



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E DO  
DESENVOLVIMENTO

Márcia Eduarda Geraldo

**Explorando a expressão gênica na biotransformação de aves marinhas**

Florianópolis

2024

Márcia Eduarda Geraldo

**Explorando a expressão gênica na biotransformação de aves marinhas**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Orientador: Prof. Dr. Guilherme de Toledo e Silva.

Coorientador: Prof. Dr. Afonso Celso Dias Bainy.

Florianópolis

2024

Ficha catalográfica gerada por meio de sistema automatizado gerenciado pela BU/UFSC.  
Dados inseridos pelo próprio autor.

Geraldo, Márcia Eduarda  
Explorando a expressão gênica na biotransformação de  
aves marinhas / Márcia Eduarda Geraldo ; orientador,  
Guilherme de Toledo e Silva, coorientador, Afonso Celso  
Dias Bainy, 2024.  
81 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós  
Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento,  
Florianópolis, 2024.

Inclui referências.

1. Biologia Celular e do Desenvolvimento. 2.  
Ecotoxicogenômica. 3. Transcriptoma. 4. Xenobióticos. I.  
Silva, Guilherme de Toledo e . II. Bainy, Afonso Celso  
Dias . III. Universidade Federal de Santa Catarina.  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do  
Desenvolvimento. IV. Título.



Márcia Eduarda Geraldo

## **Explorando a expressão gênica na biotransformação de aves marinhas**

O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado, em 22 de março de 2024, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Guilherme de Toledo e Silva, Dr.

Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Ricardo Castilho Garcez, Dr.

Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Guilherme Razzera Maciel, Dr.

Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção de título em mestre em Biologia Celular e do Desenvolvimento pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação  
Prof.(a) Juliana Dal-Ri Lindenau, Dr<sup>a</sup>

Prof. Guilherme de Toledo e Silva, Dr.  
Orientador

Florianópolis, 2024.

*Este trabalho é dedicado àqueles que sempre me inspiram e encorajam a alcançar meus objetivos.*

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento da Universidade Federal de Santa Catarina, por toda dedicação e pelos os ensinamentos.

Agradeço também aos profissionais da Superintendência de Governança Eletrônica e Tecnologia da Informação e Comunicação (SeTIC - UFSC) por todo suporte e atenção dada nesse período de processamento e análise dos dados.

Agradeço às instituições que subsidiaram minhas pesquisas durante esse período, CAPES e PETROBRAS.

Agradeço ao meu orientador Guilherme por todos esses anos de apoio, aprendizado, trocas de ideias, dicas, suporte e dedicação para comigo e com o trabalho que desenvolvi. Gostaria de expressar toda a admiração que sinto por você, que vai além dos conhecimentos acadêmicos, mas também pelo coração imenso e empatia por todos à sua volta. Sempre foi e é um prazer trabalhar ao seu lado.

Agradeço também ao meu coorientador Afonso Celso Dias Bainy, por me acolher em seu laboratório e me proporcionar muitos ensinamentos, troca de ideias, suporte e muitas oportunidades.

Agradeço também ao Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica (LABCAI), por todo auxílio prestado, todo suporte, trocas de ideia, aprendizado, muitas risadas e amparo. Vocês foram e são importantes para o desenvolvimento desse projeto.

Gostaria de agradecer à minha colega de laboratório e amante de aves marinhas, Patrícia Serafini. Todo seu amor e sua empolgação ao falar desses animais são contagiantes. Obrigada por todos os ensinamentos sobre essas aves lindas e apaixonantes.

Obrigada ao Ramon Diedrich, que compartilha o mesmo amor e dificuldades da bioinformática comigo.

Aos meus amigos de pós-graduação, Carol, Dani, Lucas e Nerveson, pelas risadas, conversas e cafés durante a rotina corrida e os prazos apertados.

Um agradecimento aos amigos feitos ao longo dos últimos meses, Dudu, Lucca, Luiz e Nina. Obrigada por todas as noites de jogos, músicas e risadas. Todo o tempo compartilhado com vocês, foram e é essencial na minha rotina.

Agradeço à minha amiga Sarah Kirchhofer de Oliveira Cabral, por todas as conversas, apoio, parceria, cervejas, cafés e história ao longo desses anos de amizade que a graduação uniu. Nossa amizade é essencial para me manter firme diante das mais variadas situações do dia a dia.

Obrigada às minhas amigas Fernanda Rosa, Rafaela Pádua de Oliveira e Raphaella Josino por estarem sempre por perto, desde o início da minha carreira acadêmica. Vocês ocupam um lugar especial no meu coração.

Obrigada ao Matheus Marques Soares por ser um irmão, estar sempre por perto acompanhando minha jornada e me apoiando. Seus conselhos e sua amizade são essenciais nessa caminhada.

Agradeço imensamente ao meu parceiro, Douglas Klafke Scheibler. Todo seu apoio, seu amor, sua leveza e tranquilidade fazem meus dias mais felizes. Obrigada por ser meu porto e alguém para quem eu posso correr principalmente nos dias mais difíceis. Te amo com todo meu coração.

Agradeço à família do meu namorado, à vó Lea Klafke, à Roselea Lisiane Klafke Scheibler, à Daniela Klafke Scheibler e ao Nicolas Merlo, por me acolherem e me permitirem serem parte da rotina de vocês.

Por último e mais importante, gostaria de agradecer com todo o meu amor e meu coração aos meus pais, Maureci e Rosana, aos meus irmãos Raquel e Vitor, meu cunhado Daniel e meu afilhado Henrique. Sou grata por todo amor que me é dado, tanto apoio, acolhimento, cuidado, virtudes e ensinamentos que levarei sempre comigo e em meu coração. Minha alegria é poder compartilhar minhas pequenas vitórias e conquista ao lado de vocês. Vocês são essenciais em minha vida. Obrigada por tanto amor sempre.



*Porque nos sonhos entramos em um mundo inteiramente nosso. Deixe que mergulhe no mais profundo oceano, ou flutue na mais alta nuvem.” (Alvo Dumbledore).*

## RESUMO

Nos últimos anos, observou-se um aumento significativo das atividades humanas, resultando no aumento do descarte de resíduos domésticos, industriais e agrícolas no ambiente aquático. Esses eventos têm gerado consequências significativas para os organismos que habitam esses locais. A biotransformação de xenobióticos, um processo metabólico crucial na resposta desses organismos à exposição a substâncias químicas exógenas, desencadeia uma série complexa de eventos metabólicos. As ciências ômicas compreendem diversas subáreas dedicadas à análise de dados biológicos, como a genômica e a transcriptômica. Quando combinadas com a ecotoxicologia, surgem novos campos de estudo, como a ecotoxicogenômica, que se concentra na expressão gênica em espécies não-alvo expostas a contaminantes. Essa abordagem é interessante para esclarecer os processos biológicos subjacentes às respostas fisiológicas diante da contaminação. Nesse contexto, este estudo teve como objetivo realizar a montagem e a anotação do transcriptoma hepático de duas espécies de aves marinhas: *Puffinus puffinus*, encontrada encalhada na praia em estado *post mortem*, e *Larus dominicanus*, que foi encontrada viva na praia e faleceu durante o processo de reabilitação. Ambas as espécies foram coletadas pelo Projeto de Monitoramento de Praias - Bacia de Santos (PMP-BS). O material sequenciado foi montado, apresentando alta qualidade e anotado de acordo com o banco de dados UniProt/SwissProt. A partir da anotação funcional, identificamos genes associados aos processos de biotransformação de fase I e fase II, incluindo genes de *CYP*, *FMO*, *GST*, *SULT*, *UGT* e o receptor *AHR*. As análises de ontologia genética revelaram uma variedade de processos biológicos, destacando-se a atividade transferase. Já as análises de vias metabólicas do KEGG identificaram algumas vias comuns entre as espécies, como necroptose e infecção por *Salmonella*. Esses achados indicam a presença de genes que desempenham papéis biológicos importantes, mesmo em tecidos de aves no estado *post mortem*. Esses resultados abrem novas possibilidades para estudos futuros, além de validar o uso de animais moribundos ou mortos em determinadas análises e projetos científicos.

**Palavras-chave:** Ecotoxicogenômica, Transcriptoma, Xenobióticos.

## ABSTRACT

In recent years, there has been a significant increase in human activities, resulting in the heightened disposal of domestic, industrial, and agricultural waste into the aquatic environment. These events have led to significant consequences for the organisms inhabiting these areas. The biotransformation of xenobiotics, a crucial metabolic process in the response of these organisms to exposure to exogenous chemical substances, triggers a complex series of metabolic events. Omics sciences comprise various subfields dedicated to the analysis of biological data, such as genomics and transcriptomics. When combined with ecotoxicology, new fields of study emerge, such as ecotoxicogenomics, which focuses on gene expression in non-target species exposed to contaminants. This approach is useful in elucidating the biological processes underlying physiological responses to contamination. In this context, this study aimed to perform the assembly and annotation of the hepatic transcriptome of two species of seabirds: *Puffinus puffinus*, found stranded on the beach post mortem, and *Larus dominicanus*, which was found alive on the beach and died during the rehabilitation process. Both species were collected by Projeto de Monitoramento de Praias - Bacia de Santos (PMP-BS). The sequenced material was assembled, showing high quality, and annotated according to the UniProt/SwissProt database. From the functional annotation, we identified genes associated with phase I and phase II biotransformation processes, including *CYP*, *FMO*, *GST*, *SULT*, *UGT* genes, and the *AHR* receptor. Gene ontology analyses revealed a variety of biological processes, with transferase activity standing out. KEGG pathway analyses identified some common pathways between the species, such as necroptosis and *Salmonella* infection. These findings indicate the presence of genes that play important biological roles, even in tissues from post mortem birds. These results open new possibilities for future studies and validate the use of moribund or deceased animals in certain analyses and scientific projects.

**Keywords:** Ecotoxicogenomic, Transcriptome, Xenobiotics.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> <i>Larus dominicanus</i> .....	23
<b>Figura 2.</b> Distribuição geográfica da espécie <i>Larus dominicanus</i> .....	24
<b>Figura 3.</b> <i>Puffinus puffinus</i> . ....	25
<b>Figura 4</b> Distribuição geográfica da espécie <i>Puffinus puffinus</i> . ....	26
<b>Figura 5.</b> Processo de Biotransformação simplificado. ....	27
<b>Figura 6.</b> Espécime resgatado de <i>Larus dominicanus</i> . ....	37
<b>Figura 7.</b> Espécime encalhado de <i>Puffinus puffinus</i> . ....	38
<b>Figura 8.</b> ExN50 de <i>Larus dominicanus</i> . ....	40
<b>Figura 9.</b> ExN50 - <i>Puffinus puffinus</i> . ....	41
<b>Figura 10.</b> Esquema representativo da métrica do N50.....	42
<b>Figura 11.</b> Mapeamento de <i>reads</i> . ....	44
<b>Figura 12.</b> Genes ortólogos identificados via BUSCO.....	45
<b>Figura 13.</b> Cobertura dos transcritos anotados. ....	48
<b>Figura 14.</b> Quantidade de genes expressos nos dois organismos. ....	50
<b>Figura 15.</b> Qualidade por bases de reads brutos (A) e reads limpos (B) calculadas pelo FastQC para os dados de <i>L. dominicanus</i> .....	80
<b>Figura 16.</b> Qualidade por bases de reads brutos (A) e reads limpos (B) calculadas pelo FastQC para os dados de <i>P. puffinus</i> . ....	81

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1.</b> Quantidade de reads estimados através do FastQC. ....	38
<b>Tabela 2.</b> Métricas dos <i>contigs</i> montados para as duas espécies de aves. ....	43
<b>Tabela 3.</b> Sequências com correspondência no banco de dados para os indivíduos estudados. ....	49
<b>Tabela 4.</b> CYPs identificados para os dois indivíduos estudados. ....	52
<b>Tabela 5.</b> Genes identificados com papel estabelecido no metabolismo de xenobióticos de fase I e II para os indivíduos estudados. ....	55
<b>Tabela 6.</b> Termos da ontologia genética enriquecidos para o <i>L. dominicanus</i> . ....	56
<b>Tabela 7.</b> Termos da ontologia genética enriquecidos para o <i>P. puffinus</i> . ....	56
<b>Tabela 8.</b> Enriquecimento de vias do KEGG para o <i>L. dominicanus</i> . ....	57
<b>Tabela 9.</b> Enriquecimento de vias do KEGG para o <i>P. puffinus</i> . ....	58

### LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

AHR	do inglês <i>Aryl Hydrocarbon Receptor</i>
BR	Brasil
CAR	do inglês <i>Constitutive androstane receptor</i>
cDNA	DNA complementar
CDS	do inglês <i>Coding regions</i>
CYP	do inglês <i>Cytochrome P450</i>
<i>CYP1</i>	do inglês <i>Cytochrome P450 Family 1</i>
<i>CYP1A1</i>	do inglês <i>Cytochrome P450 Family 1 subfamily A member 1</i>
<i>CYP2</i>	do inglês <i>Cytochrome P450 Family 2</i>
<i>CYP3</i>	do inglês <i>Cytochrome P450 Family 3</i>
CXR	do inglês <i>Chicken xenobiotic receptor</i>
DDT	diclorodifeniltricloroetano
DNA	Ácido desoxirribonucleico, do inglês <i>desoxyribonucleic acid</i>
et al.	“e outros”, do latim et alii
FMO	do inglês <i>Flavin Containing Dimethylaniline Monooxygenase</i>
<i>FMO1</i>	do inglês <i>Flavin Containing Dimethylaniline Monooxygenase 1</i>
<i>FMO2</i>	do inglês <i>Flavin Containing Dimethylaniline Monooxygenase 2</i>
<i>FMO3</i>	do inglês <i>Flavin Containing Dimethylaniline Monooxygenase 3</i>
<i>FMO5</i>	do inglês <i>Flavin Containing Dimethylaniline Monooxygenase 5</i>
GO	do inglês, <i>Gene ontology</i>
GR	do inglês <i>Glucocorticoid receptor</i>
GST	do inglês <i>Glutathione S-Transferase</i>
<i>GSTA1</i>	do inglês <i>Glutathione S-Transferase Alpha 1</i>
<i>GSTO1</i>	do inglês <i>Glutathione S-Transferase Omega 1</i>
<i>GSTT1</i>	do inglês <i>Glutathione S-Transferase Theta 1</i>
HPA	Hidrocarboneto policíclico aromático
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

IUCN	do inglês <i>International Union for Conservation of Nature</i>
KEGG	do inglês <i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
LABCAI	Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica
mRNA	RNA mensageiro
pb	Pares de base
PCB	do inglês <i>polychlorinated biphenyls</i>
PCR	do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PhAC	do inglês <i>Pharmaceutically active compounds</i>
PMP-BS	Projeto de monitoramento de praia - Bacia de Santos
PXR	do inglês <i>Pregnane X receptor</i>
RNA	Ácido Ribonucleico, do inglês <i>Ribonucleic acid</i>
RNA-Seq	Sequenciamento de RNA
rRNA	RNA ribossomal
SIMBA	Sistema de Informação de Monitoramento da Biota Aquática
SULT	do inglês <i>Sulfotransferase</i>
<i>SULT1B1</i>	do inglês <i>Sulfotransferase Family 1B Member 1</i>
<i>SULT1C1</i>	do inglês <i>Sulfotransferase Family 1C Member 1</i>
<i>SULT1D1</i>	do inglês <i>Sulfotransferase Family 1D Member 1</i>
<i>SULT2B1</i>	do inglês <i>Sulfotransferase Family 2B Member 1</i>
<i>SULT3A1</i>	do inglês <i>Sulfotransferase Family 3A Member 1</i>
tRNA	RNA transportador
UGT	do inglês <i>UDP Glucuronosyltransferase</i>
UGT1	do inglês <i>UDP Glucuronosyltransferase Family 1</i>
<i>UGT1A1</i>	do inglês <i>UDP Glucuronosyltransferase Family 1 Member A1</i>
<i>UGT1A9</i>	do inglês <i>UDP Glucuronosyltransferase Family 1 Member A9</i>
UGT2	do inglês <i>UDP Glucuronosyltransferase Family 2</i>
<i>UGT2A2</i>	do inglês <i>UDP Glucuronosyltransferase Family 2 Member A2</i>
UGT3	do inglês <i>UDP Glucuronosyltransferase Family 3</i>

UGT8      do inglês *UDP Glucuronosyltransferase Family 8*



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	18
1.1 ECOTOXICOGENÔMICA E CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL .....	18
1.2 AVES MARINHAS COMO ORGANISMOS SENTINELAS .....	20
1.2.1 <i>Larus dominicanus</i> .....	22
1.2.2 <i>Puffinus puffinus</i> .....	24
1.3 BIOTRANSFORMAÇÃO DE FASE I e II.....	26
1.4 RNA-Seq APLICADO AO MONITORAMENTO AMBIENTAL .....	29
1.5 BIOMARCADORES.....	30
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	32
2.1 OBJETIVO GERAL .....	32
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO .....	32
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	32
3.1 AQUISIÇÃO DO MATERIAL BIOLÓGICO E ANÁLISE DESCRITIVA DOS INDIVÍDUOS.....	33
3.2 OBTENÇÃO DOS DADOS E ANÁLISE DA QUALIDADE .....	33
3.3 MONTAGEM <i>DE NOVO</i> DOS TRANSCRIPTOMAS.....	34
3.4 ANÁLISE DE QUALIDADE DA MONTAGEM .....	35
3.5 IDENTIFICAÇÃO DE ORFs E ANOTAÇÃO FUNCIONAL .....	35
3.6 ONTOLOGIA GENÉTICA E VIAS METABÓLICAS.....	36
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	36
4.1 ANÁLISE DESCRITIVA DOS INDIVÍDUOS .....	36
4.1.1 <i>Larus dominicanus</i> .....	36
4.1.2 <i>Puffinus puffinus</i> .....	37
4.2 MONTAGEM <i>DE NOVO</i> E ANÁLISE DE QUALIDADE .....	38
4.3 ANOTAÇÃO FUNCIONAL .....	48
4.4 ENRIQUECIMENTO DOS TRANSCRITOS IDENTIFICADOS .....	55
4.4.1 <i>Contexto biológico dos genes</i> .....	55
4.4.2 <i>Vias metabólicas enriquecidas</i> .....	57
<b>5 CONCLUSÃO</b> .....	60
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	62
<b>APÊNDICE A – ANÁLISE DE QUALIDADE DOS <i>READS</i> PRÉ E PÓS REMOÇÃO DE BASES DE BAIXA QUALIDADE</b> .....	80

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 ECOTOXICOGENÔMICA E CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL

Com a crescente industrialização e com o aumento das mais diversas atividades humanas, uma série de problemas ambientais vem surgindo e gerando impactos relevantes para os organismos vivos (Kumari; Khare, 2018). Um exemplo disso é a liberação de xenobióticos no ambiente, ou seja, a liberação de compostos estranhos aos organismos no ambiente em que vivem (Embrandiri et al., 2016). As classes de substâncias encontradas são das mais diversas, existindo compostos exógenos oriundos de toxinas de fungos, de plantas e de bactérias. Devido a ação antrópica novos compostos têm surgido, fazendo com que os organismos tenham contato como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs), metais pesados e compostos farmacêuticos ativos (PhACs), esses últimos, resultando na contaminação do ambiente como consequência da crescente ação antrópica, causando prejuízos para as espécies presentes nesses locais (Klaassen et al., 2003; Akpor, 2014; Santos et al., 2021; Fabbri; Franzellitti, 2016; Soares et al., 2021). Dentre os grupos de contaminantes citados, os HPAs são os principais compostos químicos liberados pela indústria petrolífera. Entre os compostos mais comuns dessa classe estão o naftaleno, o fenantreno, o bifenil, o fenol, o antraceno e o pireno. Todos são considerados altamente responsáveis pela contaminação antrópica em ambientes aquáticos (Ravindra et al., 2019).

Os xenobióticos podem gerar inúmeros prejuízos, afetando características ambientais que ocasionam problemas para a vida local. Algumas das consequências já relatadas estão associadas a problemas na eclosão, no crescimento e disfunções fisiológicas em peixes. Outro problema abordado é o bloqueio da passagem da luz solar, que compromete a capacidade dos organismos aquáticos de absorverem luz, realizar trocas gasosas essenciais e realizar a fotossíntese de modo eficaz (Ravindra et al., 2019; Miglani et al., 2022). A presença de contaminantes afeta os sistemas biológicos de modo amplo podendo gerar lesões, alterações físicas e desorientação além dos problemas fisiológicos já relatados anteriormente (Ravindra et al., 2019). São diversos os grupos de organismos que dependem do ambiente aquático para suprir suas necessidades biológicas e que conseqüentemente são afetados pela contaminação presente nesses locais. As aves marinhas, por exemplo, são animais que utilizam o mar por um grande período da sua vida e que fazem uso de recursos costeiros para reprodução, por exemplo. Diante dessa

necessidade de viver em contato com ambos os ecossistemas, são grupos interessantes quando desejamos compreender a saúde desses locais (Burger; Gochfeld, 2004).

Compreender os efeitos moleculares dos compostos tóxicos é crucial para antecipar e mitigar danos significativos às populações naturais. Essa compreensão permite a identificação precisa dos danos e orienta a elaboração de estratégias preventivas para reduzi-los. Essa abordagem possibilita intervenções precoces para evitar consequências mais graves da exposição aos compostos tóxicos (Kreistberg et al., 2023). A partir dessas necessidades, as ciências ômicas surgem como uma ferramenta interessante para esses estudos. As ciências ômicas compreendem algumas subáreas responsáveis pelo amplo estudo das funções, relações e atividades de diversos tipos de moléculas dentro de um organismo. Algumas áreas incluem o estudo das proteínas (proteômica), das regulações epigenéticas (epigenômica) e outra foca na análise de expressão gênica (transcriptômica) (Mutz et al., 2013; Jiang et al., 2015; Aslam et al., 2016; Wang; Chang, 2018; Olivier et al., 2019). Essas técnicas permitem que análises qualitativas e quantitativas sejam realizadas tanto na área da saúde quanto em análises ecotoxicológicas (Martins et al., 2019; Olivier et al., 2019). A ecotoxicologia, por sua vez, tem como objetivo estudar e compreender a ação e os efeitos de agentes (sintéticos ou naturais) que afetam o ambiente e suas possíveis interações com os organismos vivos, visando a compreensão dos efeitos causados pelos estressores (Kramer et al., 2011). Com a integração entre as áreas de ecotoxicologia e ciências ômicas surge a ecotoxicogenômica. O estudo dessa área é voltado para a expressão de genes e proteínas de organismos não-alvos que estão expostos a contaminantes presentes no ambiente, possibilitando a elucidação dos processos biológicos que afetam esses indivíduos (Kim et al., 2015; Snape et al., 2004; Zhang et al., 2018). Nesse contexto a ecotoxicogenômica surge como uma ferramenta poderosa e inovadora capaz de unir conhecimentos provenientes da ecologia, toxicologia e ciências ômicas, tendo como objetivo a investigação de mecanismos moleculares associados às respostas dos organismos frente à contaminação ambiental (Snape et al., 2004).

A partir dos avanços de tecnologias como o sequenciamento do transcriptoma, houve um aumento considerável de dados genômicos e com eles, a possibilidade de estudar de modo mais específico os processos biológicos dos organismos vivos expostos à poluição ambiental (Garcia-Reyero; Perkins, 2011; Zhang et al., 2018). Deste modo, os

estudos na área da ecotoxicogenômica permitem a análise de expressão de genes associados às respostas dos organismos expostos à contaminantes, possibilitando a identificação e o desenvolvimento de biomarcadores (Steinberg et al., 2008).

