

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

Christielly Rodrigues da Silva

**EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE CITOCROMO P450 356A1 DE
Crassostrea gigas E UTILIZAÇÃO PARA
BIOMONITORAMENTO AMBIENTAL**

Florianópolis

2010

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

Christielly Rodrigues da Silva

**EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE CITOCROMO P450 356A1 DE
Crassostrea gigas E UTILIZAÇÃO PARA
BIOMONITORAMENTO AMBIENTAL**

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

Orientador: Prof. Dr. Afonso Celso Dias Bainy

Florianópolis

2010

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

S586e Silva, Christielly Rodrigues da
Expressão heteróloga de citocromo P450 356A1 de *Crassostrea*
gigas e utilização para biomonitoramento ambiental
[dissertação] / Christielly Rodrigues da Silva ; orientador,
Afonso Celso Dias Bainy. - Florianópolis, SC, 2010.
76 p.: il.

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

Inclui referências

1. Biotecnologia. 2. *Crassostrea gigas*. 3. Citocromo.
4. Esgotos. 5. Anticorpos. 6. Qualidade ambiental - Avaliação.
I. Bainy, Afonso Celso Dias. II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. III.
Título.

CDU 577.23

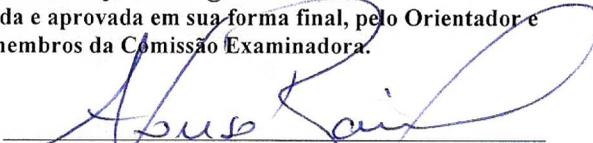
“Expressão heteróloga de citocromo P450 356A1 de *Crassostrea gigas* e utilização para biomonitoramento ambiental”

POR

Christielly Rodrigues da Silva

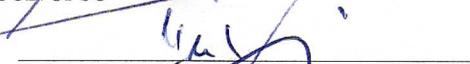
Dissertação julgada e aprovada em sua forma final, pelo Orientador e membros da Comissão Examinadora.

Orientador:

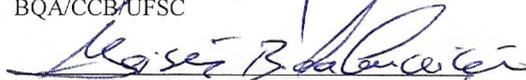


Prof. Dr. Afonso Celso Dias Bainy
BQA/CCB/UFSC

Comissão Examinadora:



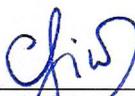
Prof. Dr. Hernán Francisco Terenzi
BQA/CCB/UFSC



Prof. Dr. Moisés Basílio da Conceição
UNIVALI



Prof. Dr. Célia Regina Monte Barardi
MIP/CCB/UFSC



Prof. Dr. Cláudia Maria Oliveira Simões – CIF/CCS/UFSC
Coordenadora do Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia/CCB/UFSC
Florianópolis, Dezembro de 2010.

Dedico este trabalho a minha família e aos amigos que me apoiaram e estiveram comigo durante minha trajetória. Por uma educação mais justa, realmente igualitária, qualitativa e verdadeiramente inclusiva.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter me dado força, perseverança e coragem para superar todos os obstáculos e dificuldades encontrados neste trabalho. À minha família, por ter me apoiado e me ajudado durante todos os momentos. Aos meus amigos e às pessoas que me acompanharam durante todo o mestrado, me motivando e ajudando no que fosse possível.

Agradeço imensamente ao meu orientador pelo comprometimento, por acreditar no meu trabalho e pelo esforço em solucionar todos os problemas e dificuldades encontrados.

Gostaria ainda de agradecer ao Prof. Dr. Hernán Terenzi, pelo auxílio em várias etapas da realização deste projeto. Ao Prof. Dr. Carlos Zanetti, que aceitou realizar a produção dos anticorpos policlonais, juntamente com Camila Zanluca, minha colega de mestrado e excelente profissional. Agradeço, ainda, ao grupo do Prof. Alcir Dafré, o qual é nosso colaborador em diversos trabalhos.

Meus sinceros agradecimentos ao pessoal da CASAN, por ceder o esgoto não tratado necessário à realização de vários experimentos.

Ao pessoal do LMM, por me conceder os animais utilizados neste trabalho, mesmo debaixo de chuva e vento sul, bem como as microalgas utilizadas na alimentação das ostras.

Gostaria de deixar um agradecimento especial ao pessoal do NEPAq, onde fiz vários amigos e colaboradores.

