENS, B.; CHOI, I.; TSCHOPP, J. Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. **Nature Immunology**, v. 11, n. 2, p. 136–140, 2010.

ZHU, L-Y.; NIE, L.; ZHU, G.; XIANG, L-X.; SHAO, J-Z. Advances in research of fish immune-relevant genes: A comparative overview of innate and adaptive immunity in teleosts. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 39, n. 1–2, p. 39–62, 2012.

ZIMMER, A. M.; BARCAROLLI, I. F.; WOOD, C. M.; BIANCHINI, A.. Waterborne copper exposure inhibits ammonia excretion and branchial carbonic anhydrase activity in euryhaline guppies acclimated to both fresh water and sea water. **Aquatic Toxicology**, v. 122–123, p. 172–180, 2012.

ZORITA, S.; MÅRTENSSON, L.; MATHIASSEN, L. Occurrence and removal of pharmaceuticals in a municipal sewage treatment system in the south of Sweden. **Science of the Total Environment**, v. 407, n. 8, p. 2760–2770, 2009.

Continuação tabela 18

Fator		Atividade hepática 24 h						Atividade hepática 96 h					
		Sexo		Exposição		Interação		Sexo		Exposição		Interação	
		M	F	CT	EX	M	F	M	F	CT	EX	M	F
Biomarcadores	SOD	A	B↓	-	-	-	-	A	B↓	-	-	-	-
	CAT	A	B↓	-	-	-	-	A	B↓	-	-	-	-
	GPx	A	B↑	-	-	↓	-	A	B↑	-	-	-	-
	Se-GPx	A	B↑	-	-	-	-	A	B↑	A	B↓	-	-
	GR	A	B↓	-	-	-	-	A	B↓	A	B↑	-	-
	GST	A	B↑	-	-	-	-	A	B↑	A	B↓	-	↓
	G6PDH	A	B↑	-	-	↓	-	A	B↑	-	-	-	-
	EROD	-	-	A	B↓	-	-	-	-	A	B↓	↓	-
Fator		Atividade branquial 24 h						Atividade branquial 96 h					
		Sexo		Exposição		Interação		Sexo		Exposição		Interação	
		M	F	CT	EX	M	F	M	F	CT	EX	M	F
Biomarcadores	SOD	-	-	-	-	-	-	A	B↓	-	-	-	-
	CAT	A	B↓	-	-	-	-	A	B↓	-	-	-	-
	GPx	-	-	-	-	-	-	A	B↓	-	-	-	-
	Se-GPx	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	GR	-	-	-	-	-	-	A	B↓	-	-	-	-
	GST	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	G6PDH	A	B↑	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	EROD	-	-	-	-	-	-	-	-	A	B↓	-	-

M – Macho; F – Fêmea; CT – Controle; EX – Exposto.

Fonte: Acervo do Autor.