A fim de avaliar os efeitos dos compostos tóxicos nos organismos vivos, o uso de biomarcadores tem despertado crescente interesse no campo do monitoramento ambiental. Esses biomarcadores oferecem uma ferramenta essencial para compreender a extensão dos danos causados pelos agentes tóxicos, permitindo uma avaliação mais abrangente da saúde dos ecossistemas (Kumari; Khare, 2018). Algumas espécies, devido a suas características naturais, são mais propícias para servirem de indicadores da saúde do ambiente, sendo denominadas “organismos sentinelas”. Algumas espécies de aves servem bem a esse propósito, sendo possível o biomonitoramento utilizando esse grupo, em que é possível detecção de padrões temporais e espaciais já esperados em um evento de contaminação específico, ou sendo aplicáveis também para a detecção de padrões ainda não descritos em alguma exposição do organismo a um poluente (Cardoso et al., 2014; Clatterbuck et al., 2018; Grant et al., 2018). Diante das questões levantada, os biomarcadores de contaminação desempenham um papel importante na avaliação e caracterização de risco, podendo ser aplicado no monitoramento ambiental em busca de respostas sobre o estado de saúde do ambiente (Gil; Pla, 2001; Sogorb et al., 2014; Kadim; Risjane 2022).

## 1.2 AVES MARINHAS COMO ORGANISMOS SENTINELAS

As aves marinhas compreendem uma ampla variedade de espécies que passam grande parte de suas vidas em contato com o mar e também com regiões costeiras, algumas ordens existentes são Suliformes, Charadriiformes, Sphenisciformes, Procellariiformes, Pelecaniformes, Phaethontiformes, Gaviiformes e Anseriformes (Provencher et al., 2019). Quando consideradas como organismos sentinela, as aves marinhas nos fornecem informações não somente da saúde dos mares, mas também do estado em que as regiões costeiras se encontram. Existem cerca de 368 espécies conhecidas de aves marinhas, das quais mais de 70% estão sob riscos e ameaças de natureza ambiental e climática (BirdLife International, 2023; Dias et al., 2019; Young; Ballance, 2022).

As espécies de aves marinhas desempenham um interessante papel ecológico nos locais onde habitam. As aves, ao se alimentarem de recursos marinhos, transportam nutrientes para as áreas costeiras terrestres e marinhas. Isso enriquece o solo e fornece recursos para outras espécies, contribuindo para o aumento da produtividade local tanto em terra quanto no mar (Hentati-Sundberg et al., 2020; Young; Ballance, 2022).

A grande maioria dessas espécies são consideradas animais de topo de cadeia alimentar, estão expostas à contaminação presente nos recursos que consomem, o que pode resultar na bioacumulação de contaminantes (Burger; Gochfeld, 2004). A bioacumulação, por sua vez, é o acúmulo de contaminantes nos organismos (Borga, 2008). A maioria dos contaminantes que afetam essas aves trata-se de pesticidas, metais pesados, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e outros compostos químicos que podem interagir com o sistema endócrino, levando a distúrbios na saúde desses indivíduos (Burger; Gochfeld, 2004; Young; Ballance, 2022).

Outra característica interessante das aves marinhas é que geralmente retornam à mesma região em que nasceram, manifestando comportamento filopátrico. Esse comportamento oferece uma oportunidade única para a coleta contínua de dados ao longo do tempo. Como as aves retornam regularmente à mesma área, os pesquisadores podem monitorar indivíduos específicos e suas populações ao longo de várias épocas e condições ambientais. Além disso, a filopatria facilita a identificação e a amostragem dessas aves, contribuindo para estudos de longo prazo sobre sua ecologia e comportamento (Burger; Gochfeld, 2004; Young; Ballance, 2022).

Analisando os hábitos de vida desses animais podemos encontrar uma dificuldade em encontrar os focos de exposição aos contaminantes, principalmente quando se trata de espécies migratórias, como é o caso da espécie *Puffinus puffinus*, na qual a exposição a esses compostos e a bioacumulação em seus tecidos podem ocorrer de distintas fontes e de diferentes maneiras (Burger; Gochfeld, 2004). Apesar de existir os desafios relacionados à identificação do foco de contaminação principal, as ferramentas da biologia molecular permitem que estudos e análise dos organismos sejam feitos em busca das respostas biológicas desencadeadas pela exposição a contaminantes através da expressão gênica. A utilização da genômica, por exemplo, permite a identificação e análise de milhares de genes e das mais diversas vias fisiológicas ativas ou inibidas nesses indivíduos quando expostos a um único contaminante ou um grupo desses compostos (Kreitsberg et al., 2023).

Diversos estudos já foram executados utilizando a expressão de genes em busca dos efeitos nas aves expostas aos xenobióticos. Dentre as respostas mais observadas nessas investigações podemos citar algumas vias fisiológicas como a do metabolismo de xenobióticos, sistema endócrino, metabolismo da glutathione, crescimento celular, apoptose, processamento de informações genéticas, estresse oxidativo e metabolismo de carboidratos (Desforgues et al., 2021; Kreitsberg et al., 2023; Sharin et al., 2021). São conhecidos que os efeitos são distintos quando consideramos não somente a classe do composto químico, mas também a variação nos estágios de vida desses animais. De modo geral, indivíduos filhotes possuem respostas fisiológicas associadas principalmente ao reparo celular e proteção de danos e seu principal meio de exposição é através do depósito materno (Ackerman et al., 2016). Por outro lado, os indivíduos adultos são expostos principalmente através da sua alimentação e como forma de lidar com essa exposição, a via metabólica mais ativa é a do metabolismo de xenobióticos (Lucia et al., 2012). Além disso, os animais mais velhos, devido à exposição prolongada, tendem a acumular danos nos tecidos. Eles são ainda recomendados como modelos de estudo mais eficazes, pois suas vias metabólicas não são mascaradas por mecanismos de defesa mais eficientes. (Meitern et al., 2020).

Já se conhece a necessidade de compreender melhor as alterações fisiológicas subletais, pensando principalmente em abordagens precoces de manutenção e cuidado dessas espécies, visando as respostas observadas em um período de exposição mais curto dos indivíduos (Kreitsberg et al., 2023). Aliado a isso, uma abordagem metodológica que possibilite adquirir resultados mais amplos sobre as respostas fisiológicas em decorrência da exposição é fortemente apoiada, permitindo a investigação de novos marcadores genéticos de exposição além, é claro, de efeitos que possam não ser tão conhecidos até o momento (Kreitsberg et al., 2023).

### *1.2.1 Larus dominicanus*

Conhecidos popularmente como Gaivota, os indivíduos da espécie *Larus dominicanus* (Figura 1) pertencem à ordem Charadriiformes e são membros da família Laridae (Schoch et al., 2020). São animais com presença constante na costa brasileira, podendo alcançar cerca de 58cm de comprimento e não realizam grandes migrações (Sick, 1997). Esta espécie está distribuída pelo hemisfério Sul (Figura 2), sendo encontradas no Brasil, até a Terra do Fogo, na Argentina, incluindo também as Ilhas

Malvinas e diversas ilhas oceânicas, como Geórgia do Sul, Sandwich do Sul, Orcadas do Sul e Shetland do Sul. Além disso, ela pode ser encontrada ao longo do litoral da América do Sul, no Pacífico, na África e na Nova Zelândia.

**Figura 1.** *Larus dominicanus*.



Legenda: Ave da espécie *Larus dominicanus*. (Foto: Tony Wills).

As gaivotas podem utilizar diversos habitats, sendo consideradas generalistas e oportunistas, podendo alimentar-se também de recursos antrópicos na sua dieta (Giaccardi et al., 1997). No aspecto reprodutivo, essas aves possuem um alto índice de sucesso. Geralmente há o deslocamento de animais adultos para algumas ilhas e os primeiros ovos podem ser observados em junho, com maior quantidade para setembro e redução em outubro. Os filhotes possuem um crescimento relativamente rápido, os quais 30 dias após a eclosão já estão aptos para voarem, podendo também proteger-se de predadores (Branco; Ebert, 2002).

Ainda que essa espécie esteja classificada como pouco preocupante em relação ao perigo ambiental (BirdLife International, 2023), é interessante realizar buscas mais detalhadas a respeito da genética desses animais, uma vez que não possuem o genoma de referência sequenciado e disponível em bancos de dados.

**Figura 2.** Distribuição geográfica da espécie *Larus dominicanus*.



Legenda: Distribuição geográfica da espécie *Larus dominicanus* destacada pela cor marrom no mapa.

Fonte: Adaptado de IUCN (<https://www.iucnredlist.org/species/22694329/132542863>).

### 1.2.2 *Puffinus puffinus*

Pertencentes à ordem Procellariiformes e à família Procellariidae, os indivíduos da espécie *Puffinus puffinus* (Figura 3) são popularmente conhecidos como pardela sombria ou bobo pequeno (Schoch et al., 2020). Estes animais medem de 30 a 38 centímetros podendo ter uma envergadura de 76 a 89 centímetros (del Hoyo et al., 1992). Essa espécie se distribui pelo oceano Atlântico Norte e Sul (Figura 4) migrando para a costa brasileira no período de inverno da região Norte (Guilford et al., 2009).



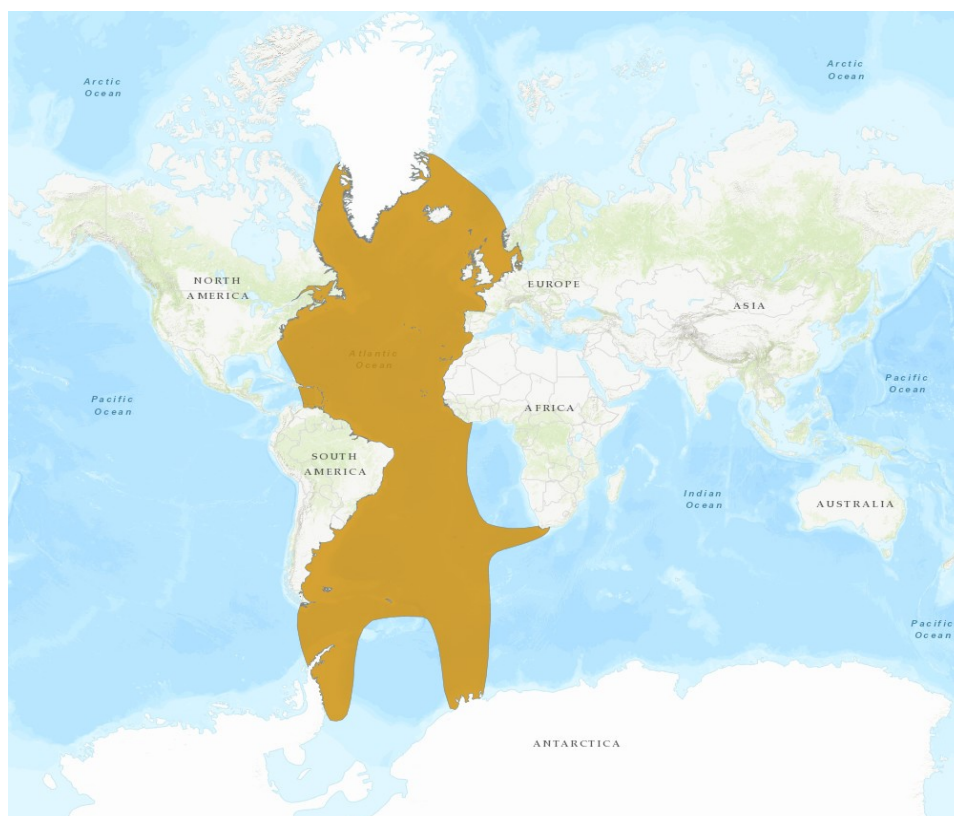
**Figura 3.** *Puffinus puffinus*.



Legenda: Ave da espécie *Puffinus puffinus*. (Foto: Matt Witt).

Essas aves alimentam-se de peixes e alguns crustáceos, são capturadas através de mergulho e perseguição. A reprodução dessa espécie inicia-se em março, na região Norte em suas colônias (del Hoyo et al., 1992). Algumas ameaças já foram mapeadas para essa espécie e dentre elas, podemos citar o derramamento de óleo e outros tipos de contaminação marinha, além de acidentes envolvendo a pesca acidental (Votier et al., 2005; Zydalis et al., 2009; Camphuysen et al., 2010).

**Figura 4** Distribuição geográfica da espécie *Puffinus puffinus*.



Legenda: Distribuição geográfica da espécie *Puffinus puffinus*, destacada pela cor marrom no mapa. Fonte: Adaptado de IUCN (<https://www.iucnredlist.org/species/22698226/132636603>).

Possuindo registro na IUCN, a espécie de *P. puffinus* é classificada atualmente como uma espécie pouco preocupante (BirdLife International, 2023). Alguns estudos já destacaram a utilização da pardela-sombria como um animal sentinela da saúde dos oceanos, visto que diversos contaminantes podem ser detectados em seus tecidos (Guilford et al., 2009). Sob essa perspectiva, estudos relacionados à expressão de genes nesses animais podem ser executados buscando aumentar o escopo de ferramentas disponíveis para a análises, aumentando as informações disponíveis sobre essas espécies para que mais estudos sejam realizados pensando na preservação desses indivíduos e também na preservação do ambiente marinho.

### 1.3 BIOTRANSFORMAÇÃO DE FASE I e II

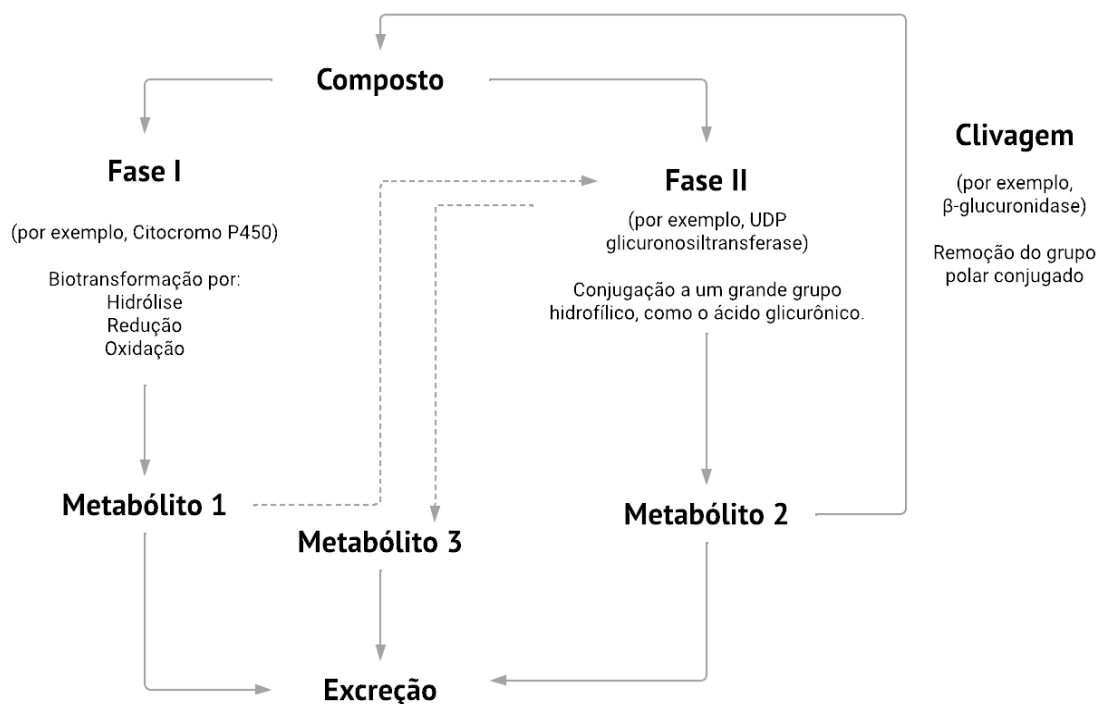
A resposta fisiológica mais comum encontrada nos estudos de expressão gênica com aves marinhas, é relacionada ao metabolismo de xenobióticos que tem como objetivo a eliminação de compostos químicos, de modo seguro, por meio da biotransformação

(Kreitsberg et al., 2023; Rourke; Sinal, 2014). Supõe-se que a evolução do sistema de desintoxicação dos organismos tenha surgido através da eliminação de compostos tóxicos de origem biológica, como toxinas bacterianas e vegetais, abrangendo posteriormente a metabolização de químicos, fármacos e xenobióticos (Katzung; Masters; Trevor, 2014; Rang; Dale, 2007).

O objetivo desse processo é alterar quimicamente as substâncias apolares, tornando-as mais hidrofílicas para a posterior excreção de modo seguro para o organismo, podendo ser através da urina ou da bile (Katzung; Masters; Trevor, 2014; Rourke; Sinal, 2014). De maneira geral, as substâncias iniciais são as mais tóxicas para os indivíduos, mas isso não é regra, já que muitos metabólitos podem ser ainda mais tóxicos e prejudiciais que suas moléculas iniciais (Katzung; Masters; Trevor, 2014).

Diversos tecidos e órgãos executam tarefas importantes no processo de biotransformação, como o pulmão, rim, olho e placenta, mas o fígado exerce o papel principal nesse processo já que a maior parte das enzimas estão presentes nele. Podemos classificar em duas etapas o processo de biotransformação de acordo com as funções que as enzimas associadas a esse processo realizam (Figura 5) (Rourke; Sinal, 2014).

**Figura 5.** Processo de Biotransformação simplificado.



Legenda: Fluxograma simplificado do processo de biotransformação de fase I e fase II. As linhas tracejadas indicam rotas alternativas de um metabólito. Adaptado de Rougeé; Richmond; Collier, 2014.

A fase I possui enzimas que atuam oxidando, hidrolisando e reduzindo as moléculas. Dentre as proteínas, podemos citar as enzimas do complexo enzimático do Citocromo P450 com sua vasta variedade de CYPs que participam da biotransformação de xenobióticos, químicos e drogas, levando a produção dos metabólitos primários. Sua nomenclatura é composta por um número indicando a família, seguido de uma letra que indica a subfamília e outro número, que representa o gene ou isoforma de modo individual. Deste modo, CYP1A5 refere-se à família CYP1, subfamília CYP1A e proteína CYP1A5 dentro da subfamília (Manikandan; Nagini, 2018). As enzimas CYP são compostas de 400-500 aminoácidos e possuem um único grupo heme no seu sítio ativo, e estão localizadas na porção microsomal. Com uma ampla especificidade, as enzimas CYP são capazes de realizar reações de oxidação, redução, hidroxilação e desalquilação, por exemplo. Além do papel de detoxificação que elas desempenham, essas enzimas também estão presentes no metabolismo celular e na homeostase, executando tarefas como a síntese e degradação de hormônios esteroides endógenos (Guengerich; Waterman, 2016; Manikandan; Nagini, 2017).

Além das enzimas do citocromo P450, as Monooxigenases Contendo Flavinas (FMO, do inglês Flavin Monooxygenases) são enzimas presentes no fígado, pulmão e rins e que atua oxidando heteroátomos nucleofílicos de nitrogênio, enxofre e fósforo na etapa I de biotransformação (Eswaramoorthy et al., 2006; Katzung; Masters; Trevor, 2014). Presentes também na porção microsomal, as FMOs são mais sensíveis ao calor e são inativadas na ausência de NADPH. Essas enzimas realizam reações de desintoxicação principalmente, mas há exceções à regra (Klaassen et al., 2000).

Na fase II de biotransformação, os fármacos previamente metabolizados na fase I ou que possuem grupos químicos adequados, passam pela etapa de conjugação. De modo geral, essas moléculas que são conjugadas são excretadas de maneira imediata sendo geralmente inativas. Para esse processo, algumas enzimas com atividade transferases atuam, sendo as mais conhecidas a 5'-difosfato (UDP)-glucuronil transferase (UGT), a Sulfotransferase (SULT) e a Glutathione-S-Transferase (GST). As reações que ocorrem nessa fase são mais rápidas do que as que ocorrem na etapa I de biotransformação, mas podem gerar espécies reativas de oxigênio, sendo responsáveis pela toxicidade de determinados metabólitos (Klaassen et al., 2000; Beiras, 2018; Katzung; Masters; Trevor, 2014).

Com a diversidade de estressores e de enzimas atuantes nesses processos, juntamente aos avanços da genômica e da maior disponibilidade e acesso aos dados das mais variadas espécies, podemos verificar com maior detalhe as particularidades de cada enzima no que se refere a sua especificidade por substrato e na metabolização dos compostos (Gotoh, 2012; Lewis; Watson; Lake, 1998). Nesse contexto, surge a necessidade de estudar cada vez mais espécies que possam fornecer informações a respeito das alterações nos ambientes em que vivem, aliando também os avanços tecnológicos disponíveis atualmente, como análises do transcriptoma.

#### 1.4 RNA-Seq APLICADO AO MONITORAMENTO AMBIENTAL

A transcriptômica é uma subárea das ciências ômicas que tem como intuito estudar as sequências de RNA de determinada amostra biológica, podendo ser RNA mensageiro (mRNA), RNA ribossomal (rRNA), RNA transportador (tRNA) e outros RNAs não codificantes. A técnica de RNA-Seq é uma maneira de quantificar os genes que estão sendo expressos em determinado momento do tecido analisado, através do sequenciamento. De maneira geral, o RNA total é extraído e uma parcela de mRNA é convertido em DNA complementar (cDNA) que após o sequenciamento e o processamento, será comparado com sequências genômicas disponíveis em bancos de dados. Nos casos em que as sequências genômicas da espécie estudada não estejam disponíveis, outra alternativa para o processamento e análise dos dados é através da montagem *de novo* (Cloonan et al., 2008; García-Ortega; Martínez, 2015). Através desses métodos podemos estabelecer o perfil transcriptômico de alguns organismos sentinelas, sem que haja a necessidade de traçar o perfil genômico das espécies para poder compreender alguns padrões e variações nos tecidos desses indivíduos quando expostos à contaminação ambiental (Watson et al., 2017).

Tecnologias como o RNA-Seq permitem que diversos insights possam ser obtidos através de uma análise exploratória de genes expressos no tecido estudado. De modo distinto à outras ferramentas aplicadas à expressão gênica, como PCR e Microarray, o RNA-Seq possibilita que seja executada a busca por processos biológicos e vias metabólicas distintas das que inicialmente são esperadas quando os animais estão expostos à contaminação (Kreitsberg et al., 2023). Existem pesquisas que já abordam problemáticas ambientais utilizando a análise do transcriptoma, como análises com compostos químicos encontrados no ambiente, testando a exposição em diferentes

concentrações em machos e fêmeas em peixes (Piazza et al., 2022). Estudos de animais de vida livre, como baleias, também são realizados através da coleta de sangue a partir de avaliações anuais desses animais (Morey et al., 2017). Quando consideramos as aves como organismos de investigação, podemos também observar estudos com contaminantes ambientais que utilizam a abordagem transcriptômica (Desforges et al., 2021). É cada vez mais interessante a execução de estudos utilizando abordagens ômicas em busca das mais diversas respostas fisiológicas frente à exposição.

Observando os custos da técnica e a necessidade de compreender efeitos nas aves marinhas expostas à contaminação, a análise de RNA-Seq vem sendo explorada cada vez mais, apresentando resultados importantes para o avanço das pesquisas em ecotoxicologia. Esses resultados podem ser utilizados tanto para conhecimento da espécie como também para aplicações no monitoramento ambiental, através da busca de genes indicativos de problemas de saúde presentes nesses animais.