E, com grande saudades, a todos os colegas do LABCAI, aqueles que estiveram comigo desde o começo, e também os que conheci na etapa de transição entre meu mestrado e meu emprego em Goiânia.

À Profa. Dra. Maria Risoleta Marques, por tuas dicas e conselhos em várias etapas de minha fase experimental.

Gostaria de destacar a importância que Naissa Danielli e Daniela Gonçalves tiveram durante toda minha história dentro do LABCAI. Minhas amigas, irmãs, companheiras pra todos os momentos. Tatiana Milani e Carol Brocardo, grandes amigas que me acompanharam durante o mestrado, pelas quais tenho um enorme carinho e amizade.

E claro, não poderia deixar de mencionar: Juliana Moser, Isabel Müller, Fabricio Nunes, Igor Medeiros, Guilherme Silva, Beatriz, Marília Siebert, Jacó Mattos, Karin Luchmann, Juliano Zanete, Tálita, Maya Baggio, Clei, Elisa, Thaís, Ana Paula, pessoas que contribuíram imensamente para este trabalho. Todos os outros colegas de LABCAI, mencionados e não mencionados, os quais com certeza me ajudaram muito, dando uma dica em um momento crucial, ajudando nas situações de aperto.

Gostaria de agradecer, ainda, minhas amigas Lorena Cintra e Jacqueline Alonso, que sempre estiveram comigo. E as companheiras de casa, Karine, Camille, Cristiane, Raphaella, Camila, Aline, Celeste, Iva, Mariana, e com um carinho especial, Nanda e Márcia, que se tornaram peças fundamentais nos últimos dias do meu mestrado. Duas pessoas incríveis, centradas, que me deram muito suporte em muitas ocasiões em que uma palavra dita na hora certa fazia toda diferença.

E, claro, não poderia esquecer, agradeço às irmãs catequistas franciscanas, Ir. Ema, Hilária, Terezinha, Fátima e Raquel, grandes amigas, sempre muito acolhedoras e queridas, das quais sinto e sentirei muitas saudades.

“Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível, e de repente você estará fazendo o impossível”

(Giovanni di Pietro di Bernardone)

RESUMO

A ecotoxicologia é um dos ramos da ciência que cada vez mais ganha relevância internacional por ter como objeto de estudo intoxicação ambiental em todas as suas nuances e consequências. A utilização de biomarcadores moleculares se destaca como uma das principais ferramentas ecotoxicológicas, por serem extremamente sensíveis e anteciparem efeitos gerados pela poluição. A ostra do Pacífico, *Crassostrea gigas*, é um invertebrado marinho que habita os ecossistemas costeiros (estuários), onde se encontra alta densidade demográfica e alta contaminação por efluentes domésticos. Esse bivalve representa um bioindicador de poluição ao responder à presença de xenobióticos pela variação de diversos biomarcadores. Um destes parâmetros são as enzimas citocromo P450 (P450), as quais podem participar tanto da via de biotransformação quanto na desregulação endócrina. Recentemente, foi identificada em *C. gigas* uma isoforma de P450, CYP356A1, grandemente induzida por esgoto doméstico não tratado. A sequência codificante para este gene foi determinada e clonada, e neste trabalho, utilizada para realização de expressão heteróloga, visando a produção de anticorpos policlonais. Estes seriam importantes no desenvolvimento de uma nova estratégia de avaliação de contaminação ambiental e contribuiriam para investigação da provável função biológica de CgCYP356A1, através de detecção imunológica. Imunodeteção é proposta como alternativa para estudos de proteínas com função desconhecida. Ensaio imunológico com anticorpo anti-CgCYP356A1 mostraram um padrão com banda única, sem ocorrência de reações inespecíficas, corroborando a idéia de que esta metodologia poderá permitir avanços em estudos ecotoxicológicos com *C. gigas* e na caracterização bioquímica de CgCYP356A1. Nas análises de contaminação ambiental por imunodeteção, glândula digestiva teve uma quantidade de proteína significativamente maior depois de prolongada exposição *in situ* de *C. gigas* ao esgoto. O RNAm de CYP356A1 também foi avaliado, visando remontar o que poderia estar ocorrendo na célula, no que diz respeito a expressão desse gene, em resposta a xenobióticos, mas os resultados não foram muito conclusivos. Contudo, o método de análise aqui apresentado ampliam as perspectivas de estudo referentes a novos genes P450 identificados, especialmente CgCYP356A1, bem como o estabelecimento de novos biomarcadores.

Palavras-chave: *Crassostrea gigas*, citocromo P450 356A1, esgoto doméstico, anticorpo, biomonitoramento.

ABSTRACT

Ecotoxicology is a branch of science that has gained more international relevance by having as its object of study environmental intoxication in all its nuances and consequences. The use of molecular biomarkers has been highlighted as a major ecotoxicological tool, being an extremely sensitive method and anticipates effects caused by pollution. The Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, is a marine invertebrate that inhabits the coastal ecosystems (estuaries), where there is high population density and high contamination by domestic effluent. This bivalve represents a bioindicator of pollution at responds to the presence of xenobiotics by the variation of several biomarkers. One of these parameters is the cytochrome P450 (P450), which may participate both the route of biotransformation and endocrine disruption. Recently, it was identified in *C. gigas* an isoforme of P450, CYP356A1, largely induced by untreated sewage. The coding sequence for this gene was determined and cloned, and in this work, it was used to perform heterologous expression, aimed production of polyclonal antibodies. They will be important to development of a new strategy for assessing environmental contamination and will contribute to investigate probable biological function of *CgCYP356A1*, through immunological detection. Immunodetection is propose as alternative to protein studies with unknow function. Immunochemistry assays with antibody anti-*CgCYP356A1* showed a unique band pattern, without occurrence of unspecific, corroborated idea that this methodology will can permit advances in ecotoxicology studies evolved *C. gigas* and in the biochemistry characterization of *CgCYP356A1*. In environmental contamination analysis by immunodetection, digestive gland had a quantify of protein increased significantly after prolonged *in situ* exposition of *C. gigas* to the sewage. CYP356A1 mRNA was still evaluate, aimed ascending what will may be happened inside cell, about this gene expression, in response at xenobióticos, but results were not much conclusive. Although, the analysis method here presented extends the study perspectives regarding new P450 genes identified, specially *CgCYP356A1*, well as the establishment of new biomarkers.

Keywords: *Crassostrea gigas*, cytochrome P450 356A1, domestic sewage, antibody, biomonitoring.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Número de pessoas sem acesso à rede coletora de esgoto, segundo as Grandes Regiões do Brasil. 20
- Figura 2 – Percentual de municípios com tratamento de esgoto, em ordem decrescente, segundo as Unidades de Federação – 2008..... 21
- Figura 3 – Produção mundial de *Crassostrea gigas* 24
- Figura 4 – Localização dos pontos de exposição das ostras *Crassostrea gigas*. Estação de cultivo do Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) (Sambaqui, Floiranoópolis, SC) (tempo 0) (1), ponto contaminado (foz do Rio Bücheler, São José, SC) (2) referência (Ribeirão da Ilha, Florianópolis, SC) (3)..... 41
- Figura 5 – Nucleotídeos e sequência deduzida de aminoácidos de CgCYP356A1. A ORF (*Open Reading Frame*) é mostrada em letras maiúsculas, enquanto que as regiões não-codificantes estão em letras minúsculas. A proteína predita codificada é dada pelo código de uma letra acima do segundo nucleotídeo de cada códon. Setas representam os primers usados e a amplificação do cDNA de CgCYP356A1. A numeração para os aminoácidos começa na metionina codificada pelo primeiro códon de iniciação e termina no primeiro códon de terminação. A região de ancoramento na membrana de CgCYP356A1 é mostrada em caixa. (*) indicam os sítios de fosforilação e (♦) sítios de N-glicosilação. 47
- Figura 6 – Eletroforese em gel de agarose 1% indicando o produto de amplificação do cDNA de CYP356A1.. 49
- Figura 7 – Alinhamento de sequências de aminoácidos de citocromo P450 de *C. gigas* CYP356A1 (ABR45717.1), *Saccoglossus kowalevskii* CYP17A-like (XP_002730850.1), *Danio rerio* CYP1A (BAB90841.1), *D. rerio* CYP17A1 (AAI62669.1), *Homo sapiens* CYP1A1 (NP_000490.1), *H. sapiens* CYP17A1 (NP_000093.1), *Nematostella vectensis* CYP17A-like (XP_001640254.1) e *Strongylocentrotus purpuratus* CYP17A-like (XP_001182935.1). Regiões conservadas na estrutura primária estão em negrito e sombreadas, hélices C, K, I e regiões de ligação ao grupamento