## 1.5 BIOMARCADORES

Um biomarcador pode ser qualquer resposta fisiológica, molecular, bioquímica e comportamental que fornece informações sobre a exposição de organismos a agentes químicos ou estressores ambientais. Essas respostas podem ser quantificadas indicando as alterações biológicas dos indivíduos que estão expostos aos contaminantes. A utilização de biomarcadores permite o estudo de riscos associados à toxicidade de determinada substância, além de ser também um indicativo de qualidade ambiental (Kumari; Khare, 2018; Lionetto et al., 2004). A utilização dessa ferramenta possibilita que a quantificação dos efeitos tóxicos e de susceptibilidade gerados nos organismos vivos frente a exposição aos xenobióticos seja possível, estimando os efeitos de curto e longo prazo (Gil; Pla, 2001).

Certas características devem ser seguidas para que os biomarcadores sejam classificados como ideais. Um biomarcador eficaz deve ser de coleta e análise simples e confiável, refletindo apenas alterações subclínicas e reversíveis, que tenha relevância para intervenção ou outro esforço preventivo e deve ser aceitável do ponto de vista ético. Com base em sua aplicabilidade e funcionalidade, os biomarcadores podem ser categorizados em biomarcadores de exposição, biomarcadores de respostas e efeitos e de susceptibilidade (Gil; Pla, 2001; Grandjean et al., 1994).

Os biomarcadores de exposição possibilitam a medição da quantitativa de um determinado composto no organismo dos indivíduos podendo ser bioacumulativo e podem ser analisados a partir de fluidos corporais ou excretas. Ainda nos aspectos de classificação, podemos separar os biomarcadores de exposição em seletivos e não seletivos. Os testes não-seletivos são usados como indicadores de exposição a determinados grupos químicos sem muita especificidade, enquanto os seletivos, são mais específicos (Gil; Pla, 2001).

A classe de biomarcadores de resposta e efeito é capaz de indicar alterações bioquímicas no organismo a partir da exposição aos xenobióticos. Os biomarcadores ideais indicam alterações antes delas serem irreversíveis. No geral, eles não fornecem informações a respeito dos contaminantes e estressores e são caracterizados através da indução de mecanismo de defesa celular, bioquímica ou molecular (De Jesus; De Carvalho, 2008; Gil; Pla, 2001; Grandjean et al., 1994; Sogorb; Estévez; Vilanova, 2014).

Os biomarcadores de suscetibilidade podem fornecer informações individuais sobre os organismos. Essas informações podem ser de natureza genética, incluindo alterações em estruturas cromossômicas, polimorfismos genéticos ou variações na atividade enzimática. Um exemplo prático disso envolve as modificações em enzimas associadas ao processo de metabolização de xenobióticos, como as enzimas do citocromo P450 e as enzimas conjugantes. Ambos os grupos desempenham papéis no processo de biotransformação, com o primeiro atuando na fase I desse processo e o segundo na fase II. Relacionados a esses processos e a essas enzimas, podemos ainda classificar os biomarcadores como polimorfismos de sistemas ativadores, que medem a atividade enzimática das isoenzimas do citocromo P450, e polimorfismos de sistemas desintoxicantes, que mensuram a atividade de enzimas conjugantes. É relevante ressaltar que as modificações nas etapas de metabolização de compostos exercem influência na acumulação e produção de substâncias prejudiciais ao organismo (Gil; Pla, 2001; Grandjean et al., 1994; Sogorb; Estévez; Vilanova, 2014).

Quando se deseja realizar uma análise abrangente, a utilização de diferentes tipos de biomarcadores se mostra como uma abordagem mais indicada e informativa para a avaliação de riscos para os organismos e o ambiente (Sogorb; Estévez; Vilanova, 2014).

De maneira mais ampla, podemos considerar que os marcadores de contaminação ambiental desempenham um papel importante na proteção e conservação

dos ecossistemas marinhos e da fauna que habitam esses locais. Eles podem oferecer informações detalhadas sobre a saúde do ambiente e das espécies que ali vivem. Sua aplicabilidade não se limita somente ao conhecimento e compreensão da saúde local, mas pode também ser utilizado como base na tomada de decisões a respeito da manutenção e proteção ambiental.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Realizar a montagem do transcriptoma *de novo* do tecido hepático de indivíduos das espécies de aves marinhas *Larus dominicanus* e *Puffinus puffinus*, caracterizando o perfil transcriptômico e identificando os genes associados ao processo de biotransformação de fase I e II em ambas as espécies.

### **2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO**

- Montar e caracterizar o perfil transcriptômico hepático das espécies estudadas;
- Verificar a qualidade da montagem;
- Anotar funcionalmente os transcritos;
- Identificar os genes relacionados ao processo de biotransformação de fase I e fase II;

## **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

As análises executadas neste trabalho foram realizadas no Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica (LABCAI) do Departamento de Bioquímica (BQA) do Centro de Ciências Biológicas (CCB) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). A estrutura do laboratório conta também com servidores alocados na Superintendência de Governança Eletrônica e Tecnologia da Informação e Comunicação (SeTIC) da UFSC para desenvolvimento de plataformas computacionais e demais análises de alta performance.



### 3.1 AQUISIÇÃO DO MATERIAL BIOLÓGICO E ANÁLISE DESCRITIVA DOS INDIVÍDUOS

Os indivíduos estudados foram obtidos por meio do Projeto de Monitoramento de Praias na Bacia de Santos (PMP-BS). Esse projeto é conduzido pela PETROBRAS para atender condicionantes do licenciamento ambiental federal, conduzido pelo IBAMA, para as atividades de extração e produção de petróleo e gás natural na Bacia de Santos. O Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica (LABCAI) fornece serviços de padronização de técnicas e análise de biomarcadores de contaminação ambiental em espécies de tetrápodes marinhos.

Os indivíduos encontrados são registrados no Sistema de Informação da Biota Aquática (SIMBA), um banco de dados públicos que fornece informações sobre o estado de saúde, estágio de vida, condição do animal junto com imagens e informações abióticas dos locais. Com o acesso ao banco de dados, foi possível acessar informações relacionadas aos indivíduos investigados no presente trabalho.

Os animais que foram encontrados mortos e/ou morreram na base de reabilitação, passaram por uma etapa de necropsia, nas quais pequenas amostras do fígado foram enviadas para o laboratório para realização de análises bioquímicas vigentes no projeto. Dentre os serviços prestados, a análise do transcriptoma está incluso para algumas espécies. Das espécies trabalhadas, um indivíduo de *Larus dominicanus* e um de *Puffinus puffinus* foram utilizados para análise do transcriptoma do tecido hepático. Os dados obtidos foram fornecidos para o desenvolvimento e execução desse projeto.

### 3.2 OBTENÇÃO DOS DADOS E ANÁLISE DA QUALIDADE

Foram extraídos o RNA total de tecido hepático de um indivíduo de *Larus dominicanus* e um indivíduo de *Puffinus puffinus*. Nesse processo foi utilizado o kit comercial de extração *RNeasy Mini Kit* (Qiagen®). Os animais extraídos estavam em código 2 de decomposição. Visando a melhor qualidade do material extraído, uma limpeza de substâncias interferentes como sais, carboidratos e proteínas foi realizada. Essa limpeza foi executada utilizando o kit comercial *RNeasy MinElute Cleanup* (Qiagen®). Toda a extração foi realizada utilizando materiais apropriados para os protocolos de biologia molecular (livres de RNases, DNases e pirógenos).

Para verificar a qualidade e a quantidade do material extraído, o material passou pela espectrofotometria no equipamento NanoDrop® 1000 (Thermo Fisher Scientific). Para estimar a concentração do RNA, a absorbância em 260 nm foi utilizada, seguida da utilização da razão 260/280 nm para estimar a pureza em relação à presença de proteínas considerando faixas aceitáveis entre 1,8 e 2,0 e a razão 260/30 utilizada para avaliar a pureza relativa a outras substâncias interferentes, com valores aceitáveis acima de 1,7 (Wieczoreck; Delauriere; Schagat, 2012).

A qualidade também foi analisada utilizando o fluorímetro Qubit 4.0 (Thermo Fisher Scientific). Essa avaliação utilizou o kit comercial *Qubit™ RNA IQ Assay*, baseado em corantes, um que interage com moléculas de RNA grandes com estruturas definidas (mRNA, tRNA, rRNA) e o outro com moléculas pequenas e degradadas. O grupo de pesquisa estabeleceu um valor de qualidade > 7,5 que satisfazem melhor os interesses do grupo. Somente as amostras consideradas adequadas foram enviadas para o sequenciamento, que foi realizado através da plataforma Illumina HiSeq 2500 (Illumina Inc.), baseado na metodologia *pair-end* que resultou na obtenção de sequências contendo até 100pb.

A avaliação da qualidade e limpeza dos dados brutos das espécies *L. dominicanus* e *P. puffinus* foi realizada previamente pelo laboratório (Amorim, 2021). A qualidade inicial dos dados brutos foi verificada através do software FastQC v.0.11.8, (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Em seguida, o programa Trimmomatic (Bolger et al., 2014) foi utilizado para remoção de sequências adaptadoras, bases de baixa qualidade (comprimento < 50pb e nota phred < 30) e RNAs não codificantes. Os dados foram submetidos novamente ao programa FastQC para verificação da qualidade com o objetivo de comparar os dados brutos e os dados limpos.

### 3.3 MONTAGEM *DE NOVO* DOS TRANSCRIPTOMAS

O programa Trinity v.2.13.2 (Grabherr et al., 2013) foi utilizado para a montagem dos transcritos, utilizando os *reads* previamente limpos. Esse programa divide os dados em grafos de Bruijn e os processa separadamente, permitindo a extração de isoformas oriundas de *splicing* bem como a separação de transcrições derivadas de genes parálogos. Entre os montadores disponíveis, o Trinity foi selecionado pois é amplamente utilizado em decorrência da sua robustez e facilidade, possuindo um extenso conjunto de

ferramentas associadas e um alto desempenho (Raghavan et al., 2022). Outro aspecto importante do montador Trinity é que ele possui uma etapa de normalização dos dados que antecede o processamento e montagem do transcriptoma, não sendo necessário a utilização de outro programa para essa etapa (Haas et al., 2013). A normalização permite que grandes conjuntos de dados sejam processados utilizando menos infra-estrutura computacional.

Para a montagem dos transcritos, foi utilizado o valor de k-mer de 25 para construção dos grafos e o tamanho mínimo das sequências montadas foi de 200pb, sendo estes valores padrões adotados pelo programa.

### 3.4 ANÁLISE DE QUALIDADE DA MONTAGEM

As análises de qualidade do transcriptoma foram executadas de acordo com as etapas e ferramentas sugeridas pelo programa Trinity. A primeira métrica aplicada foi a análise N50, seguida da análise de ExN50 (Haas et al., 2013). Após a identificação do valor de ExN50, os dados provenientes da montagem foram limpos para dar sequência às análises.

O mapeamento foi realizado através do programa Bowtie2 v.2.5.0 (Langmead; Salzberg, 2012) e por último, a montagem foi submetida à análise de integridade através do BUSCO v.5.4.3 utilizando o banco de dados de metazoários (metazoa\_odb10) e de aves (aves\_odb10) (Seppey et al., 2019; Simão et al., 2015; Waterhouse et al., 2018).

### 3.5 IDENTIFICAÇÃO DE ORFs E ANOTAÇÃO FUNCIONAL

Na etapa de anotação funcional as regiões de quadro de leitura aberta (ORF) e regiões codificantes (CDS) foram obtidas através do programa TransDecoder (<https://github.com/TransDecoder/TransDecoder>).

As sequências proteicas do banco de dados Uniprot/SwissProt (Bateman et al., 2021) foram extraídas e utilizadas para anotar as sequências obtidas através do passo anterior. Esse banco de dados foi selecionado uma vez que apresenta atualmente o padrão ouro de anotação por homologia (Raghavan et al., 2022). A anotação, realizada a partir do programa BLAST+ v2.13.0 (Camacho et al., 2009), utilizou uma busca aceitando valor mínimo de e-value de  $1e-20$ , e com o máximo de um *hit* por sequência analisada.

### 3.6 ONTOLOGIA GENÉTICA E VIAS METABÓLICAS

Para o enriquecimento dos genes expressos, foi realizada uma análise dos dados a partir da biblioteca clusterProfiler v4.8.2 (Wu et al., 2021) que permite o enriquecimento por *Gene Ontology* (GO) (Consortium, 2000) através de termos da ontologia como funções moleculares e processos biológicos, assim como o enriquecimento de vias metabólicas através da Enciclopédia de Genes e Genomas de Quioto (KEGG, do inglês *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) (Kanehisa; Goto, 2000). Para fins comparativos o pacote org.Gg.eg.db v3.17.0 (Carlson, 2019) foi utilizado uma vez que se trata de um pacote referente a um banco de dados disponível no RStudio, da espécie *Gallus gallus*, o organismo modelo mais próximo dos animais investigados neste trabalho.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 ANÁLISE DESCRITIVA DOS INDIVÍDUOS

#### 4.1.1 *Larus dominicanus*

O indivíduo utilizado nas análises de RNA-seq da espécie de *L. dominicanus* foi encontrado na Barra do Saí em Guaratuba no estado do Paraná-BR no dia 07 de julho de 2017 (Figura 6). O espécime de gaivota estava vivo, com boa integridade física e condição corporal ruim. Não apresentava fraturas nem interação antrópica. Não apresentava presença de óleo nas penas, mas possuía patologia. A patologia estava ligada a uma infecção fúngica, possivelmente aspergilose, que afetava principalmente o sistema respiratório. Além disso, havia ocorrência de amiloidose em órgãos como, fígado, rins e coração, sendo uma condição marcada pelo acúmulo de agregados proteicos fibrilares em diferentes tecidos (Gavriatopoulou et al., 2018).

**Figura 6.** Espécime resgatado de *Larus dominicanus*.



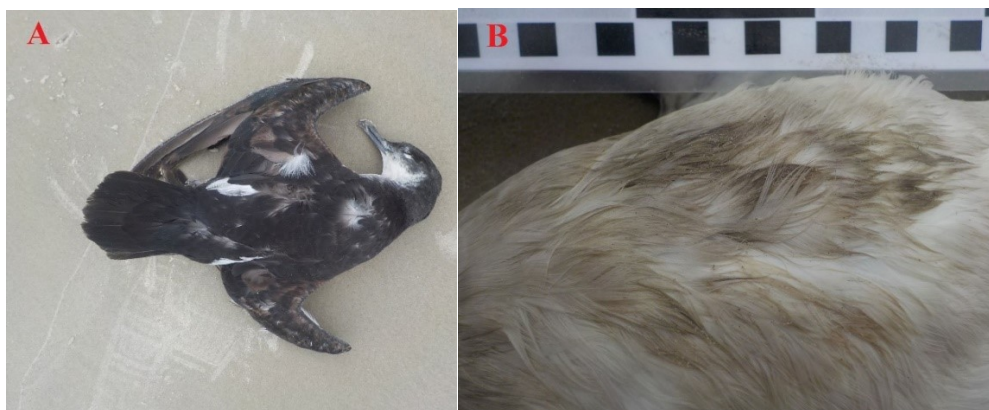
Legenda: Fêmea adulta de *L. dominicanus* encontrada no estado do Paraná – BR (Foto: Giovana Capello).

A causa da morte deste espécime foi insuficiência respiratória e possivelmente se associava aos achados relacionados à amiloidose, devido ao processo infeccioso que o animal enfrentava. Por último, os dados de necropsia confirmaram que se tratava de uma fêmea adulta.

#### 4.1.2 *Puffinus puffinus*

O indivíduo da espécie *P. puffinus* foi encontrado também no Estado do Paraná-BR, na praia de Pontal do Sul/Flamingo em Matinhos, Pontal do Paraná no dia 18 de setembro de 2017. Foi encontrado morto, mas com o corpo ainda fresco e temperatura morna (Figura 7-A). Era um indivíduo fêmea juvenil com integridade física boa, mas a condição corpórea estava ruim. Até 25% de seu corpo apresentava mancha de óleo (Figura 7-B), considerada forte interação antrópica.

**Figura 7.** Espécime encalhado de *Puffinus puffinus*.



Legenda: Fêmea juvenil de *P. puffinus* encalhada na praia, no estado do Paraná – BR. (A) Foto do animal encalhado no momento em que foi encontrado, em B, vista ventral das penas cobertas com óleo. (Foto: Joice Elisa Klug).

#### 4.2 MONTAGEM *DE NOVO* E ANÁLISE DE QUALIDADE

O sequenciamento dos dados das espécies *L. dominicanus* e *P. puffinus* geraram 55.994.793pb e 53.680.532pb respectivamente. Com o pré-processamento executado anteriormente pelo grupo (Amorim, 2021), podemos observar a remoção de pares de base com baixa qualidade para ambas as espécies e os valores na Tabela 1. A limpeza foi executada considerando somente os pares de base com nota phred >30 mantendo os dados que sejam mais confiáveis para a montagem do transcriptoma (Apêndice A).

**Tabela 1.** Quantidade de *reads* estimados através do FastQC.

<i>Espécies</i>	<i>Reads brutos</i>	<i>Reads limpos</i>	<i>% reads limpos</i>
<i>Larus dominicanus</i>	55.994.793	38.840.191	69.5%
<i>Puffinus puffinus</i>	53.680.532	38.112.209	71%

Fonte: Adaptado de Amorim, 2021.

O sequenciamento não é uma etapa isenta de erros, ainda que suas taxas sejam baixas é interessante executar testes para verificar a qualidade do sequenciamento realizado (Stoler; Nekrutenko, 2021). Neste cenário, para o processamento dos dados brutos é recomendado que anteriormente à etapa de montagem do transcriptoma, o controle de qualidade seja feito de modo a verificar a necessidade de realizar a limpeza dos dados para posterior processamento (Raghavan et al., 2022). Na etapa de limpeza as sequências de adaptadores, leituras curtas e incorretas podem ser removidas e essa

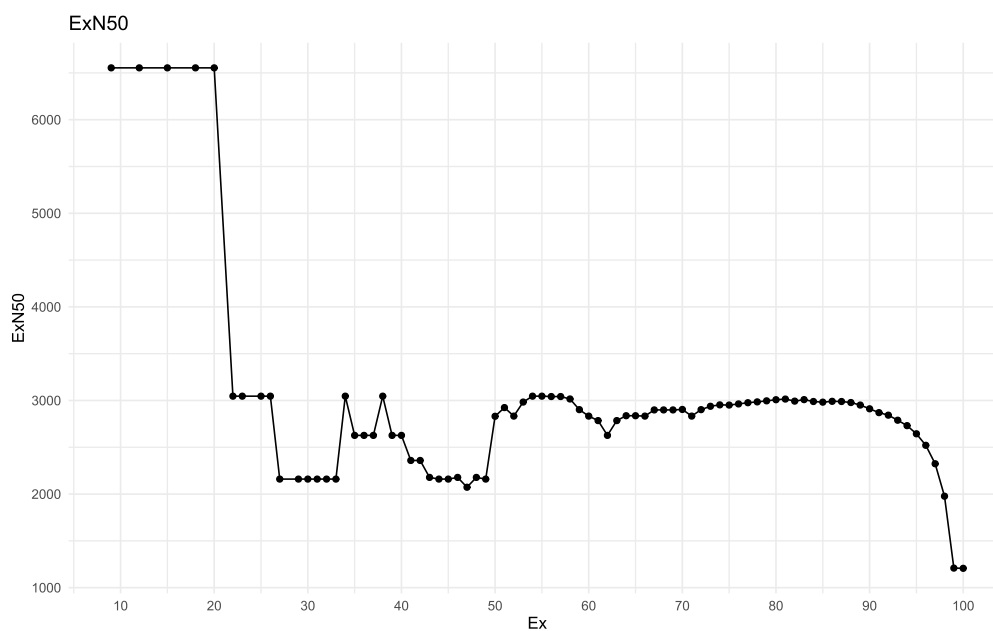
remoção baseia-se em alguns parâmetros, como a nota *phred* por base, presença de bases indefinidas, chamadas também como base “N”, sequências super-representadas. Todos esses indicadores devem servir como informações importantes para a tomada de decisões quanto à limpeza e utilização dos dados para as análises subsequentes (Raghavan et al., 2022).

A montagem dos transcriptomas foi executada através do Trinity a partir do conjunto de dados previamente limpos. Os valores de k-mers e de normalização dos dados foram utilizados de acordo com os parâmetros padrões do montador. Esse programa executa a montagem em três módulos, chamados *Inchworm*, *Chrysalis*, *Butterfly*. O primeiro realiza a função de montar os *reads* em sequências únicas transcritas, utilizando uma abordagem baseada em k-mers para uma montagem mais eficiente. O segundo módulo, *Chrysalis*, agrupa os *contigs* montados em cluster e constrói um grafo de Bruijn para cada cluster relacionado e o último, o módulo *Butterfly* analisa os caminhos percorridos nesses grafos gerados, relatando as transcrições completas, resolve as isoformas alternativas e transcritos originários de genes parálogos (Haas et al., 2013). Após a montagem das leituras, o arquivo final é gerado no formato fasta contendo as sequências de transcritos e as isoformas geradas nessa etapa.

A análise de ExN50, derivada da métrica N50 (abordada adiante), apresenta uma abordagem refinada na análise da expressão genética. Enquanto o N50 determina o tamanho em que 50% dos dados são representados, o ExN50 restringe essa análise aos genes mais expressos, removendo os de baixa expressão, abrangendo assim x% do total dos dados de normalizados (Raghavan et al., 2022). Essa metodologia, entrelaçada com a expressão total de um gene, incorpora todas as isoformas transcritas, ponderando não apenas seus tamanhos físicos, mas também sua contribuição relativa para a expressão total no conjunto de dados. Ao calcular o valor do ExN50, os tamanhos das isoformas são avaliados juntamente com sua expressão relativa, fornecendo uma visão mais precisa da atividade gênica em um transcriptoma (Haas et al., 2013).

O montador Trinity permite que essa métrica seja analisada, através de seu pipeline de controle de qualidade após a montagem. A partir disso, utilizamos essa funcionalidade e encontramos o ponto mais adequado para selecionar o conjunto de dados. Para os dados de *L. dominicanus*, selecionamos o valor de Ex=97, logo, inferimos o E97N50 como métrica mais adequada de qualidade para esse conjunto de dados (Figura 8).

**Figura 8.** ExN50 de *Larus dominicanus*.

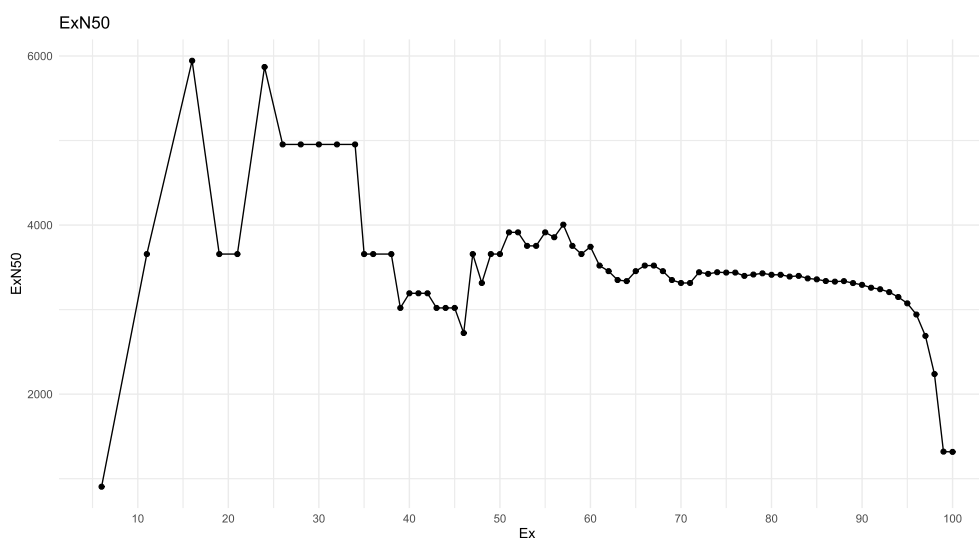


Legenda: Gráfico de análise de ExN50 para o conjunto de dados do *L. dominicanus*. No eixo X temos o valor de Ex que se refere à % do conjunto de dados. No eixo y temos o valor médio de tamanho dessas sequências (ExN50). Para esses dados, o valor de E97 foi selecionado para posteriores análises de qualidade e execução de novos testes. Fonte: Elaboração da autora (2023).

Seguido dos testes realizados com a outra espécie, executamos também a métrica do ExN50 para os dados do *P. puffinus*, onde o valor de Ex=95 foi selecionado, logo, o E95N50 foi aplicado nesse conjunto de dados (Figura 9).



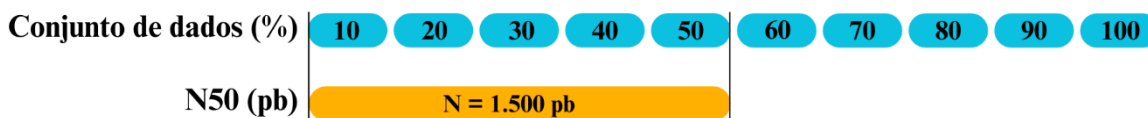
**Figura 9.** ExN50 - *Puffinus puffinus*.



Legenda: Gráfico de análise de ExN50 para o conjunto de dados do *P. puffinus*. No eixo X temos o valor de Ex que se refere à % do conjunto de dados. No eixo y temos o valor médio de tamanho dessas sequências (ExN50). Para esses dados, o valor de E95 foi selecionado para posteriores análises de qualidade e execução de novos testes. Fonte: Elaboração da autora (2023).

O valor de N50, uma métrica aplicada para verificar o tamanho das sequências no conjunto de dados, indica o comprimento dos fragmentos montados onde metade dos nucleotídeos do conjunto de dados possui no mínimo esse tamanho (Figura 10). Ainda que seja uma métrica interessante para avaliar o tamanho dos *contigs* gerados, se tratando de dados de transcriptoma, não é a métrica mais adequada para aplicarmos. O valor de N50 é indicado quando o objetivo do estudo é montar sequências grandes que constituem um único produto, no caso da montagem de um genoma, por exemplo. Quando analisamos os transcritos de determinado tecido, o objetivo é obter sequências completas, independentemente do quão curtas ou longas elas sejam, já que isso varia de acordo com cada gene transcrito. Apesar disso, podemos aplicar essa métrica para verificar o quão fragmentado ou não, temos nosso conjunto de dados (Haas et al., 2013; Raghavan et al., 2022).

**Figura 10.** Esquema representativo da métrica do N50.



Legenda: Figura ilustrando o valor de N50, onde o N significa a quantidade mínima de nucleotídeos por sequência montada, neste caso o valor mínimo de 50% do conjunto de dados é de 1.500pb. Fonte: Elaboração da autora (2024).

Executamos essa análise com o conjunto de dados das sequências montadas e com o conjunto de dados da montagem após a filtragem baseada no valor de ExN50 para os dois indivíduos de cada espécie (Tabela 2). Com os dados gerados, podemos verificar um comportamento semelhante entre os indivíduos em cada etapa. A média de transcritos ficou entre 444pb e 445pb no conjunto de dados da montagem inicial e com o valor de N50 de 1.835pb e 2.061pb para *L. dominicanus* e *P. puffinus* respectivamente. Após a filtragem, as métricas alteraram, na qual a média de tamanho dos transcritos aumentou consideravelmente, apresentando valores de 1.585pb para *L. dominicanus* e 1.977pb para *P. puffinus*. Outro aspecto interessante de citar é que com esses valores, verificamos uma redução na quantidade de transcritos totais, mas um aumento no tamanho médio dos *contigs* e no valor de N50. Essa limpeza é interessante pois leva em conta a pluralidade de fatores, como transcritos curtos e pouco expressos e de isoformas longas de transcritos mais expressos. Essa limpeza é importante pois remove também artefatos de montagem, uma vez que o método de grafos de Bruijn não foi feito originalmente com o intuito de montar genomas e transcriptomas, gerando esses artefatos em montagens *de novo* (Raghavan et al., 2022).

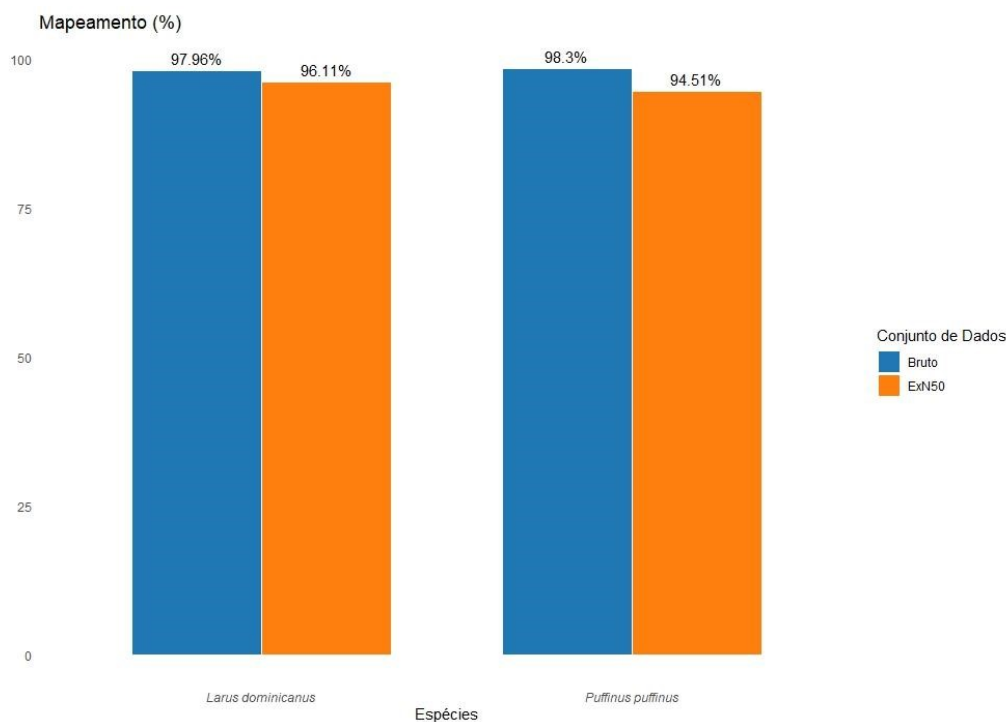
**Tabela 2.** Métricas dos *contigs* montados para as duas espécies de aves.

	<i>L. dominicanus</i>	<i>P. puffinus</i>
<b>Métricas pós-montagem</b>		
Transcritos totais	102.552	88.159
Média de tamanho dos transcritos	444pb	445pb
N50	1.835pb	2.061pb
<b>Métricas após a filtragem baseada em ExN50</b>		
Transcritos totais	38.099	22.961
Média de tamanho dos transcritos	1.585pb	1.977pb
N50	2.471pb	3.083pb

Legenda: Tabela indicando valores dos *contigs* montados para ambas as espécies. A primeira coluna, indica a métrica avaliada, na segunda e terceira coluna, os valores das métricas para o *L. dominicanus* e para o *P. puffinus*. A seção “métricas pós-montagem” indica os valores baseados no conjunto de dados logo após a montagem das sequências, enquanto a seção “métricas após a filtragem baseada em ExN50” é relacionada aos valores encontrados após a limpeza dos dados baseados no valor de ExN50 para cada espécie.

Idealmente, o mapeamento dos *reads* utilizados em uma montagem de genoma ou transcriptoma é realizado utilizando um genoma de referência. Não é recomendada a utilização de espécies próximas, uma vez que os resultados obtidos podem trazer informações que não representem a realidade, como a perda de transcritos e/ou identificação errônea de sequências. Nesse caso, com a ausência de dados genômicos das nossas espécies, o mapeamento foi executado com as leituras limpas utilizadas como objeto de estudo (Conesa et al., 2016).

Para o mapeamento, foram considerados os dois conjuntos de dados, o da montagem bruta e o da montagem filtrada. No conjunto de dados brutos, para o indivíduo de *L. dominicanus* 97,96% foram mapeados e para *P. puffinus*, 98,30% dos *reads* foram mapeados. Já quando consideramos os dados filtrados após a montagem, cerca de 96,11% dos *reads* de *L. dominicanus* e 94,51% dos *reads* de *P. puffinus* foram mapeados (Figura 11).

**Figura 11.** Mapeamento de *reads*.

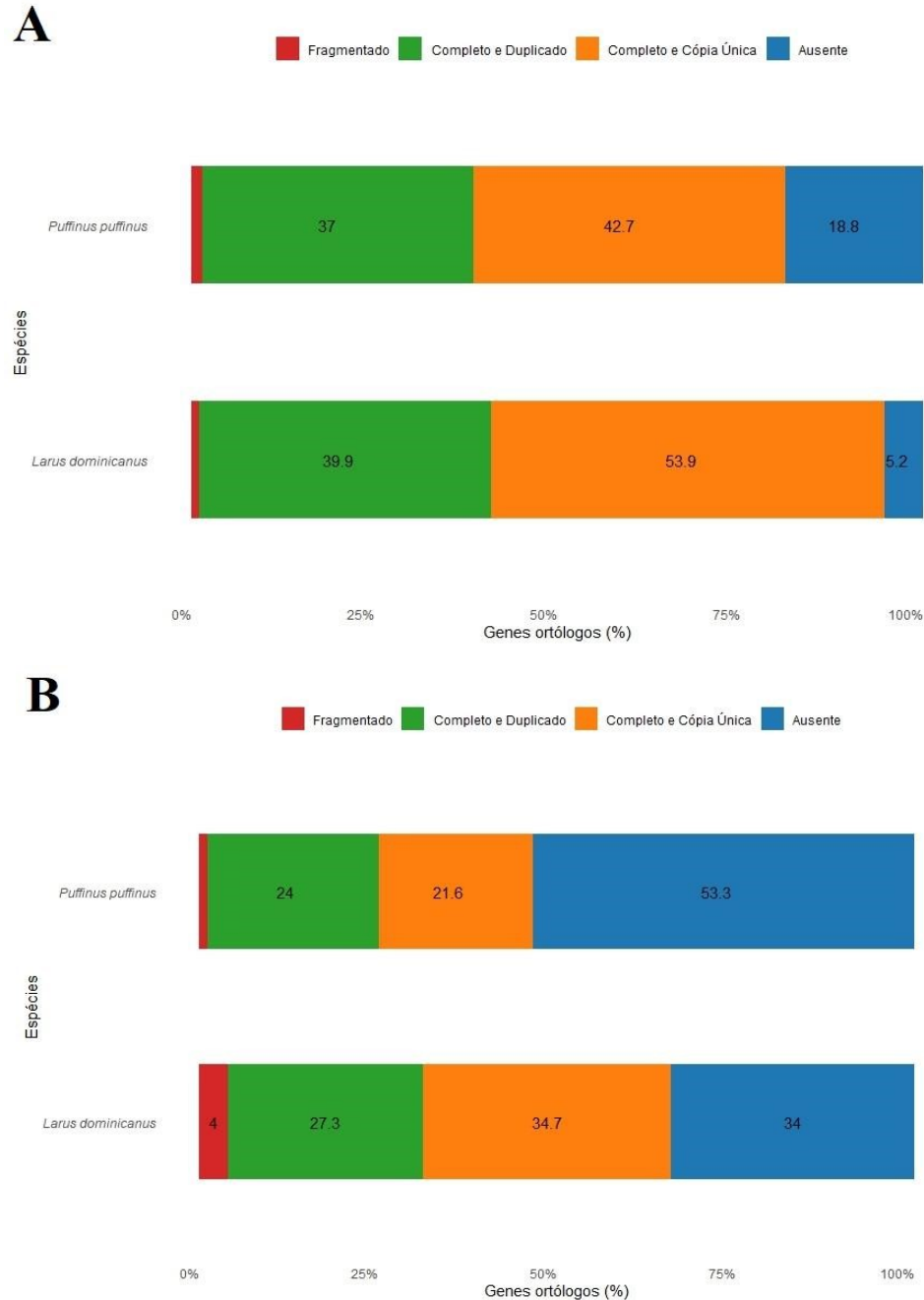
Legenda: Gráfico indicando a porcentagem de *reads* mapeados de cada conjunto de dados para cada uma das espécies estudadas. O conjunto de dados bruto, em azul, se refere às sequências logo após a montagem, sem nenhum filtro aplicado. O conjunto de dados em laranja, ExN50, trata-se do conjunto de sequências selecionadas baseada nas análises do valor de ExN50. Fonte: Elaboração da autora (2023).

Observando esses valores na Figura 11 podemos afirmar que apesar da diminuição de porcentagem dos *reads* mapeados, eles ainda são valores próximos, sustentando mais uma vez a integridade e qualidade dos dados filtrados que serão trabalhados. Outro ponto relevante é que no mapeamento, a diferença de base errônea não é tão problemática porque o programa aceita algumas bases distintas para mapear, o que não ocorre nos grafos de Bruijn, onde uma base errônea é capaz de criar novas bolhas e novos transcritos. Dito isso, os valores adquiridos para os mapeamentos são considerados ótimos, uma vez que o valor mínimo aceitável é de cerca de 80%. Esse valor informa a porcentagem de leituras que foram alinhadas ao transcriptoma montado (Raghavan et al., 2022).

O BUSCO é uma ferramenta aplicada para compreender a composição dos genes encontrados na montagem. Para compreendermos a composição dos nossos conjuntos de dados, executamos uma análise através desse programa. Foram executadas análises

abrangentes com o banco de dados de metazoários e análises mais específicas com um banco de dados de aves (Figura 12).

**Figura 12.** Genes ortólogos identificados via BUSCO.



Legenda: Gráfico apresentando a porcentagem de genes ortólogos encontrados nos transcriptomas de *L. dominicanus* e *P. puffinus*. Em (A) temos os valores obtidos a partir de consultas com o banco de dados de metazoários (metazoa\_odb10). Em B temos os valores obtidos a partir de consultas com banco de dados de aves (aves\_odb10). Para ambos os gráficos a parcela em vermelho do gráfico indica a porcentagem de genes fragmentados, em verde temos a quantidade de genes completos e duplicados, em laranja são os

genes completos de cópia única e em azul temos a porcentagem de genes ausentes, ou seja, que não tem correspondência no banco de dados utilizado. Fonte: Elaboração da autora (2023).

Realizando consultas com o banco de dados de metazoários (Figura 12-A), obtivemos um total de 79,7% de genes completos de *P. puffinus*, onde 42,7% eram de cópia única e 37% duplicados, somente 1,5% eram genes fragmentados e 18,8% não tinham correspondências no banco de dados. Para o *L. dominicanus*, valores próximos foram obtidos totalizando 93,8% de genes completos onde, 39,9% eram duplicados, 53,9% eram de cópia única e 1% genes fragmentados, enquanto 5,2% se tratavam de genes ausentes no banco de dados.

Na Figura 12-B podemos verificar os resultados do BUSCO com dados de genes ortólogos de aves para o indivíduos de *P. puffinus* que apresentou cerca de 1,1% de genes fragmentados, 21,6% de genes com cópias únicas, 24% de genes completos e duplicados e cerca de 53,3% de genes não foram encontrados no banco de dados de aves. Em relação aos genes de *L. dominicanus*, 4% deles estavam fragmentados, 34,7% eram genes completos e de cópia única, 27,3% eram genes completos e duplicados e cerca de 34% não tinham correspondência no banco de dados de aves.

O BUSCO possui um extenso conjunto de dados genômicos curados do OrthoDB (que por sua vez possui relações de ortologia entre genes) que ao compararmos com as montagens realizadas, nos indica porcentagem de genes completos, duplicados, fragmentados e ausentes (Seppey et al., 2019; Zdobnov et al. 2020; Raghavan et al., 2022). Uma montagem que possui uma qualidade boa, deve apresentar um valor acima de 80% de completude, havendo poucos genes duplicados e fragmentados. De modo geral, é esperado que os valores de correspondências duplicadas sejam altos, o que é comum na montagem do transcriptoma (Raghavan et al., 2022).

Comparando nossos valores obtidos de completude em relação aos dados consultados do banco de metazoários, chegamos a valores bem próximos do limite mínimo estabelecido de qualidade para o indivíduo de *P. puffinus*, com um total de 79,7%. Já para *L. dominicanus* um total de 93,8% foram adquiridos. Esses valores consideram os genes ortólogos completos de cópia única e completos duplicados. Quando visto de modo mais detalhado, podemos observar uma quantidade muito alta de genes duplicados, o que pode estar relacionada com a produção de artefatos de montagem do transcriptoma, uma vez que essa técnica gera diversas isoformas distintas para um mesmo gene (Raghavan et

al., 2022). De modo mais detalhado, cerca de 812 espécies foram utilizadas nessa consulta, mas ainda assim, limitações de dados biológicos neste estudo podem ser consideradas (Kuznetsov et al., 2022).

O cenário muda quando buscamos genes ortólogos mais específicos para o grupo de aves. Para o indivíduo de *P. puffinus*, somente 45,6% de genes completos foram obtidos e para o indivíduo de *L. dominicanus*, somente 62% de completos foram adquiridos. Ao realizar buscas na literatura com outros trabalhos utilizando transcriptoma de aves, podemos encontrar valores como 81% a 84% com dados da codorna comum (*Coturnix coturnix*) (Marasco et al., 2020), para a andorinha das árvores (*Tachycineta bicolor*) uma porcentagem de 91,7 já foi relatada (Bentz et al., 2019).

Podemos especular algumas razões pela qual os valores deram abaixo da porcentagem mínima adequada, uma delas pode estar ligada à especificidade do grupo, sendo mais restrito em relação às espécies presentes. Algumas das ordens de aves consultadas eram Passeriformes, Pelecaniformes, Gruiformes, Falconiformes e da superordem Galloanserae, totalizando cerca de 93 espécies (Kuznetsov et al., 2022). É relevante ressaltar que nenhuma dessas ordens abrangem as espécies estudadas neste trabalho.

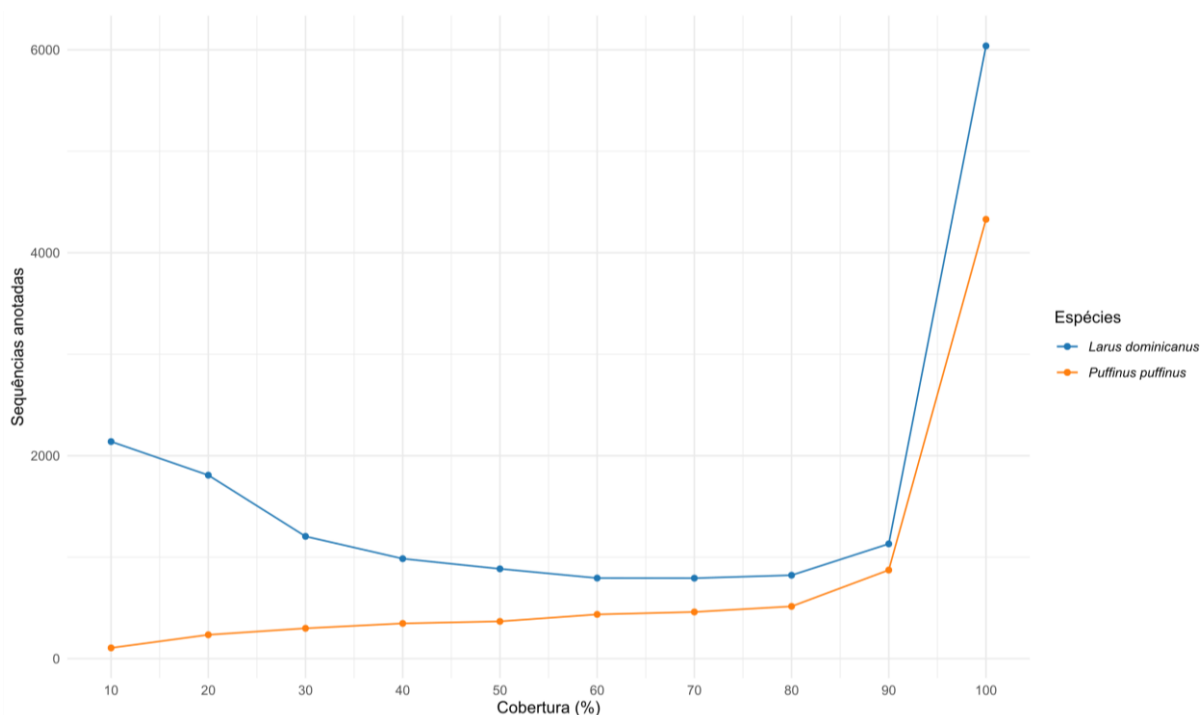
Além da disponibilidade de dados para consulta, podemos refletir sobre as limitações do método de sequenciamento, da quantidade de indivíduos utilizados, do momento em que o órgão estudado foi adquirido e principalmente porque o BUSCO utiliza genomas, enquanto o trabalho realizado utilizou o transcriptoma de um tecido apenas (Seppey et al., 2019). É relevante citar que a extração de RNA utiliza sequências disponíveis em um único momento da vida do indivíduo e/ou do período de coleta e extração do órgão, limitando a variedade de transcritos existentes no tecido (Gagliardi; Dziembowski, 2018). Ao trabalharmos com indivíduos no estágio *post mortem*, devemos relevar que parte dos RNAs produzidos podem estar fragmentados, além dos processos biológicos desencadeados nessa circunstância, influenciando a variedade de sequências de RNA mensageiro disponíveis no tecido (Righetti et al., 2022). Devemos também considerar a utilização de um único indivíduo por espécie, o que impede uma maior variedade de informações em relação a outros organismos. Deste modo, sugere-se que a baixa porcentagem de genes ortólogos encontrados nas montagens, seja consequência de uma série de limitações tanto da técnica como também da disponibilidade de informações disponíveis para a execução do estudo. Considerando as outras métricas apresentadas

anteriormente, ambas as montagens possuíam uma qualidade confiável, o que nos permitiu prosseguir nas próximas análises.

### 4.3 ANOTAÇÃO FUNCIONAL

Estabelecida a qualidade do conjunto de dados gerados, as sequências foram anotadas com dados presentes no banco de dados do UniProt/SwissProt por homologia de sequência. Da totalidade dessas sequências, selecionamos sequências com alta cobertura. Encontramos cerca de 7.169 genes anotados com cobertura acima de 90% para o indivíduo da espécie *L. dominicanus* e cerca de 5.439 genes anotados com a mesma cobertura para a espécie de *P. puffinus* (Figura 13).

**Figura 13.** Cobertura dos transcritos anotados.



Legenda: O gráfico indica a quantidade de genes anotados e a cobertura da anotação para as espécies estudadas. Fonte: Elaboração da autora (2023).

Quando executamos a anotação funcional das sequências, visamos inferir a funcionalidade biológica das mesmas, atribuindo informações que podem indicar determinados processos e eventos celulares que podem estar ocorrendo no tecido estudado (Raghavan et al., 2022). Para selecionar as melhores sequências encontradas, consideramos o valor de  $1e-20$  que, por sua vez, é um indicador da probabilidade de que a similaridade da sequência seja ao acaso (Pearson et al., 2013; Raghavan et al., 2022). Diante desse cenário, utilizamos somente as sequências que possuíam um alto índice de



cobertura (acima de 90%), possibilitando que essas sequências sejam futuramente validadas.

Dentre a totalidade de correspondências encontradas, foram selecionadas somente as que apresentavam potencial associação com o processo de biotransformação de fase I e de fase II (Tabela 3).

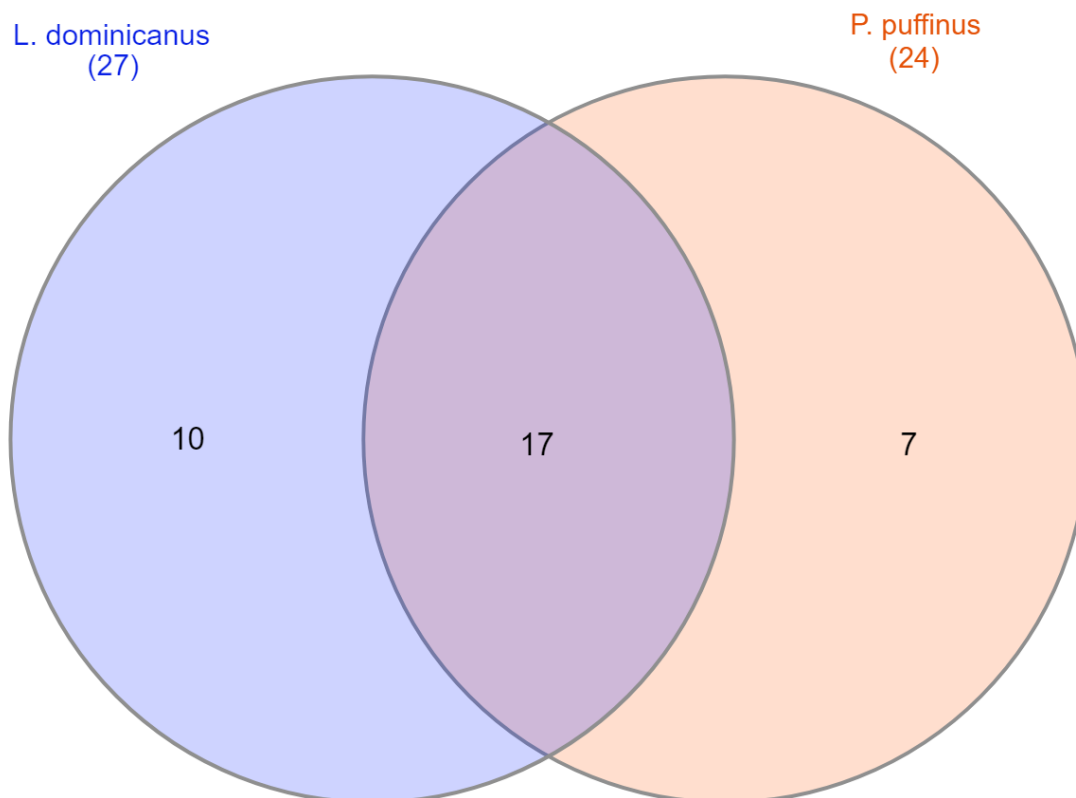
**Tabela 3.** Sequências com correspondência no banco de dados para os indivíduos estudados.

<b>Transcritos</b>	<i>L. dominicanus</i>	<i>P. puffinus</i>
<i>Fase I</i>		
<i>CYP</i>	13	9
<i>FMO</i>	2	3
<i>Fase II</i>		
<i>UGT</i>	0	3
<i>SULT</i>	5	3
<i>GST</i>	6	5
<i>Receptor</i>		
<i>AHR</i>	1	1

Legenda: Transcritos com potencial associação ao processo de biotransformação de fase I e fase II identificados no transcriptoma montado dos dois indivíduos estudados. As linhas identificam o transcrito e a quantidade de transcritos identificados, de acordo com cada espécie. A espécie está identificada nas duas últimas colunas da tabela. Fonte: Elaboração da autora (2024).

Houve uma variedade de genes expressos nos fígados dos animais estudados dos quais filtramos os que poderiam associar-se ao metabolismo de xenobióticos, totalizando 27 para *L. dominicanus* e 24 para *P. puffinus*. Alguns desses genes estão presentes em ambos os animais (Figura 14).

**Figura 14.** Quantidade de transcritos expressos nos dois organismos.



Legenda: Gráfico de Venn indicando a quantidade de genes expressos com potencial associação ao metabolismo de xenobióticos, nos dois indivíduos estudados, dos quais 17 deles são compartilhados entre os dois organismos. Foram identificados 10 transcritos presentes apenas em *Larus dominicanus* e 7 transcritos encontrados somente em *Puffinus puffinus*. Fonte: Elaboração da autora (2024).

Analisando os genes que identificamos pertencentes à fase I, estão as FMOs e CYPs. Alguns estudos apontam as enzimas FMO1, FMO2, FMO3, FMO4 e FMO5 como enzimas funcionais em humanos (Hernandez et al., 2004). Considerando essas enzimas que possuem atividade já conhecida, identificamos as FMO3 e FMO5 em *L. dominicanus* e em *P. puffinus*, encontramos FMO1, FMO3 e FMO5. As FMOs são enzimas importantes na desintoxicação em vertebrados transformando os heteroátomos em óxidos mais solúveis em água para a excreção dos mesmos (Phillips; Shephard, 2019). Já é apresentado o papel significativo das FMOs no metabolismo de muitos pesticidas e sabe-se também que algumas reações realizadas por FMO com poluentes podem gerar metabólitos mais tóxicos para o DNA, por exemplo (Henderson et al., 2004; Su et al., 2008).

As enzimas CYPs são as mais abundantes quando falamos de metabolismo de xenobióticos em humanos (Zhao et al., 2021). Diante dos dados que obtivemos na montagem e anotação de ambas as espécies, podemos observar uma quantidade significativa de genes anotados pertencentes a superfamília CYP. A literatura cita algumas famílias que estão intimamente relacionadas com o metabolismo de xenobióticos, sendo elas as famílias 1, 2 e 3 (Ingelman-Sundberg, 2004; Zanger; Schwab 2013). Diante desta informação, os CYPs pertencentes a outras famílias foram eliminados do presente estudo, restando 9 genes CYP de *Larus dominicanus* e 6 genes CYPs de *Puffinus puffinus* que possui potencial atividade relacionada ao metabolismo de contaminantes (Tabela 4).

Dentre o transcrito identificado na família 1 que possui atividade relacionada ao metabolismo de xenobióticos, podemos citar a CYP1A5, uma isoforma da enzima presentes em aves que são análogos às isoformas humanas de CYP1A1 e CYP1A2 (Gilday et al., 1996). De maneira geral, os transcritos de CYP1A são regulados pelo receptor de aril hidrocarboneto (AhR), sendo ele também alvo de diversos xenobióticos como benzo(a)pireno e outros HPAs (Nerbert et al., 2008; Go et al., 2015) e que também foi encontrado nesta investigação. As enzimas CYP1A já são empregadas como biomarcadores de contaminação em animais de vida selvagem, por exemplo na ave da espécie *Phalacrocorax auritus* (Xia et al., 2020). Outros estudos já demonstram a presença dessas enzimas CYP1A5 no fígado de aves (Kawai et al., 2020). Além disso, buscando informações a respeito das espécies trabalhadas aqui, já foram identificados por exemplo a presença de transcritos de CYP1A5 em fígados de *P. puffinus* afetados com poluição, como o alto índice de contaminação por PCBs, na costa brasileira (Serafini et al., 2024). Estes trabalhos corroboram com os dados aqui encontrados, dos quais demonstram a presença deste transcrito no fígado dessas aves e que os mesmos possuem um papel associado ao metabolismo de xenobióticos.

Outra família de CYPs encontrada foi a das CYP2, sendo essa a maior e mais diversa família de CYPs (Nelson, 2003). A regulação dos transcritos de CYP2 são pouco compreendidas. Em galinhas, CYP2H são geralmente induzidas por fenobarbital e outros indutores do mesmo tipo atuando em vias do receptor androstano (CAR) e receptor órfão nuclear de detecção de xenobióticos de galinhas (CXR) (Handchin; Meyer, 2003). Dentre alguns indutores destes genes, encontram-se compostos como poluentes orgânicos persistentes, bifenis policlorados e diclorodifeniltricloroetano (DDT) e seus metabólitos

(Craft et al., 2002; Wyde et al., 2003). Um estudo de filogenia utilizando 48 genomas de aves encontraram 642 CYP2 de genes e pseudogenes, além disso encontraram cerca de 12 subfamílias (Almeida et al., 2016). Algumas subfamílias encontradas abrangem as mesmas citadas nos nossos estudos, presentes na Tabela 4. As CYP2D estão presentes em vários mamíferos e tem sido estabelecida uma relação de hábitos alimentares e a metabolização de toxinas vegetais como alcaloides por essas enzimas (Yasukochi; Satta, 2011). Outro estudo focado em compreender melhor a história evolutiva dos genes CYP2 em aves encontraram alguns genes de CYP2C e CYP2J e ainda demonstram a possibilidade desses haverem regulações distintas de expressão no tecido hepático (Kubota et al., 2011). Além desse resultado, o estudo apresentou os níveis de transcrição dos genes testados de CYP2C e CYP2J e sua correlação não significativa entre as concentrações de compostos clorados e o nível de expressão desses genes (Kubota et al., 2011).

A última família selecionada foi a família de CYP3, sendo ela regulada pelo receptor de glicocorticoides (GR) e pelo receptor X pregnano (PXR) em células do fígado humano (Honkakoski; Negishi, 2000; Pascussi et al., 2000). Em humanos ainda, essas enzimas atuam no metabolismo de uma série de fármacos como antibióticos, antimicóticos e glicocorticóides (Backman et al., 1996). Deste modo, os estudos confirmam a atuação das CYPs no metabolismo de xenobióticos, apresentando um papel importante nesta via (Zanger; Schwab, 2013; Sharifian et al., 2020).

**Tabela 4.** CYPs identificados para os dois indivíduos estudados.

	<i>L. dominicanus</i>	<i>P. puffinus</i>
<i>CYP1</i>		
	<i>1A5</i>	<i>1A5</i>
<i>CYP2</i>		
	<i>2C20, 2C8, 2D3, 2H1, 2J2, 2W1</i>	<i>2C5, 2H1, 2J2, 2W1</i>
<i>CYP3</i>		
	<i>3A13, 3A24</i>	<i>3A21</i>

Legenda: Tabela indicando os genes CYPs encontrados nos animais estudados especificando sua família e subfamília. Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Na fase II de biotransformação há algumas enzimas que catalisam reações de conjugação, geralmente, após a fase I do processo (Rushmore; Kong, 2002). Com as análises executadas, foram encontrados 3 transcritos pertencentes à superfamília UDP-

glucoroniltransferase (UGT) somente no indivíduo de *P. puffinus*. Dentre esses genes, encontramos as famílias *UGT1* (*UGT1A1* e *UGT1A9*) e *UGT2* (*UGT2A2*). As enzimas UGTs desempenham um papel importante na adição de açúcares em moléculas lipofílicas. Em mamíferos, estão presentes os membros das famílias UGT1, UGT2, UGT3 e UGT8 que executam sua função em prol da eliminação das substâncias exógenas. Atuam principalmente na conjugação de uma grande quantidade de drogas e toxinas, mas também em moléculas endógenas (Meech et al., 2019). A expressão desse gene é geralmente regulada por fatores de transcrição dependente dos ligantes, atuando como sensores para os níveis de substrato, desta maneira as UGTs são responsivas à demanda celular tecidual para a desintoxicação e manutenção do metabolismo endobiótico (Meech et al., 2019). Com essas informações a respeito da UGT podemos considerar como uma resposta do *P. puffinus* diante da exposição à contaminante, que por sua vez, estava com as penas cobertas com óleo quando encontrado na praia.

As Sulfotransferases são enzimas que atuam na metabolização de hormônios, aminas, xenobióticos e drogas. Elas podem tornar uma substância altamente excretável mas ao mesmo tempo, fazer com que ela seja altamente tóxica para o organismo (Bojarová; William., 2008). Assim como as CYPs, foram também classificadas em famílias, indicadas por números, e subfamílias indicadas por uma letra (Li et al., 2008). Em *L. dominicanus*, identificamos genes SULTs associados à via metabólica de interesse pertencentes às famílias 1 (*SULT1D1*, *SULT1B1* e *SULT1C1*), 2 (*SULT2B1*) enquanto no indivíduo de *P. puffinus* foram identificados membros das famílias 1 (*SULT1B1*), 3 (*SULT3A1*). Entre essas enzimas, as famílias SULT1 e SULT2 são as principais relacionadas ao metabolismo de xenobióticos em humanos, incluindo desde fármacos e pró-carcinogênicos, mas além disso, se associam também ao metabolismo de endobióticos que incluem esteróides e neurotransmissores, por exemplo (Reinen; Vermeulen, 2015; Xie; Xie, 2020). Além dessas, a enzima SULT3A1 pode estar relacionada também com o metabolismo de xenobiótico, segundo Takahashi et al., (2008), após clonagem, expressão e caracterização de SULT3A1, demonstrando ação exclusivamente no fígado de camundongos. Deste modo, uma variedade de enzimas SULTs relacionadas ao metabolismo de compostos exógenos foram obtidas entre as duas espécies, totalizando 4 para *L. dominicanus* e 2 para *P. puffinus*.

Outras enzimas importantes conhecidas na fase II da biotransformação são as Glutathionas-S-Transferases (GST), que além de desempenhar um papel na desintoxicação

celular é relevante também na manutenção da homeostase (Zhang et al., 2014). Selecionando os genes de GST presentes no fígado, encontramos GST Alfa (*GSTAI*), GST Ômega (*GSTOI*) e GST Theta (*GSTTI*) que foram em comum entre os dois indivíduos estudados. Em humanos, os três genes identificados possuem localização celular citosólica e ocorrência principalmente no fígado (Chatterjee; Gupta, 2018). Um estudo caracterizando enzimas de biotransformação de fase I e II nas espécies *Fulmarus glacialis* e *Rissa tridactyla*, duas espécies de aves marinhas do Ártico, também relatam a atividade de GST assim como sua expressão em fígado, corroborando com informações aqui encontradas (Helgason et al., 2010).

Além das enzimas de biotransformação, encontramos o gene do Receptor de Aril Hidrocarboneto (AHR) para os dois indivíduos estudados. Dentre suas funções, a mais conhecida está relacionada à regulação do metabolismo de xenobióticos, onde o AHR é o responsável pela ativação da expressão em alguns genes do Citocromo P450, principalmente do CYP1A1, das quais suas funções se associam principalmente à desintoxicação (Hankinson, 2005). De maneira mais detalhada quando um ligante se liga ao AhR este se transloca para o núcleo e se liga ao ARNT, formando um heterodímero que modula a expressão de alvos ao ligar-se a elementos responsivos aos xenobióticos (Larigot et al., 2018). Dentre os principais ligantes exógenos destacam-se os HPAs, obtidos principalmente através da alimentação e também pela exposição ambiental ao longo do tempo (Larigot et al., 2018). Além das funções conhecidas de desintoxicação, nos últimos anos, foram descobertos novos papéis desempenhados pelo AHR como sua ativação através de ligantes endógenos, importância no desenvolvimento do sistema cardiovascular e renal (Mimura et al., 1997; Lahvis et al., 2004; Nguyen; Bradfield, 2008).

Com a seleção de genes relacionados ao metabolismo de xenobióticos de fase I e de fase II identificamos 17 genes em *L. dominicanus* e 18 em *P. puffinus* (Tabela 5). Genes dos quais não se sabe a função ao certo ou que tinham outras funções não relacionadas ao metabolismo de xenobióticos foram eliminados.

De modo geral, a quantidade e a composição de genes foram semelhantes, com exceção das UGTs que estavam presentes em *P. puffinus*, mas não em *L. dominicanus*. Conforme citado anteriormente, as UGTs possuem uma função altamente relacionada ao metabolismo de compostos exógenos e sua expressão pode estar atrelada ao fato dos indivíduos de *P. puffinus* estar coberto com óleo bruto. O presente trabalho aborda a

expressão e caracterização de alguns genes e para que correlações sejam estabelecidas, mais análises são necessárias. Deste modo, os genes aqui identificados podem servir como base para que novos estudos sejam realizados com essas espécies, buscando verificar o estado de saúde desses indivíduos em experimentos delineados.

**Tabela 5.** Genes identificados com papel estabelecido no metabolismo de xenobióticos de fase I e II para os indivíduos estudados.

<b>Genes</b>	<i>L. dominicanus</i>	<i>P. puffinus</i>
<i>Fase I</i>		
<i>CYP</i>	9	6
<i>FMO</i>	2	3
<i>Fase II</i>		
<i>UGT</i>	0	3
<i>SULT</i>	3	2
<i>GST</i>	3	3
<i>Receptor</i>		
<i>AHR</i>	1	1

Legenda: Genes associados ao processo de biotransformação de fase I e fase II identificados no transcriptoma montado dos dois indivíduos estudados. As linhas identificam o gene e a quantidade de genes identificados, de acordo com cada espécie. A espécie está identificada nas duas últimas colunas da tabela. Fonte: Elaboração da autora (2024).

#### 4.4 ENRIQUECIMENTO DOS TRANSCRITOS IDENTIFICADOS

##### 4.4.1 Contexto biológico dos genes

Para compreender o contexto biológico em que o conjunto de genes expressos no fígado das aves estudadas estavam inseridos, análises de ontologia genética foram executadas. Com o conjunto de dados de *L. dominicanus*, encontramos 49 termos enriquecidos para os processos biológicos e 41 para as funções moleculares. Analisando de modo mais detalhado, ao buscarmos genes relacionados ao processo de biotransformação de fase I e II encontramos 3 termos da ontologia com ao menos um gene nos processos biológicos e 2 ligados às funções moleculares (Tabela 6).

**Tabela 6.** Termos da ontologia genética enriquecidos para o *L. dominicanus*.

<b>Processos biológicos</b>	<b>Qnt. genes</b>	<b>p ajustado</b>
GO:0044281: Processo metabólico de pequenas moléculas	121	6,13e+07
GO:0006082: Processo metabólico de ácidos orgânicos	69	9,08e+08
GO:0006508: Proteólise	82	0,0419
<b>Funções moleculares</b>	<b>Qnt. genes</b>	<b>p ajustado</b>
GO:0016740: Atividade transferase	146	0,0004
GO:0036094: Ligação à pequenas moléculas	193	0,0007

Legenda: Termos da ontologia genética (GO) enriquecidos para o conjunto de dados de *L. dominicanus*.  
Fonte: Elaboração da autora (2024).

Para os dados de *P. puffinus*, encontramos 101 termos da ontologia relacionados aos processos biológicos e 43 às funções moleculares. Desses termos, 5 processos biológicos continham algum dos genes associados à biotransformação de fase I e II e somente 2 funções moleculares associadas a esses genes (Tabela 7).

**Tabela 7.** Termos da ontologia genética enriquecidos para o *P. puffinus*.

<b>Processos biológicos</b>	<b>Qnt. genes</b>	<b>p ajustado</b>
GO:0044281: Processo metabólico de pequenas moléculas	101	4,44e+08
GO:0006082: Processo metabólico de ácidos orgânicos	61	4,44e+08
GO:0006790: Processo metabólico de compostos de enxofre	17	0,0076
GO:0006631: Processo metabólico de ácidos graxos	19	0,0086
GO:0032787: Processo metabólico de ácidos monocarboxílicos	30	0,0196
<b>Funções moleculares</b>	<b>Qnt. genes</b>	<b>p ajustado</b>
GO:0036094: Ligação à pequenas moléculas	156	0,0033
GO:0016740: Atividade transferase	116	0,0051

Legenda: Termos da ontologia genética (GO) enriquecidos para o conjunto de dados de *P. puffinus*. Fonte: Elaboração da autora (2024).



Dentre os termos da ontologia genética encontrados, podemos destacar a função molecular associada à atividade transferase (GO:0016740), como potencial importância para o monitoramento ambiental. Em ambos os casos esse termo está presente e abriga enzimas como GSTs e SULTs. Essa classe está associada com reações de transferência de grupos, dentre elas temos alguns membros associados ao metabolismo de xenobióticos como GST, SULT e UGT (Nelson; Michael, 2013).

Os demais processos biológicos e funções moleculares são compatíveis com o papel que o fígado desempenha no organismo, como metabolismo de ácidos graxos, metabolismo de pequenas moléculas entre outros. Esse achado é relevante pois mostra que o tecido no estado *post mortem* pode ainda apresentar uma quantidade significativa de genes expressos associados às funções biológicas comuns do órgão.

#### 4.4.2 Vias metabólicas enriquecidas

Além da análise da ontologia genética, também realizamos o enriquecimento de vias do KEGG. Essa etapa é importante pois contextualiza metabolicamente a expressão dos genes e oferece *insights* sobre os processos metabólicos que podem estar ocorrendo no tecido estudado, neste caso, o fígado, no momento da coleta da amostra. Ao realizar o enriquecimento dos genes do *L. dominicanus*, identificamos a participação de 8 vias metabólicas relevantes (Tabela 8), enquanto para o *P. puffinus*, observamos o enriquecimento de aproximadamente 13 vias metabólicas (Tabela 9).

**Tabela 8.** Enriquecimento de vias do KEGG para o *L. dominicanus*.

Vias enriquecidas do KEGG	Qty. genes	<i>p</i> ajustado
gga04217: Necroptose	29	0,0004
gga04137: Mitofagia - animal	21	0,0039
gga04144: Endocitose	38	0,0194
gga04210: Apoptose	23	0,0351
gga01200: Metabolismo do carbono	19	0,0351
gga03082: Remodelação da cromatina dependente de ATP	19	0,0351
gga05132: Infecção por <i>Salmonella</i>	36	0,0351

gga01230: Biossíntese de aminoácidos 13 0,0456

Legenda: Termos do KEGG enriquecidos para o conjunto de dados de *L. dominicanus*. Fonte: Elaboração da autora (2024).

Em ambos os casos, as vias de necropsia, mitofagia - animal, infecção por *salmonella* e metabolismo do carbono estavam presentes. Quando buscamos de modo mais específico, vemos que vários genes associados a esses processos são muito semelhantes entre os indivíduos. Os genes presentes na via da necropsia podem estar relacionados com o contexto em que as aves estavam passando por um processo *post mortem* quando foram encontradas na praia, como é o caso do *P. puffinus*, ou com o *L. dominicanus* que morreu na base. O mesmo pode ser aplicado à mitofagia, que ocorre nos casos em que as mitocôndrias possuem algum defeito e são marcadas para a degradação (Alberts et al., 2017). Outra via interessante compartilhada foi a via associada à contaminação por *Salmonella* spp. que apresentou genes associados ao sistema imune dos animais. Alguns estudos já abordam a contaminação por *Salmonella* spp. em espécies de aves marinhas, citando ainda o risco desses animais serem uma potencial fonte de contaminação (Čížek et al., 2006; Moré et al., 2017; Cardoso et al., 2021).

**Tabela 9.** Enriquecimento de vias do KEGG para o *P. puffinus*.

Vias enriquecidas do KEGG	Qnt. genes	<i>p</i> ajustado
gga04137: Mitofagia - animal	20	0,0010
gga04217: Necroptose	23	0,0038
gga01200: Metabolismo do carbono	19	0,0043
gga01230: Biossíntese de aminoácidos	13	0,0113
gga05132: Infecção por <i>Salmonella</i>	32	0,0170
gga04140: Autofagia - animal	23	0,0236
gga00620: Metabolismo do piruvato	9	0,0312
gga03410: Reparo de excisão de base	9	0,0347
gga04141: Processamento de proteínas no retículo endoplasmático	22	0,0347
gga03420: Reparo de excisão de nucleotídeos	10	0,0347
gga00250: Metabolismo de alanina, aspartato e glutamato	8	0,0347

gga00020: Ciclo do citrato (ciclo TCA)	7	0,0347
gga00010: Glicólise / Gliconeogênese	10	0,0488

Legenda: Termos do KEGG enriquecidos para o conjunto de dados de *P. puffinus*. Fonte: Elaboração da autora (2024).

Com o enriquecimento de *P. puffinus* podemos observar algumas vias associadas à obtenção de energia, como glicólise/gliconeogênese, metabolismo do piruvato e ciclo do citrato. Alguns dos genes enriquecidos na via da glicólise/gliconeogênese são comuns para ambas as situações, não sendo possível identificar um gene chave indicador da degradação do carboidrato ou da necessidade de acessar outros recursos para a produção de glicose. Apesar disso, é importante levar em conta a situação deste animal, que apresentava um escore corporal ruim, podendo estar relacionado com o período de migração dessa espécie, que ocorre no período de inverno no hemisfério Norte, quando ela vem para a costa brasileira (Guilford et al., 2009). Tratando-se do perfil metabólico do fígado é esperado encontrar genes associados a esses processos, já que esse órgão desempenha um papel importante nessas vias metabólicas (Nelson; Michael, 2013).

Apesar disso, nenhuma via metabólica associada ao metabolismo de xenobióticos foi ativada com os dados desses indivíduos. Isso pode ocorrer por vários fatores, primeiro por ela não ser ativada no momento em que foram coletados os fígados ou pela quantidade de genes associados a esse processo não se destacarem frente aos demais genes presentes. Apesar disso, estes resultados demonstram algumas funções que os genes expressos no tecido hepático poderiam desempenhar nesses organismos no momento da sua morte ou momentos após.

Diante desses resultados é importante ressaltar a limitação da técnica e a necessidade de novos estudos para compreender melhor as respostas desses indivíduos expostos nessas condições. Esses achados demonstram a presença de alguns genes que mesmo no estado *post mortem* podem revelar alguns dos papéis biológicos executados naturalmente nesse tecido analisado. Esses dados abrem possibilidades para que novos estudos sejam realizados utilizando animais não modelo, validando ainda o uso de animais moribundos ou mortos em determinados projetos e análises.

## 5 CONCLUSÃO

O presente estudo teve como objetivo principal realizar a montagem do transcriptoma hepático de duas espécies distintas de aves marinhas, seguida pela caracterização do perfil transcriptômico com ênfase nas enzimas associadas aos processos de biotransformação de fase I e II. Esses objetivos foram atingidos com sucesso, resultando em montagens de qualidade e uma anotação funcional criteriosa. A partir dessas análises, foi possível estabelecer um perfil transcriptômico das aves estudadas em relação aos genes associados aos processos de biotransformação de fase I e II. É importante ressaltar que o perfil transcriptômico hepático desses indivíduos reflete situações específicas do momento em que foram encontrados, incluindo seu estado *post mortem*.

Ao investigar as possíveis causas da morte e seu impacto na expressão gênica hepática, foram identificadas particularidades nos animais estudados. No contexto da contaminação ambiental, a compreensão da história de vida desses indivíduos é dificultada, no entanto, análises durante a necropsia sugerem, por exemplo, o contato do *P. puffinus* com óleo bruto. Apesar disso, análises realizadas por outra instituição não foram conclusivas sobre a origem do óleo encontrado nas penas da ave, devido à escassez de material para análise. No entanto, informações relevantes sobre a expressão gênica hepática foram obtidas, fornecendo detalhes importantes sobre as respostas adaptativas desses organismos e direcionando futuras investigações e estudos que visem aplicar medidas ambientais para a conservação das populações dessas espécies.

Analisando os dados sobre a espécie *L. dominicanus*, não foram encontradas evidências de exposição a contaminantes, embora tenha sido observada a presença de uma variedade de genes associados aos processos de biotransformação. É crucial destacar que a análise do transcriptoma resulta em uma ampla gama de genes expressos no tecido hepático, embora haja limitações na compreensão de suas funções após a tradução. Essas limitações, juntamente com outras considerações, destacam a necessidade de aplicar técnicas adicionais para verificar a validade das sequências encontradas e as respostas enzimáticas diante da exposição a contaminantes.

Diante das complexidades e desafios envolvidos na investigação das possíveis causas de morte e suas implicações na expressão gênica dos animais estudados, destaca-se a importância do monitoramento ambiental contínuo e abrangente. Uma análise minuciosa das características dos organismos, juntamente com a avaliação dos riscos

associados à contaminação ambiental, ressalta a necessidade de um monitoramento constante da saúde e do bem-estar das populações em seus habitats naturais. Por fim, é essencial investir em novas técnicas e abordagens multidisciplinares para compreender os impactos das atividades humanas no meio ambiente e desenvolver estratégias eficazes de conservação e proteção das espécies.

## REFERÊNCIAS

ACKERMAN, Joshua T.; EAGLES-SMITH, Collin A.; HERZOG, Mark P.; HARTMAN, C. Alex. Maternal transfer of contaminants in birds: mercury and selenium concentrations in parents and their eggs. *Environmental Pollution*, v. 210, p. 145-154, mar. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2015.12.016>.

AKPOR, Oghenerobor Benjamin. Heavy Metal Pollutants in Wastewater Effluents: sources, effects and remediation. *Advances In Bioscience And Bioengineering*, v. 2, n. 4, p. 37, 2014. Science Publishing Group. <http://dx.doi.org/10.11648/j.abb.20140204.11>.

ALBERTS, Bruce; JOHNSON, Alexander; LEWIS, Julian; MORGAN, David; RAFF, Martin; ROBERTS, Keith; WALTER, Peter; WILSON, John; HUNT, Tim. *Biologia Molecular da Célula*. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 1464 p.

ALMEIDA, Daniela; MALDONADO, Emanuel; KHAN, Imran; SILVA, Liliana; GILBERT, M. Thomas P.; ZHANG, Guojie; JARVIS, Erich D.; O'BRIEN, Stephen J.; JOHNSON, Warren E.; ANTUNES, Agostinho. Whole-Genome Identification, Phylogeny, and Evolution of the Cytochrome P450 Family 2 (CYP2) Subfamilies in Birds. *Genome Biology And Evolution*, [S.L.], v. 8, n. 4, p. 1115-1131, 14 mar. 2016. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/gbe/evw041>.

AMORIM, Ariane Nicaretta. Montagem do transcriptoma de novo e identificação de grupos genes ortólogos em quatro espécies da costa brasileira. 2021. 139 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biologia Celular e do Desenvolvimento, Biologia Celular, Embriologia e Genética, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2021. Cap. 2. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/227358>. Acesso em: 18 maio 2023.

ARINÇ, E; PHILPOT, M. Preparation and properties of partially purified pulmonary cytochrome P-450 from rabbits. *Journal Of Biological Chemistry*, v. 251, n. 11, p. 3213-3220, jun. 1976. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)33425-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0021-9258(17)33425-7).

ASLAM, Bilal; BASIT, Madiha; NISAR, Muhammad Atif; KHURSHID, Mohsin; RASOOL, Muhammad Hidayat. Proteomics: technologies and their applications. *Journal Of Chromatographic Science*, v. 55, n. 2, p. 182-196, 18 out. 2016. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/chromsci/bmw167>.

BACKMAN, Janne T.; OLKKOLA, Klaus T.; NEUVONEN, Pertti J.. Rifampin drastically reduces plasma concentrations and effects of oral midazolam. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, [S.L.], v. 59, n. 1, p. 7-13, jan. 1996. Wiley. [http://dx.doi.org/10.1016/s0009-9236\(96\)90018-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0009-9236(96)90018-1).

BAER, Brian R.; RETTIE, Allan E.; HENNE, Kirk R.. Bioactivation of 4-Ipomeanol by CYP4B1: •• adduct characterization and evidence for an enedial intermediate. *Chemical Research In Toxicology*, v. 18, n. 5, p. 855-864, 26 abr. 2005. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/tx0496993>.

BATEMAN, Alex et al. UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Research*, v. 49, n. 1, p. 480-489, 25 nov. 2020. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkaa1100>.

BENTZ, Alexandra B.; THOMAS, Gregg W. C.; RUSCH, Douglas B.; ROSVALL, Kimberly A.. Tissue-specific expression profiles and positive selection analysis in the tree swallow (*Tachycineta bicolor*) using a de novo transcriptome assembly. *Scientific Reports*, xv. 9, n. 1, p. 0, 1 nov. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-52312-4>.

BEIRAS, Ricardo. Biotransformation. *Marine Pollution*, p. 205-214, 2018. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-813736-9.00012-x>.

BirdLife International. 2018. *Puffinus puffinus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2018: e.T22698226A132636603. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2018-2.RLTS.T22698226A132636603.en>. Accessed on 24 January 2024.

BOJAROVÁ, Pavla; WILLIAMS, Spencer J. Sulfotransferases, sulfatases and formylglycine-generating enzymes: a sulfation fascination. *Current Opinion In Chemical Biology*, v. 12, n. 5, p. 573-581, out. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.06.018>.

BOLGER, Anthony M.; LOHSE, Marc; USADEL, Bjoern. Trimmomatic: a flexible trimmer for illumina sequence data. *Bioinformatics*, v. 30, n. 15, p. 2114-2120, 1 abr. 2014. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>.

BORGÅ, K.. Bioaccumulation. *Encyclopedia Of Ecology*, p. 346-348, 2008. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-008045405-4.00374-8>.

BURGER, Joanna; GOCHFELD, Michael. Marine Birds as Sentinels of Environmental Pollution. *Ecohealth*, v. 1, n. 3, p. 0, 28 maio 2004. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10393-004-0096-4>.

CAMACHO, Christiam; COULOURIS, George; AVAGYAN, Vahram; MA, Ning; PAPADOPOULOS, Jason; BEALER, Kevin; MADDEN, Thomas L. BLAST+: architecture and applications. *Bmc Bioinformatics*, v. 10, n. 1, p. 0, dez. 2009. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2105-10-421>

CAMPHUYSEN, C; SCHOUTEN, S; A GRONERT,. Mystery spill of Polyisobutylene (C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>)<sub>n</sub> off the Dutch coast affecting seabirds in March 2010. *Seabird Journal*, v. 23, p. 143-145, 2010. The Seabird Group. <http://dx.doi.org/10.61350/sbj.23.143>.

CARDOSO, Máira Duarte; SANTOS, André Felipe das Mercês; RODRIGUES, Marcelle da Silva; PRIBUL, Bruno Rocha; GRAEL, Andrea Soffiatti; PEDROSO, Vanessa Marques; PIRES, Jeferson Rocha; TRAVASSOS, Carlos Eurico Pires Ferreira; DOMIT, Camila; VIEIRA-DA-MOTTA, Olney. *Salmonella* spp. profiles isolated from seabird samples from the Brazilian coast. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 193, p. 105413, ago. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2021.105413>.

CARDOSO, Máira; MOURA, Jailson de; TAVARES, Davi C; A GONÇALVES, Rodrigo; COLABUONO, Fernanda I; ROGES, Emily M; SOUZA, Roberta de; RODRIGUES, Dalia dos; MONTONE, Rosalinda C; SICILIANO, Salvatore. The Manx shearwater (*Puffinus puffinus*) as a candidate sentinel of Atlantic Ocean health. *Aquatic*

Biosystems, v. 10, n. 1, p. 6, 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/2046-9063-10-6>.

CHATTERJEE, Anupam; GUPTA, Sanjay. The multifaceted role of glutathione S-transferases in cancer. *Cancer Letters*, v. 433, p. 33-42, out. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2018.06.028>.

CHEN, Li; CHEN, Lu; LI, Xu; QIN, Lin; ZHU, Yan; ZHANG, Qianru; TAN, Daopeng; HE, Yuqi; WANG, Yu-He. Transcriptomic profiling of hepatic tissues for drug metabolism genes in nonalcoholic fatty liver disease: a study of human and animals. *Frontiers In Endocrinology*, v. 13, p. 0, 4 jan. 2023. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fendo.2022.1034494>.

ČÍŽEK, A.; DOLEJSKÁ, M.; KARPÍLKOVÁ, R.; DĚDIČOVÁ, D.; LITERÁK, I. Wild black-headed gulls (*Larus ridibundus*) as an environmental reservoir of Salmonella strains resistant to antimicrobial drugs. *European Journal Of Wildlife Research*, v. 53, n. 1, p. 55-60, 28 set. 2006. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10344-006-0054-2>.

CLATTERBUCK, Corey A.; LEWISON, Rebecca L.; DODDER, Nathan G.; ZEEMAN, Catherine; SCHIFF, Kenneth. Seabirds as regional biomonitors of legacy toxicants on an urbanized coastline. *Science Of The Total Environment*, v. 619-620, p. 460-469, abr. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.11.057>.

CLOONAN, Nicole; FORREST, Alistair R R; KOLLE, Gabriel; A GARDINER, Brooke B; FAULKNER, Geoffrey J; BROWN, Mellissa K; TAYLOR, Darrin F; STEPTOE, Anita L; WANI, Shivangi; BETHEL, Graeme. Stem cell transcriptome profiling via massive-scale mRNA sequencing. *Nature Methods*, v. 5, n. 7, p. 613-619, 30 maio 2008. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.1223>.

CONESA, Ana; MADRIGAL, Pedro; TARAZONA, Sonia; GOMEZ-CABRERO, David; CERVERA, Alejandra; MCPHERSON, Andrew; SZCZEŚNIAK, Michał Wojciech; GAFFNEY, Daniel J.; ELO, Laura L.; ZHANG, Xuegong. A survey of best practices for RNA-seq data analysis. *Genome Biology*, v. 17, n. 1, p. 0, 26 jan. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s13059-016-0881-8>.

CRAFT, E. S.. Comparative Responsiveness of Hypothyroxinemia and Hepatic Enzyme Induction in Long-Evans Rats Versus C57BL/6J Mice Exposed to TCDD-like and Phenobarbital-like Polychlorinated Biphenyl Congeners. *Toxicological Sciences*, [S.L.], v. 68, n. 2, p. 372-380, 1 ago. 2002. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/toxsci/68.2.372>.

Del Hoyo, J., Elliot, A. and Sargatal, J. 1992. Handbook of the Birds of the World, Vol. 1: Ostrich to Ducks. Lynx Edicions, Barcelona, Spain.

DESFORGES, Jean-Pierre; LEGRAND, Elena; BOULAGER, Emily; LIU, Peng; XIA, Jianguo; BUTLER, Heather; CHANDRAMOULI, Bharat; EWALD, Jessica; BASU, Niladri; HECKER, Markus. Using Transcriptomics and Metabolomics to Understand Species Differences in Sensitivity to Chlorpyrifos in Japanese Quail and Double-Crested



Cormorant Embryos. *Environmental Toxicology And Chemistry*, v. 40, n. 11, p. 3019-3033, 15 set. 2021. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/etc.5174>.

DING, Yun; TU, Pengjie; CHEN, Yiyong; HUANG, Yangyun; PAN, Xiaojie; CHEN, Wenshu. CYP2J2 and EETs protect against pulmonary arterial hypertension with lung ischemia–reperfusion injury in vivo and in vitro. *Respiratory Research*, v. 22, n. 1, p. 0, 13 nov. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12931-021-01891-w>.

DOGRA, Satish C.; MAY, Brian K.. Phenobarbital-Induced Activation of CYP2H1 and 5-Aminolevulinate Synthase Genes in Chick Embryo Hepatocytes Is Blocked by an Inhibitor of Protein Phosphorylation. *Archives Of Biochemistry And Biophysics*, v. 327, n. 2, p. 271-278, mar. 1996. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/abbi.1996.0121>.

EMBRANDIRI, Asha; KIYASUDEEN, S. Katheem; RUPANI, Parveen Fatemeh; IBRAHIM, Mahammad Hakimi. *Environmental Xenobiotics and Its Effects on Natural Ecosystem. Plant Responses To Xenobiotics*, p. 1-18, 2016. Springer Singapore. [http://dx.doi.org/10.1007/978-981-10-2860-1\\_1](http://dx.doi.org/10.1007/978-981-10-2860-1_1).

ESWARAMOORTHY, Subramaniam; BONANNO, Jeffrey B.; BURLEY, Stephen K.; SWAMINATHAN, Subramanyam. Mechanism of action of a flavin-containing monooxygenase. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, v. 103, n. 26, p. 9832-9837, 27 jun. 2006. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0602398103>.

FABBRI, Elena; FRANZELLITTI, Silvia. Human pharmaceuticals in the marine environment: focus on exposure and biological effects in animal species. *Environmental Toxicology And Chemistry*, v. 35, n. 4, p. 799-812, 24 nov. 2015. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/etc.3131>.

GAGLIARDI, Dominique; DZIEMBOWSKI, Andrzej. 5' and 3' modifications controlling RNA degradation: from safeguards to executioners. **Philosophical Transactions Of The Royal Society B: Biological Sciences**, v. 373, n. 1762, p. 20180160, 5 nov. 2018. The Royal Society. <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2018.0160>.

GARCÍA-ORTEGA, Luis Fernando; MARTÍNEZ, Octavio. How Many Genes Are Expressed in a Transcriptome? Estimation and Results for RNA-Seq. *Plos One*, v. 10, n. 6, p. 0, 24 jun. 2015. Public Library of Science (PLOS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0130262>.

GARCIA-REYERO, Natália; PERKINS, Edward J.. Systems biology: leading the revolution in ecotoxicology. *Environmental Toxicology And Chemistry*, v. 30, n. 2, p. 265-273, 23 dez. 2010. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/etc.401>.

GAVRIATOPOULOU, Maria; FOTIOU, Despoina; NTANASIS-STATHOPOULOS, Ioannis; KASTRITIS, Efstathios; TERPOS, Evangelos; DIMOPOULOS, Meletios Athanasios. How I treat elderly patients with plasma cell dyscrasias. *Aging*, v. 10, n. 12, p. 4248-4268, 18 dez. 2018. Impact Journals, LLC. <http://dx.doi.org/10.18632/aging.101707>.

GIACCARDI, M.; YORIO, P. & LIZURUME, E. 1997. Patrones estacionales de la gaviota cocinera (*Larus dominicanus*) en un basural Patagónico y sus relaciones con el manejo de residuos urbanos y pesqueros. *Ornitología Neotropical* 8:77-84.

GIESY, John P.; KANNAN, Kurunthachalam. Global Distribution of Perfluorooctane Sulfonate in Wildlife. *Environmental Science & Technology*, v. 35, n. 7, p. 1339-1342, 1 mar. 2001. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/es001834k>.

GIL, Fernando; PLA, Antonio. Biomarkers as biological indicators of xenobiotic exposure. *Journal Of Applied Toxicology*, v. 21, n. 4, p. 245-255, jul. 2001. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jat.769>.

GILDAY, Deidre; GANNON, Maureen; YUTZEY, Katherine; BADER, David; RIFKIND, Arleen B.. Molecular Cloning and Expression of Two Novel Avian Cytochrome P450 1A Enzymes Induced by 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Journal Of Biological Chemistry*, [S.L.], v. 271, n. 51, p. 33054-33059, dez. 1996. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.271.51.33054>.

GO, Ryeo-Eun; HWANG, Kyung-A; CHOI, Kyung-Chul. Cytochrome P450 1 family and cancers. *The Journal Of Steroid Biochemistry And Molecular Biology*, [S.L.], v. 147, p. 24-30, mar. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.11.003>.

GOTOH, Osamu. Evolution of Cytochrome P450 Genes from the Viewpoint of Genome Informatics. *Biological And Pharmaceutical Bulletin*, v. 35, n. 6, p. 812-817, 2012. Pharmaceutical Society of Japan. <http://dx.doi.org/10.1248/bpb.35.812>.

GRABHERR, Manfred G; HAAS, Brian J; YASSOUR, Moran; LEVIN, Joshua Z; A THOMPSON, Dawn; AMIT, Ido; ADICONIS, Xian; FAN, Lin; RAYCHOWDHURY, Raktima; ZENG, Qiandong. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nature Biotechnology*, v. 29, n. 7, p. 644-652, 15 maio 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.1883>.

GRANDJEAN, P; BROWN, S s; REAVEY, P; YOUNG, D s. Biomarkers of chemical exposure: state of the art. *Clinical Chemistry*, v. 40, n. 7, p. 1360-1362, 1 jul. 1994. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/clinchem/40.7.1360>.

GRANT, Megan L.; LAVERS, Jennifer L.; STUCKENBROCK, Silke; SHARP, Paul B.; BOND, Alexander L.. The use of anthropogenic marine debris as a nesting material by brown boobies (*Sula leucogaster*). *Marine Pollution Bulletin*, v. 137, p. 96-103, dez. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.10.016>.

GUENGERICH, F. Peter; WATERMAN, Michael R.; EGLI, Martin. Recent Structural Insights into Cytochrome P450 Function. *Trends In Pharmacological Sciences*, v. 37, n. 8, p. 625-640, ago. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tips.2016.05.006>.

GUILFORD, T; MEADE, J; WILLIS, J; PHILLIPS, R.A; BOYLE, D; ROBERTS, S; COLLETT, M; FREEMAN, R; PERRINS, C.M. Migration and stopover in a small pelagic seabird, the Manx shearwater *Puffinus puffinus*: insights from machine learning. *Proceedings Of The Royal Society B: Biological Sciences*, v. 276, n. 1660, p. 1215-1223, 13 jan. 2009. The Royal Society. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2008.1577>.

HAAS, Brian J; PAPANICOLAOU, Alexie; YASSOUR, Moran; GRABHERR, Manfred; BLOOD, Philip D; BOWDEN, Joshua; COUGER, Matthew Brian; ECCLES, David; LI, Bo; LIEBER, Matthias. 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, 11 jul. 2013. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2013.084>.

HAN, Chao; CUI, Yuqing; GUO, Yiwei; ZHANG, Di; WANG, Xiao; GENG, Yumeng; SHI, Wanyu; BAO, Yongzhan. Proteome and transcriptome analysis revealed florfenicol via affected drug metabolism and lipid metabolism induce liver injury of broilers. *Poultry Science*, v. 100, n. 9, p. 101228, set. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.psj.2021.101228>.

HAN, Jeonghoon; KIM, Duck-Hyun; SEO, Jung Soo; KIM, Il-Chan; NELSON, David R.; PUTHUMANA, Jayesh; LEE, Jae-Seong. Assessing the identity and expression level of the cytochrome P450 20A1 (CYP20A1) gene in the BPA-, BDE-47, and WAF-exposed copepods *Tigriopus japonicus* and *Paracyclopsina nana*. *Comparative Biochemistry And Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, v. 193, p. 42-49, mar. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2017.01.001>.

HANDSCHIN, Christoph; MEYER, Urs A.. Induction of Drug Metabolism: the role of nuclear receptors. *Pharmacological Reviews*, [S.L.], v. 55, n. 4, p. 649-673, dez. 2003. American Society for Pharmacology & Experimental Therapeutics (ASPET). <http://dx.doi.org/10.1124/pr.55.4.2>.

HANKINSON, Oliver. Role of coactivators in transcriptional activation by the aryl hydrocarbon receptor. *Archives Of Biochemistry And Biophysics*, v. 433, n. 2, p. 379-386, jan. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2004.09.031>.

HEBERLE, Henry; MEIRELLES, Gabriela Vaz; SILVA, Felipe R da; TELLES, Guilherme P; MINGHIM, Rosane. InteractiVenn: a web-based tool for the analysis of sets through venn diagrams. *Bmc Bioinformatics*, v. 16, n. 1, p. 1-2, 22 maio 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12859-015-0611-3>.

HELGASON, Lisa B.; ARUKWE, Augustine; GABRIELSEN, Geir W.; HARJU, Mikael; HEGSETH, Marit N.; HEIMSTAD, Eldbjørg S.; JØRGENSEN, Even H.; MORTENSEN, Anne S.; WOLKERS, Johannes. Biotransformation of PCBs in Arctic seabirds: characterization of phase i and ii pathways at transcriptional, translational and activity levels. *Comparative Biochemistry And Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, v. 152, n. 1, p. 34-41, jun. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2010.02.009>.

HENDERSON, Marilyn C; KRUEGER, Sharon K; SIDDENS, Lisbeth K; STEVENS, Jan F; WILLIAMS, David e. S-Oxygenation of the thioether organophosphate insecticides phorate and disulfoton by human lung flavin-containing monooxygenase 2. *Biochemical Pharmacology*, v. 68, n. 5, p. 959-967, set. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2004.05.051>.

HENTATI-SUNDBERG, J.; RAYMOND, C.; SKÖLD, M.; SVENSSON, O.; GUSTAFSSON, B.; BONAGLIA, S.. Fueling of a marine-terrestrial ecosystem by a major seabird colony. *Scientific Reports*, v. 10, n. 1, p. 0, 22 set. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-020-72238-6>.

HERNANDEZ, Diana; JANMOHAMED, Azara; CHANDAN, Pritpal; PHILLIPS, Ian R; A SHEPHARD, Elizabeth. Organization and evolution of the flavin-containing monooxygenase genes of human and mouse. *Pharmacogenetics*, v. 14, n. 2, p. 117-130, fev. 2004. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/00008571-200402000-00006>.

HICKEY, Nathan J.; CRUMP, Doug; JONES, Stephanie P.; KENNEDY, Sean W.. Effects of 18 Perfluoroalkyl Compounds on mRNA Expression in Chicken Embryo Hepatocyte Cultures. *Toxicological Sciences*, v. 111, n. 2, p. 311-320, 17 jul. 2009. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/toxsci/kfp160>.

HONKAKOSKI, Paavo; NEGISHI, Masahiko. Regulation of cytochrome P450 (CYP) genes by nuclear receptors. *Biochemical Journal*, [S.L.], v. 347, n. 2, p. 321-337, 10 abr. 2000. Portland Press Ltd.. <http://dx.doi.org/10.1042/bj3470321>.

IJAZ, Muhammad Umar; GHAFOOR, Naila; HAYAT, Muhammad Faisal; ALMUTAIRI, Bader O.; ATIQUE, Usman. Amentoflavone mediated hepatoprotection to counteract paraquat instigated hepatotoxicity via modulating Nrf2/keap1 pathway: a biochemical, inflammatory, apoptotic and histopathological study. *Pesticide Biochemistry And Physiology*, v. 198, p. 105715, jan. 2024. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2023.105715>.

IMAOKA, Susumu; YONEDA, Yukio; SUGIMOTO, Toshikado; HIROI, Toyoko; YAMAMOTO, Keisuke; NAKATANI, Tatsuya; FUNAE, Yoshihiko. CYP4B1 Is a Possible Risk Factor for Bladder Cancer in Humans. *Biochemical And Biophysical Research Communications*, v. 277, n. 3, p. 776-780, nov. 2000. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/bbrc.2000.3740>.

INGELMAN-SUNDBERG, Magnus. Human drug metabolising cytochrome P450 enzymes: properties and polymorphisms. *Naunyn-Schmiedeberg'S Archives Of Pharmacology*, v. 369, n. 1, p. 89-104, 1 jan. 2004. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00210-003-0819-z>.

JACOBS, J M; SINCLAIR, P R; BEMENT, W J; LAMBRECHT, R W; SINCLAIR, J F; A GOLDSTEIN, J. Oxidation of uroporphyrinogen by methylcholanthrene-induced cytochrome P-450. Essential role of cytochrome P-450d. *Biochemical Journal*, v. 258, n. 1, p. 247-253, 15 fev. 1989. Portland Press Ltd.. <http://dx.doi.org/10.1042/bj2580247>.

JARRAR, Yazun Bashir; LEE, Su-Jun. Molecular Functionality of Cytochrome P450 4 (CYP4) Genetic Polymorphisms and Their Clinical Implications. *International Journal Of Molecular Sciences*, v. 20, n. 17, p. 4274, 31 ago. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms20174274>.

JESUS, Taíse Bomfim de; CARVALHO, Carlos Eduardo Veiga de. UTILIZAÇÃO DE BIOMARCADORES EM PEIXES COMO FERRAMENTA PARA AVALIAÇÃO DE

CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL POR MERCÚRIO (Hg). *Oecologia Australis*, v. 12, n. 04, p. 680-693, dez. 2008. *Oecologia Australis*. <http://dx.doi.org/10.4257/oeco.2008.1204.07>.

JIANG, Zhihua; ZHOU, Xiang; LI, Rui; MICHAL, Jennifer J.; ZHANG, Shuwen; DODSON, Michael V.; ZHANG, Zhiwu; HARLAND, Richard M.. Whole transcriptome analysis with sequencing: methods, challenges and potential solutions. *Cellular And Molecular Life Sciences*, v. 72, n. 18, p. 3425-3439, 28 maio 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-015-1934-y>.

Joaquim Olinto Branco e Luis Augusto Ebert. Estrutura populacional de *Larus dominicanus* Lichtenstein, 1823 no estuário do Saco da Fazenda, Itajaí, SC.. Disponível em <http://www.avesmarinhas.com.br/20.pdf> Acesso em 23 jan. 2024.

KADIM, Miftahul Khair; RISJANI, Yenny. Biomarker for monitoring heavy metal pollution in aquatic environment: an overview toward molecular perspectives. *Emerging Contaminants*, v. 8, p. 195-205, 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.emcon.2022.02.003>.

KANEHISA, M.. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Research*, v. 28, n. 1, p. 27-30, 1 jan. 2000. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/28.1.27>.

KARLGREN, Maria; GOMEZ, Alvin; STARK, Katarina; SVÄRD, Jenny; RODRIGUEZ-ANTONA, Cristina; OLIW, Ernst; BERNAL, Maria Luisa; CAJAL, Santiago Ramón y; JOHANSSON, Inger; INGELMAN-SUNDBERG, Magnus. Tumor-specific expression of the novel cytochrome P450 enzyme, CYP2W1. *Biochemical And Biophysical Research Communications*, v. 341, n. 2, p. 451-458, mar. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.12.200>.

KATZUNG, Bertram G.; TREVOR, Anthony J.. *Farmacologia Básica e Clínica*. 13. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 1216 p.

KAWAI, Yusuke K.; ITOU, Kiwamu; YOSHINO, Tomoo; IIMA, Hiroko; MATSUMOTO, Fumio; KUBOTA, Akira. Hepatic transcriptional profile and tissue distribution of cytochrome P450 1-3 genes in the red-crowned crane *Grus japonensis*. *Comparative Biochemistry And Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, [S.L.], v. 228, p. 108643, fev. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2019.108643>.

KELLY, E. J.; NAKANO, M.; ROHATGI, P.; YAROV-YAROVOY, V.; RETTIE, A. E.. Finding Homes for Orphan Cytochrome P450s: *cyp4v2* and *cyp4f22* in disease states. *Molecular Interventions*, v. 11, n. 2, p. 124-132, 1 abr. 2011. CLOCKSS Archive. <http://dx.doi.org/10.1124/mi.11.2.10>.

KIM, Hyo; KOEDRITH, Preeyaporn; SEO, Young. Ecotoxicogenomic Approaches for Understanding Molecular Mechanisms of Environmental Chemical Toxicity Using Aquatic Invertebrate, *Daphnia* Model Organism. *International Journal Of Molecular Sciences*, v. 16, n. 12, p. 12261-12287, 29 maio 2015. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms160612261>.

KLAASSEN, Curtis D.. Toxicology: The Basic Science of Poisons. 7. ed. Kansas City: The McGraw-Hill Companies, Inc., 2008. 1309 p.

KRAMER, Vincent J.; ETTERSON, Matthew A.; HECKER, Markus; MURPHY, Cheryl A.; ROESIADI, Guritno; SPADE, Daniel J.; SPROMBERG, Julann A.; WANG, Magnus; ANKLEY, Gerald T.. Adverse outcome pathways and ecological risk assessment: bridging to population level effects. *Environmental Toxicology And Chemistry*, v. 30, n. 1, p. 64-76, 24 nov. 2010. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/etc.375>.

KREITSBERG, Randel; NÄÄB, Lisanne; MEITERN, Richard; CARBILLET, Jeffrey; FORT, Jérôme; GIRAUDEAU, Mathieu; SEPP, Tuul. The effect of environmental pollution on gene expression of seabirds: a review. *Marine Environmental Research*, v. 189, p. 106067, jul. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2023.106067>.

KUBOTA, Akira; STEGEMAN, John J.; GOLDSTONE, Jared V.; NELSON, David R.; KIM, Eun-Young; TANABE, Shinsuke; IWATA, Hisato. Cytochrome P450 CYP2 genes in the common cormorant: evolutionary relationships with 130 diapsid cyp2 clan sequences and chemical effects on their expression. *Comparative Biochemistry And Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, [S.L.], v. 153, n. 3, p. 280-289, abr. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2010.11.006>.

KUMARI, Kanchan; KHARE, Ankur. Integration of Biomarker Approach in Pollution Monitoring Programme of Aquatic Ecosystem. *Biosynthetic Technology And Environmental Challenges*, p. 331-354, 1 dez. 2017. Springer Singapore. [http://dx.doi.org/10.1007/978-981-10-7434-9\\_18](http://dx.doi.org/10.1007/978-981-10-7434-9_18).

KUZNETSOV, Dmitry; TEGENFELDT, Fredrik; MANNI, Mosè; SEPPEY, Mathieu; BERKELEY, Matthew; KRIVENTSEVA, Evgenia V; ZDOBNOV, Evgeny M. OrthoDB v11: Annotation of orthologs in the widest sampling of organismal diversity. *Nucleic Acids Research*, v. 51, n. 1, p. 445-451, 9 nov. 2022. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkac998>.

LAHVIS, Gareth P.; PYZALSKI, Robert W.; GLOVER, Edward; PITOT, Henry C.; MCELWEE, Matthew K.; BRADFIELD, Christopher A.. The Aryl Hydrocarbon Receptor Is Required for Developmental Closure of the Ductus Venosus in the Neonatal Mouse. *Molecular Pharmacology*, v. 67, n. 3, p. 714-720, 8 dez. 2004. American Society for Pharmacology & Experimental Therapeutics (ASPET). <http://dx.doi.org/10.1124/mol.104.008888>.

LANGMEAD, Ben; SALZBERG, Steven L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods*, v. 9, n. 4, p. 357-359, 4 mar. 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.1923>.

LARIGOT, Lucie; JURICEK, Ludmila; DAIROU, Julien; COUMOUL, Xavier. AhR signaling pathways and regulatory functions. *Biochimie Open*, v. 7, p. 1-9, dez. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopen.2018.05.001>.

LEWIS CB, ADAMS N. Fenobarbital. [Atualizado em 17 jan 2022]. In: StatPearls [Internet]. Ilha do Tesouro (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532277/>.

LEWIS, D.F.V.; WATSON, E.; LAKE, B.G.. Evolution of the cytochrome P450 superfamily: sequence alignments and pharmacogenetics. *Mutation Research/Reviews In Mutation Research*, v. 410, n. 3, p. 245-270, jun. 1998. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1383-5742\(97\)00040-9](http://dx.doi.org/10.1016/s1383-5742(97)00040-9).

LI, Yong; LINDSAY, Julian; WANG, Lin-Lin; ZHOU, Shu-Feng. Structure, Function and Polymorphism of Human Cytosolic Sulfotransferases. *Current Drug Metabolism*, v. 9, n. 2, p. 99-105, 1 fev. 2008. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/138920008783571819>.

LIN, Jen-Tai; CHAN, Ti-Chun; LI, Chien-Feng; HUAN, Steven K.H.; TIAN, Yu-Feng; LIANG, Peir-In; PAN, Cheng-Tang; SHIUE, Yow-Ling. Downregulation of the cytochrome P450 4B1 protein confers a poor prognostic factor in patients with urothelial carcinomas of upper urinary tracts and urinary bladder. *Apmis*, v. 127, n. 4, p. 170-180, 25 mar. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/apm.12939>.

LIONETTO, M. G.; CARICATO, R.; GIORDANO, M. E.; SCHETTINO, T.. Biomarker application for the study of chemical contamination risk on marine organisms in the taranto marine coastal area. *Chemistry And Ecology*, v. 20, n. 1, p. 333-343, jun. 2004. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/02757540310001629215>.

LOCKHART, Catherine M; SMITH, Travis B; YANG, Paul; NAIDU, Malini; RETTIE, Allan e; NATH, Abhinav; WELEBER, Richard; KELLY, Edward J. Longitudinal characterisation of function and structure of Bietti crystalline dystrophy: report on a novel homozygous mutation in *cyp4v2*. *British Journal Of Ophthalmology*, v. 102, n. 2, p. 187-194, 11 jul. 2017. BMJ. <http://dx.doi.org/10.1136/bjophthalmol-2016-309696>.

LUCIA, Magali; BOCHER, Pierrick; COSSON, Richard P.; CHURLAUD, Carine; BUSTAMANTE, Paco. Evidence of species-specific detoxification processes for trace elements in shorebirds. *Ecotoxicology*, v. 21, n. 8, p. 2349-2362, 22 set. 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10646-012-0991-3>.

LUO, Weijun; BROUWER, Cory. Pathview: an r/bioconductor package for pathway-based data integration and visualization. *Bioinformatics*, v. 29, n. 14, p. 1830-1831, 4 jun. 2013. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btt285>.

MANIKANDAN, Palrasu; NAGINI, Siddavaram. Cytochrome P450 Structure, Function and Clinical Significance: a review. *Current Drug Targets*, v. 19, n. 1, p. 0, 5 jan. 2018. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/1389450118666170125144557>.

MARASCO, Valeria; FUSANI, Leonida; POLA, Gianni; SMITH, Steve. Data on the de novo transcriptome assembly for the migratory bird, the Common quail (*Coturnix coturnix*). *Data In Brief*, v. 32, p. 106041, out. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dib.2020.106041>.

MARTINS; DREIJ; COSTA. The State-of-the Art of Environmental Toxicogenomics: challenges and perspectives of .omics: approaches directed to toxicant mixtures. *International Journal Of Environmental Research And Public Health*, v. 16, n. 23, p. 4718, 26 nov. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijerph16234718>.

MEECH, Robyn; HU, Dong Gui; MCKINNON, Ross A.; MUBAROKAH, Siti Nurul; HAINES, Alex Z.; NAIR, Pramod C.; ROWLAND, Andrew; MACKENZIE, Peter I.. The UDP-Glycosyltransferase (UGT) Superfamily: new members, new functions, and novel paradigms. *Physiological Reviews*, v. 99, n. 2, p. 1153-1222, 1 abr. 2019. American Physiological Society. <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00058.2017>.

MEITERN, Richard; FORT, Jérôme; GIRAUDEAU, Mathieu; RATTISTE, Kalev; SILD, Elin; SEPP, Tuul. Age-dependent expression of cancer-related genes in a long-lived seabird. *Evolutionary Applications*, v. 13, n. 7, p. 1708-1718, 15 jun. 2020. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/eva.13024>.

MIGLANI, Rashi; PARVEEN, Nagma; KUMAR, Ankit; ANSARI, Mohd. Arif; KHANNA, Soumya; RAWAT, Gaurav; PANDA, Amrita Kumari; BISHT, Satpal Singh; UPADHYAY, Jyoti; ANSARI, Mohd Nazam. Degradation of Xenobiotic Pollutants: an environmentally sustainable approach. *Metabolites*, v. 12, n. 9, p. 818, 31 ago. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/metabo12090818>.

MIMURA, Junsei; YAMASHITA, Keisuke; NAKAMURA, Kenji; MORITA, Masanobu; TAKAGI, Toshio N.; NAKAO, Kazuki; EMA, Masatsugu; SOGAWA, Kazuhiro; YASUDA, Mineo; KATSUKI, Motoya. Loss of teratogenic response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in mice lacking the Ah (dioxin) receptor. *Genes To Cells*, v. 2, n. 10, p. 645-654, out. 1997. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2443.1997.1490345.x>.

MISTRY, Jaina; CHUGURANSKY, Sara; WILLIAMS, Lowri; QURESHI, Matloob; SALAZAR, Gustavo A; SONNHAMMER, Erik L L; TOSATTO, Silvio C e; PALADIN, Lisanna; RAJ, Shriya; RICHARDSON, Lorna J. Pfam: the protein families database in 2021. *Nucleic Acids Research*, v. 49, n. 1, p. 412-419, 30 out. 2020. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkaa913>.

MORÉ, Elisabet; AYATS, Teresa; RYAN, Peter G.; NAICKER, Preneshni R.; KEDDY, Karen H.; GAGLIO, Davide; WITTEVEEN, Minke; CERDÀ-CUÉLLAR, Marta. Seabirds (Laridae) as a source of *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. and antimicrobial resistance in South Africa. *Environmental Microbiology*, v. 19, n. 10, p. 4164-4176, 14 set. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/1462-2920.13874>.

MOREY, Jeanine S.; HUNTINGTON, Kathy A. Burek; CAMPBELL, Michelle; CLAUSS, Tonya M.; GOERTZ, Caroline E.; HOBBS, Roderick C.; LUNARDI, Denise; MOORS, Amanda J.; NEELY, Marion G.; SCHWACKE, Lori H.. De novo transcriptome assembly and RNA-Seq expression analysis in blood from beluga whales of Bristol Bay, AK. *Marine Genomics*, v. 35, p. 77-92, out. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.margen.2017.08.001>.

MUTZ, Kai-Oliver; HEILKENBRINKER, Alexandra; LÖNNE, Maren; WALTER, Johanna-Gabriela; STAHL, Frank. Transcriptome analysis using next-generation



sequencing. *Current Opinion In Biotechnology*, v. 24, n. 1, p. 22-30, fev. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2012.09.004>.

NAKANO, Mariko; KELLY, Edward J.; WIEK, Constanze; HANENBERG, Helmut; RETTIE, Allan E.. CYP4V2 in Bietti's Crystalline Dystrophy: ocular localization, metabolism of 2-3-polyunsaturated fatty acids, and functional deficit of the p.h331p variant. *Molecular Pharmacology*, v. 82, n. 4, p. 679-686, 6 jul. 2012. American Society for Pharmacology & Experimental Therapeutics (ASPET). <http://dx.doi.org/10.1124/mol.112.080085>.

NELSON, David L.; COX, Michael M.. *Lehninger principles of biochemistry*. 6. ed. New York: W.H.Freeman And Company, 2013. 1220 p.

NEBERT, Daniel W.; KARP, Christopher L.. Endogenous Functions of the Aryl Hydrocarbon Receptor (AHR): intersection of cytochrome p450 1 (cyp1)-metabolized eicosanoids and ahr biology. *Journal Of Biological Chemistry*, [S.L.], v. 283, n. 52, p. 36061-36065, dez. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.r800053200>.

NELSON, David R. Comparison of P450s from human and fugu: 420 million years of vertebrate p450 evolution. *Archives Of Biochemistry And Biophysics*, [S.L.], v. 409, n. 1, p. 18-24, jan. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0003-9861\(02\)00553-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0003-9861(02)00553-2).

NGUYEN, Linh P.; BRADFIELD, Christopher A.. The Search for Endogenous Activators of the Aryl Hydrocarbon Receptor. *Chemical Research In Toxicology*, v. 21, n. 1, p. 102-116, 13 dez. 2007. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/tx7001965>.

OLIVIER, Michael; ASMIS, Reto; HAWKINS, Gregory A.; HOWARD, Timothy D.; COX, Laura A.. The Need for Multi-Omics Biomarker Signatures in Precision Medicine. *International Journal Of Molecular Sciences*, v. 20, n. 19, p. 4781, 26 set. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms20194781>.

OLIVERO-VERBEL, Jesus; TAO, Lin; JOHNSON-RESTREPO, Boris; GUETTE-FERNÁNDEZ, Jorge; BALDIRIS-AVILA, Rosa; O'BYRNE-HOYOS, Indira; KANNAN, Kurunthachalam. Perfluorooctanesulfonate and related fluorochemicals in biological samples from the north coast of Colombia. *Environmental Pollution*, v. 142, n. 2, p. 367-372, jul. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2005.09.022>.

PAN, Yifan; CHANG, Jing; XU, Peng; XIE, Yun; YANG, Lu; HAO, Weiyu; LI, Jianzhong; WAN, Bin. Twenty-four hours of Thiamethoxam: in vivo and molecular dynamics simulation study on the toxicokinetic and underlying mechanisms in quails (*coturnix japonica*). *Journal Of Hazardous Materials*, v. 427, p. 128159, abr. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.128159>.

PASCUSSI, Jean-Marc; DROCOURT, Lionel; FABRE, Jean-Michel; MAUREL, Patrick; VILAREM, Marie-José. Dexamethasone Induces Pregnane X Receptor and Retinoid X Receptor- $\alpha$  Expression in Human Hepatocytes: synergistic increase of cyp3a4 induction by pregnane x receptor activators. *Molecular Pharmacology*, [S.L.], v. 58, n. 2, p. 361-372, 1 ago. 2000. American Society for Pharmacology & Experimental Therapeutics (ASPET). <http://dx.doi.org/10.1124/mol.58.2.361>.

PEARSON, William R.. An Introduction to Sequence Similarity (“Homology”) Searching. *Current Protocols In Bioinformatics*, v. 42, n. 1, p. 0, jun. 2013. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/0471250953.bi0301s42>.

PROVENCHER, Jennifer F.; BORRELLE, Stephanie; SHERLEY, Richard B.; AVERY-GOMM, Stephanie; HODUM, Peter; BOND, Alex; MAJOR, Heather L.; MCCOY, Karen D.; CRAWFORD, Rory; MERKEL, Flemming. Seabirds. *World Seas: An Environmental Evaluation*, p. 133-162, 2019. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-805052-1.00007-3>.

PHILLIPS, Ian R.; SHEPHARD, Elizabeth A.. Flavin-containing monooxygenases: new structures from old proteins. *Nature Structural & Molecular Biology*, v. 27, n. 1, p. 3-4, 23 dez. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41594-019-0356-1>.

PIAZZA, Clei E.; MATTOS, Jacó J.; BROCARDO, Giulia S.; BAINY, Afonso C.D.. Effects of 4-n-nonylphenol in liver of male and female viviparous fish (*Poecilia vivipara*). *Chemosphere*, v. 308, p. 136565, dez. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.136565>.

RAGHAVAN, Venket; KRAFT, Louis; MESNY, Fantin; RIGERTE, Linda. A simple guide to de novo transcriptome assembly and annotation. *Briefings In Bioinformatics*, v. 23, n. 2, p. 0-0, 24 jan. 2022. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/bib/bbab563>.

RANG, Humphrey R.; RITTER, James . M.; FLOWER, Rod . J.; HENDERSON, Graeme. *Rang & Dale Farmacologia*. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016. 784 p.

REGOLI, Francesco; GIULIANI, Maria Elisa; BENEDETTI, Maura; ARUKWE, Augustine. 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, p. 56-66, out. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.06.014>.

REINEN, J.; VERMEULEN, N.P.e.. Biotransformation of Endocrine Disrupting Compounds by Selected Phase I and Phase II Enzymes – Formation of Estrogenic and Chemically Reactive Metabolites by Cytochromes P450 and Sulfotransferases. *Current Medicinal Chemistry*, v. 22, n. 4, p. 500-527, 26 dez. 2014. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/0929867321666140916123022>.

RIGHETTI, B.P.H.; LIMA, D.; DIAS, V.H.V.; MATTOS, J.J.; PIAZZA, C.e.; VILAS-BOAS, L.O.B.; ALVES, T.C.; ALMEIDA, E.A.; LÜCHMANN, K.H.; BAINY, A.C.D.. Life after death? Exploring biochemical and molecular changes following organismal death in green turtles, *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758). *Chemosphere*, v. 308, p. 136569, dez. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.136569>.

RÖDER, Annika; HÜSKEN, Saskia; HUTTER, Michael C.; RETTIE, Allan E.; HANENBERG, Helmut; WIEK, Constanze; GIRHARD, Marco. *Spotlight on CYP4B1*.

International Journal Of Molecular Sciences, v. 24, n. 3, p. 2038, 20 jan. 2023. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms24032038>.

ROUGÉE, L. R. A.; RICHMOND, R. H.; COLLIER, A. C.. Natural variations in xenobiotic-metabolizing enzymes: developing tools for coral monitoring. **Coral Reefs**, v. 33, n. 2, p. 523-535, 13 mar. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00338-014-1136-3>.

ROURKE, J.L.; SINAL, C.J.. Biotransformation/Metabolism. Encyclopedia Of Toxicology, p. 490-502, 2014. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-386454-3.00007-5>.

RUSHMORE, Thomas H.; KONG, A.-N. Tony. Pharmacogenomics, Regulation and Signaling Pathways of Phase I and II Drug Metabolizing Enzymes. *Current Drug Metabolism*, v. 3, n. 5, p. 481-490, 1 out. 2002. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/1389200023337171>.

SANTOS, Carolina Rodrigues dos; ARCANJO, Gemima Santos; SANTOS, Lucilaine Valéria de Souza; KOCH, Konrad; AMARAL, Míriam Cristina Santos. Aquatic concentration and risk assessment of pharmaceutically active compounds in the environment. *Environmental Pollution*, v. 290, p. 118049, dez. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2021.118049>.

SHARIFIAN, Sana; HOMA EI, Ahmad; KAMRANI, Ehsan; ETZERODT, Thomas; PATEL, Seema. New insights on the marine cytochrome P450 enzymes and their biotechnological importance. *International Journal Of Biological Macromolecules*, [S.L.], v. 142, p. 811-821, jan. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.10.022>.

SERAFINI, Patricia P.; RIGHETTI, Bárbara P.H.; VANSTREELS, Ralph E.T.; BUGONI, Leandro; PIAZZA, Clei E.; LIMA, Daina; MATTOS, Jacó J.; KOLESNIKOVAS, Cristiane K.M.; PEREIRA, Alice; MARASCHIN, Marcelo. Biochemical and molecular biomarkers and their association with anthropogenic chemicals in wintering Manx shearwaters (*Puffinus puffinus*). *Marine Pollution Bulletin*, [S.L.], v. 203, p. 116398, jun. 2024. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2024.116398>.

Schoch CL, et al., Taxonomia NCBI: uma atualização abrangente sobre curadoria, recursos e ferramentas. Banco de dados (Oxford). 2020: BAAA062. PubMed: 32761142 PMC: PMC7408187.

SEPPEY, Mathieu; MANNI, Mosè; ZDOBNOV, Evgeny M.. BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness. *Methods In Molecular Biology*, p. 227-245, 2019. Springer New York. [http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-9173-0\\_14](http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-9173-0_14).

SHARIN, Tasnia; WILLIAMS, Kim L.; CHIU, Suzanne; CRUMP, Doug; O'BRIEN, Jason M.. Toxicity Screening of Bisphenol A Replacement Compounds: cytotoxicity and mrna expression in primary hepatocytes of chicken and double crested cormorant. *Environmental Toxicology And Chemistry*, v. 40, n. 5, p. 1368-1378, 23 mar. 2021. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/etc.4985>.

SICK, H. 1997. Ornitologia Brasileira. Editora Nova Fronteira, Rio de Janeiro. 912p.

SIMÃO, Felipe A.; WATERHOUSE, Robert M.; IOANNIDIS, Panagiotis; KRIVENTSEVA, Evgenia V.; ZDOBNOV, Evgeny M.. BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. *Bioinformatics*, v. 31, n. 19, p. 3210-3212, 9 jun. 2015. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btv351>.

SNAPE, Jason R.; MAUND, Steve J.; PICKFORD, Daniel B.; HUTCHINSON, Thomas H.. Ecotoxicogenomics: the challenge of integrating genomics into aquatic and terrestrial ecotoxicology. *Aquatic Toxicology*, v. 67, n. 2, p. 143-154, abr. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2003.11.011>.

SOARES, Emerson Carlos; BISPO, Mozart Daltro; VASCONCELOS, Vivian Costa; SOLETTI, João Inácio; CARVALHO, Sandra Helena Vieira; OLIVEIRA, Maria Janaína de; SANTOS, Mayara Costa dos; FREIRE, Emerson dos Santos; NOGUEIRA, Aryanna Sany Pinto; CUNHA, Francisco Antônio da Silva. Oil impact on the environment and aquatic organisms on the coasts of the states of Alagoas and Sergipe, Brazil - A preliminary evaluation. *Marine Pollution Bulletin*, v. 171, p. 112723, out. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.112723>.

SOGORB, Miguel A.; ESTÉVEZ, Jorge; VILANOVA, Eugenio. Biomarkers in biomonitoring of xenobiotics. *Biomarkers In Toxicology*, p. 965-973, 2014. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-404630-6.00057-9>.

STARK, Katarina; WU, Zhong-Liu; BARTLESON, Cheryl J.; GUENGERICH, F. Peter. MRNA Distribution and Heterologous Expression of Orphan Cytochrome P450 20A1. *Drug Metabolism And Disposition*, v. 36, n. 9, p. 1930-1937, 9 jun. 2008. American Society for Pharmacology & Experimental Therapeutics (ASPET). <http://dx.doi.org/10.1124/dmd.108.022020>.

STEINBERG, Christian E.W.; STÜRZENBAUM, Stephen R.; MENZEL, Ralph. Genes and environment — Striking the fine balance between sophisticated biomonitoring and true functional environmental genomics. *Science Of The Total Environment*, v. 400, n. 1-3, p. 142-161, ago. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.07.023>.

STOLER, Nicholas; NEKRUTENKO, Anton. Sequencing error profiles of Illumina sequencing instruments. *Nar Genomics And Bioinformatics*, v. 3, n. 1, p. 0-0, 6 jan. 2021. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nargab/lqab019>.

SU, Yunyou; CHEN, Lifeng; BANDY, Brian; YANG, Jian. The Catalytic Product of Pentachlorophenol 4-Monooxygenase is Tetrachlorohydroquinone rather than Tetrachlorobenzoquinone. *The Open Microbiology Journal*, v. 2, n. 1, p. 100-106, 26 set. 2008. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/1874285800802010100>.

TAKAHASHI, Saki; SAKAKIBARA, Yoichi; MISHIRO, Emi; KOURIKI, Haruna; NOBE, Rika; KUROGI, Katsuhisa; YASUDA, Shin; LIU, Ming-Cheh; SUIKO,

Masahito. Molecular cloning, expression, and characterization of mouse amine N-sulfotransferases. *Biochemical And Biophysical Research Communications*, v. 375, n. 4, p. 531-535, out. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.08.051>.

TANIYASU, Sachi; KANNAN, Kurunthachalam; HORII, Yuichi; HANARI, Nobuyasu; YAMASHITA, Nobuyoshi. A Survey of Perfluorooctane Sulfonate and Related Perfluorinated Organic Compounds in Water, Fish, Birds, and Humans from Japan. *Environmental Science & Technology*, v. 37, n. 12, p. 2634-2639, 14 maio 2003. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/es0303440>.

VOTIER, Stephen C.; HATCHWELL, Ben J.; BECKERMAN, Andrew; MCCLEERY, Robin H.; HUNTER, Fiona M.; PELLATT, Jayne; TRINDER, Mark; BIRKHEAD, Tim R.. Oil pollution and climate have wide-scale impacts on seabird demographics. *Ecology Letters*, v. 8, n. 11, p. 1157-1164, 22 set. 2005. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1461-0248.2005.00818.x>

WANG, Kevin C.; CHANG, Howard Y.. Epigenomics. *Circulation Research*, v. 122, n. 9, p. 1191-1199, 27 abr. 2018. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1161/circresaha.118.310998>.

WATERHOUSE, Robert M; SEPPEY, Mathieu; A SIMÃO, Felipe; MANNI, Mosè; IOANNIDIS, Panagiotis; KLIOUTCHNIKOV, Guennadi; KRIVENTSEVA, Evgenia V; ZDOBNOV, Evgeny M. BUSCO Applications from Quality Assessments to Gene Prediction and Phylogenomics. *Molecular Biology And Evolution*, v. 35, n. 3, p. 543-548, 6 dez. 2017. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msx319>.

WATSON, Hannah; VIDEVALL, Elin; ANDERSSON, Martin N.; ISAKSSON, Caroline. Transcriptome analysis of a wild bird reveals physiological responses to the urban environment. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p. 0-0, 14 mar. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/srep44180>.

WU, Tianzhi; HU, Erqiang; XU, Shuangbin; CHEN, Meijun; GUO, Pingfan; DAI, Zehan; FENG, Tingze; ZHOU, Lang; TANG, Wenli; ZHAN, Li. ClusterProfiler 4.0: a universal enrichment tool for interpreting omics data. *The Innovation*, v. 2, n. 3, p. 100141, ago. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.xinn.2021.100141>.

WU, Zhong-Liu; SOHL, Christal D.; SHIMADA, Tsutomu; GUENGERICH, F. Peter. Recombinant Enzymes Overexpressed in Bacteria Show Broad Catalytic Specificity of Human Cytochrome P450 2W1 and Limited Activity of Human Cytochrome P450 2S1. *Molecular Pharmacology*, v. 69, n. 6, p. 2007-2014, 21 mar. 2006. American Society for Pharmacology & Experimental Therapeutics (ASPET). <http://dx.doi.org/10.1124/mol.106.023648>.

WYDE, Michael E.; BARTOLUCCI, Erika; UEDA, Akiko; ZHANG, He; YAN, Binfang; NEGISHI, Masahiko; YOU, Li. The Environmental Pollutant 1,1-Dichloro-2,2-bis (p-chlorophenyl)ethylene Induces Rat Hepatic Cytochrome P450 2B and 3A Expression through the Constitutive Androstane Receptor and Pregnane X Receptor. *Molecular Pharmacology*, [S.L.], v. 64, n. 2, p. 474-481, 17 jul. 2003. American Society

for Pharmacology & Experimental Therapeutics (ASPET).  
<http://dx.doi.org/10.1124/mol.64.2.474>.

XIA, Pu; CRUMP, Doug; CHIU, Suzanne; CHAN, Hing Man; O'BRIEN, Jason M.. Toxicogenomic Assessment of Complex Chemical Signatures in Double-Crested Cormorant Embryos from Variably Contaminated Great Lakes Sites. *Environmental Science & Technology*, [S.L.], v. 54, n. 12, p. 7504-7512, 27 maio 2020. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.est.0c02725>.

XIE, Yang; XIE, Wen. The Role of Sulfotransferases in Liver Diseases. *Drug Metabolism And Disposition*, v. 48, n. 9, p. 742-749, 25 jun. 2020. American Society for Pharmacology & Experimental Therapeutics (ASPET).  
<http://dx.doi.org/10.1124/dmd.120.000074>.

YANG, Jiannan; AN, Junfeng; LI, Mei; HOU, Xin; QIU, Xinghui. Characterization of chicken cytochrome P450 1A4 and 1A5: inter-paralog comparisons of substrate preference and inhibitor selectivity. *Comparative Biochemistry And Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, v. 157, n. 4, p. 337-343, maio 2013. Elsevier BV.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2013.02.005>.

YASUKOCHI, Yoshiki; SATTA, Yoko. Evolution of the CYP2D gene cluster in humans and four non-human primates. *Genes & Genetic Systems*, [S.L.], v. 86, n. 2, p. 109-116, 2011. Genetics Society of Japan. <http://dx.doi.org/10.1266/ggs.86.109>.

ZANGER, Ulrich M.; SCHWAB, Matthias. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacology & Therapeutics*, [S.L.], v. 138, n. 1, p. 103-141, abr. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.12.007>.

ZDOBNOV, Evgeny M; KUZNETSOV, Dmitry; TEGENFELDT, Fredrik; MANNI, Mosè; BERKELEY, Matthew; KRIVENTSEVA, Evgenia V. OrthoDB in 2020: evolutionary and functional annotations of orthologs. *Nucleic Acids Research*, v. 49, n. 1, p. 389-393, 16 nov. 2020. Oxford University Press (OUP).  
<http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkaa1009>.

ZHANG, Jie; GREK, Christina; YE, Zhi-Wei; MANEVICH, Yefim; TEW, Kenneth D.; TOWNSEND, Danyelle M.. Pleiotropic Functions of Glutathione S-Transferase P. *Advances In Cancer Research*, p. 143-175, 2014. Elsevier.  
<http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-420117-0.00004-9>.

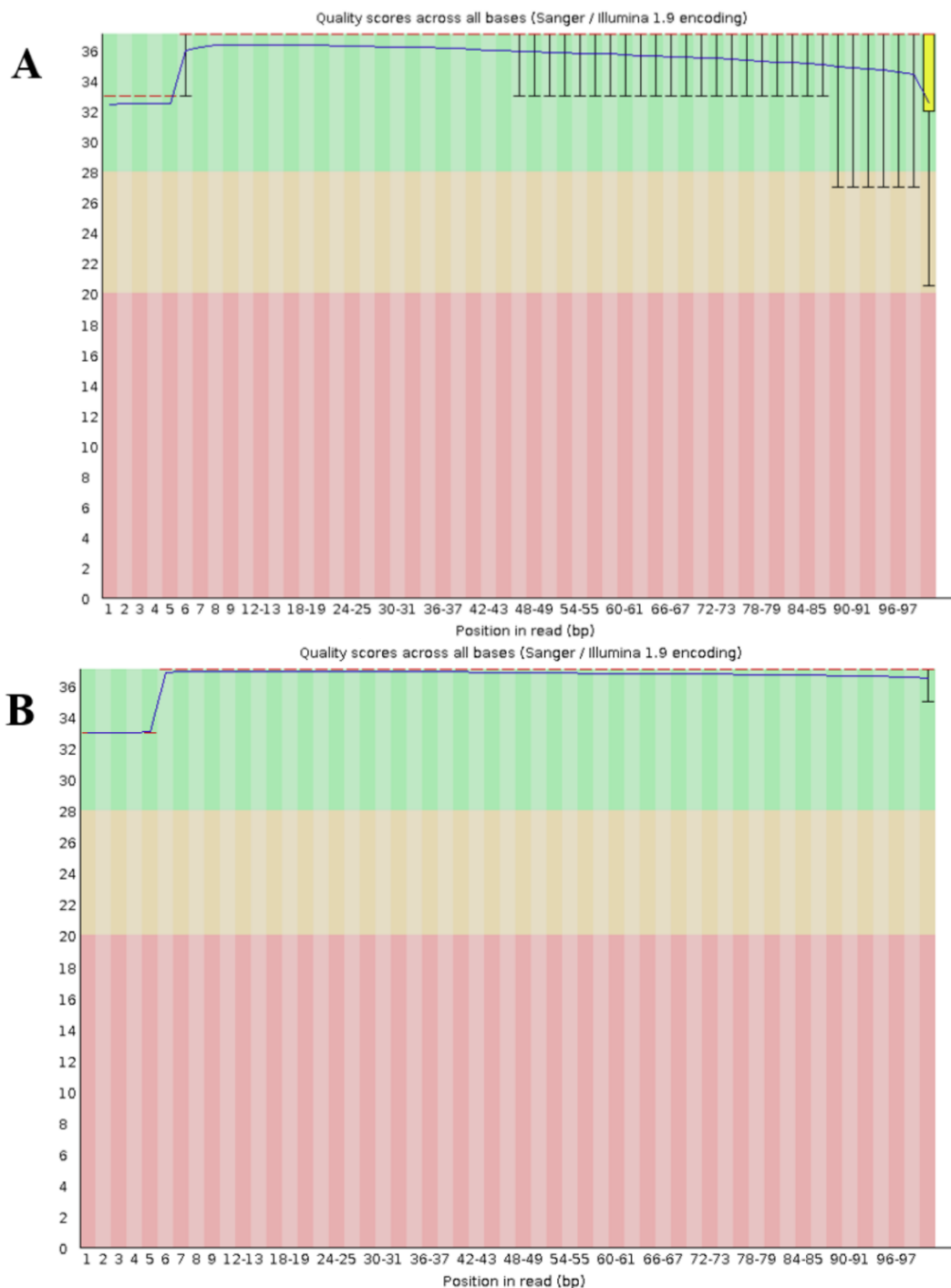
ZHANG, Xiaowei; XIA, Pu; WANG, Pingping; YANG, Jianghu; BAIRD, Donald J.. Omics Advances in Ecotoxicology. *Environmental Science & Technology*, v. 52, n. 7, p. 3842-3851, 26 fev. 2018. American Chemical Society (ACS).  
<http://dx.doi.org/10.1021/acs.est.7b06494>.

ZHAO, Mingzhe; MA, Jingsong; LI, Mo; ZHANG, Yingtian; JIANG, Bixuan; ZHAO, Xianglong; HUAI, Cong; SHEN, Lu; ZHANG, Na; HE, Lin. Cytochrome P450 Enzymes and Drug Metabolism in Humans. *International Journal Of Molecular Sciences*, v. 22, n. 23, p. 12808, 26 nov. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms222312808>.

ZYDELIS, Ramūnas; BELLEBAUM, Jochen; ÖSTERBLOM, Henrik; VETEMAA, Markus; SCHIRMEISTER, Bernd; STIPNIECE, Antra; DAGYS, Mindaugas; VAN EERDEN, Mennobart; GARTHE, Stefan. Bycatch in gillnet fisheries – An overlooked threat to waterbird populations. *Biological Conservation*, v. 142, n. 7, p. 1269-1281, jul. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocon.2009.02.025>.

## APÊNDICE A – ANÁLISE DE QUALIDADE DOS *READS* PRÉ E PÓS REMOÇÃO DE BASES DE BAIXA QUALIDADE

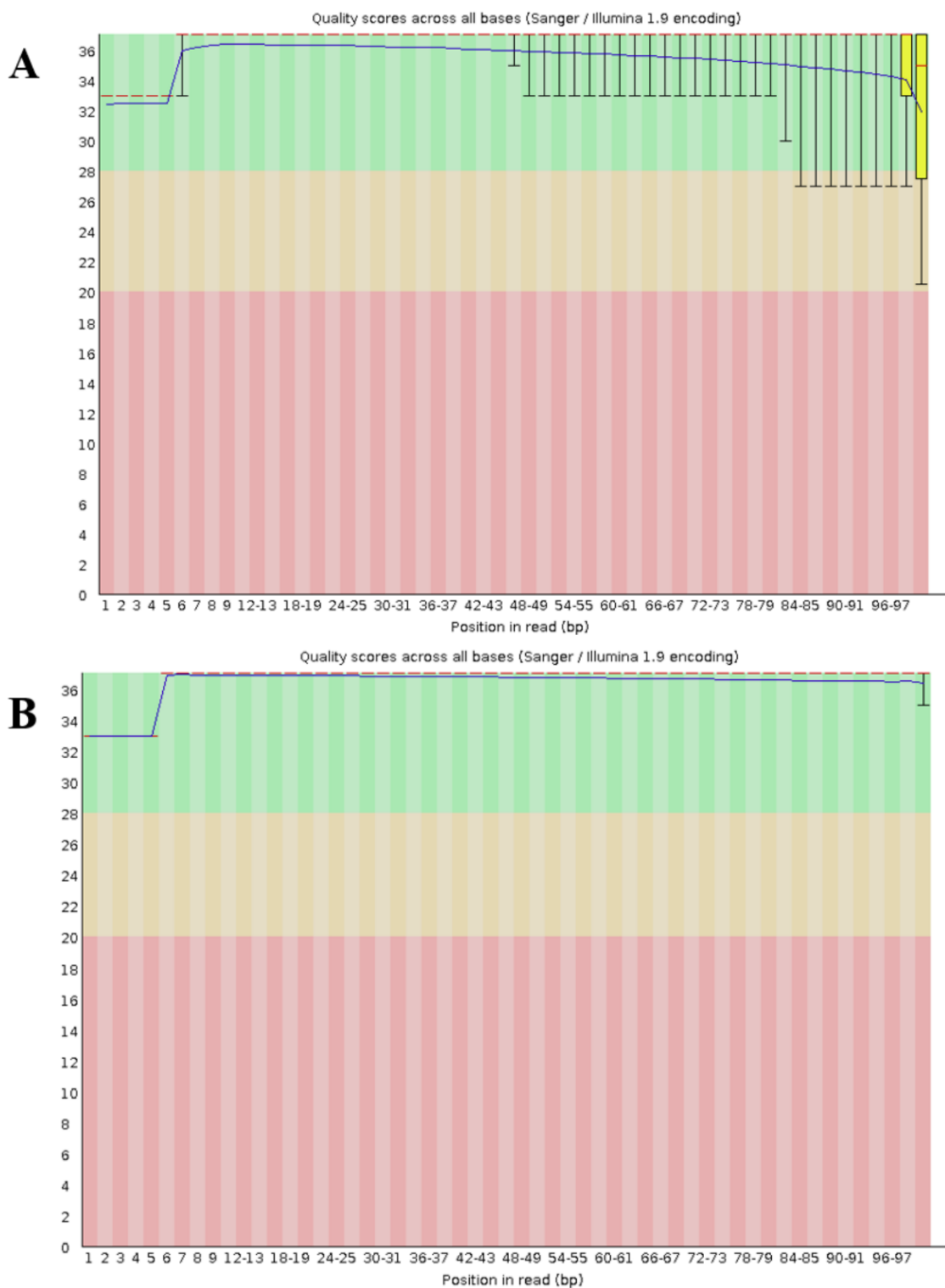
**Figura 15.** Qualidade por bases de *reads* brutos (A) e *reads* limpos (B) calculadas pelo FastQC para os dados de *L. dominicanus*.



Legenda: O gráfico A apresenta a qualidade das bases dos *reads* brutos, das quais possuem nota *phred* <30, indicativo de pouca qualidade, representado também pela coloração em amarelo. No gráfico B, após a limpeza dos dados, os *reads* apresentaram noma *phred* >30, indicativo de boa qualidade das leituras. A região em verde evidencia a boa qualidade das bases. Adaptador de Amorim, 2021.



**Figura 16.** Qualidade por bases de *reads* brutos (A) e *reads* limpos (B) calculadas pelo FastQC para os dados de *P. puffinus*.



Legenda: O gráfico A apresenta a qualidade das bases dos *reads* brutos, das quais possuem nota *phred* < 30, indicativo de pouca qualidade, representado também pela coloração em amarelo. No gráfico B, após a limpeza dos dados, os *reads* apresentaram noma *phred* > 30, indicativo de boa qualidade das leituras. A região em verde evidencia a boa qualidade das bases. Adaptador de Amorim, 2021.