heme. Os asteriscos (*) indicam os aminoácidos conservados e os pontos (.) e dois pontos (:) indicam uma ordem crescente de similaridade, respectivamente.	52
Figura 8 – Mapa do vetor de expressão pET-14b.....	55
Figura 9 – Eletroforese em SDS-PAGE 10% da purificação de extratos protéicos de <i>E. coli</i> transformada com o gene codificante para CgCYP356A1 por cromatografia com resina de níquel (HisTrap™ HP). Linha 1: Extrato de <i>E. coli</i> abrigando CgCYP356A1 antes da adição de IPTG. Linha 2: Extrato de <i>E. coli</i> contendo CgCYP356A1 após indução com 0,4 mM de IPTG; Linha 3: Fração líquida referente ao segundo patamar de concentração de imidazol (60 mM); Linha 4: Fração líquida correspondente ao gradiente de concentração de imidazol de 60-500 mM; Linha 5: Fração líquida correspondente às proteínas que não se ligaram a resina da coluna; Linha 6: Fração líquida contendo as proteínas eluídas no primeiro patamar de concentração de imidazol (10 mM).....	57
Figura 10 – Ensaio de <i>Dot blot</i> referente à padronização da titulação do soro contendo os anticorpos policlonais anti-CgCYP356A1. Soro positivo representa um “pool” de sangue coletado dos três animais imunizados. Soro negativo é o soro obtido a partir de um animal não-imunizado. A diluição da proteína recombinante CgCYP356A1 é mostrada no lado esquerdo da figura. Linha 1 e 5: Anticorpo primário diluído de 1:10.000 e anticorpo conjugado de 1:3.000; Linha 2 e 6: Anticorpo primário na diluição de 1:15.000 e conjugado de 1:3.000; Linha 3 e 7: Diluição do anticorpo primário de 1:10.000 e título do anticorpo conjugado foi 1:6.000; Linha 4 e 8: Anticorpo primário diluído de 1:15.000 e anticorpo conjugado na diluição de 1:6.000.....	59
Figura 11 – Expressão recombinante de CgCYP356A1 em <i>E. coli</i> . Linha 1: Eletroforese em SDS-PAGE 10% mostrando extrato de <i>E. coli</i> abrigando CgCYP356A1 antes da adição de IPTG. Linha 2: Eletroforese em SDS-PAGE 10% mostrando extrato de <i>E. coli</i> contendo CgCYP356A1 após indução com 0,4mM de IPTG; Linha 3: Eletroforese em SDS-PAGE 10% mostrando CgCYP356A1 recombinante purificada por HPLC usando a coluna HP HisTrap™; Linha 4: <i>Western blotting</i> da proteína CgCYP356A1 purificada por HPLC com utilização de	

coluna HP HisTrap™; Linha 5: *Western blotting* de extratos da fração microssomal de brânquias de *C.gigas*..... 60

Figura 12 – Análises densitométricas de experimentos de imunodeteção após exposição *in situ* de *C. gigas* ao esgoto doméstico. Os resultados estão em densidade integrada, e as amostras utilizadas foram fração microssomal de brânquias. T0 representa animais avaliados antes da exposição; R 24h indica os resultados obtidos do local referência 24 horas após a exposição; P 24h representa os dados encontrados de animais do ponto poluído 24 horas após a exposição; R 14d mostra amostras analisadas a partir local referência 14 dias após a exposição; P 14d indica os resultados do ponto poluído 14 dias após a exposição. As barras representam média ± desvio padrão, e * indica diferenças significativamente estatísticas (p<0,05)..... 62

Figura 13 – Análises densitométricas de experimentos de imunodeteção após exposição *in situ* de *C. gigas* ao esgoto doméstico. Os resultados estão em densidade integrada, e as amostras utilizadas foram fração microssomal de glândula digestiva. T0 representa animais avaliados antes da exposição; R 24h indica os resultados obtidos do local referência 24 horas após a exposição; P 24h representa os dados encontrados de animais do ponto poluído 24 horas após a exposição; R 14d mostra amostras analisadas a partir local referência 14 dias após a exposição; P 14d indica os resultados do ponto poluído 14 dias após a exposição. As barras representam média ± desvio padrão, e * indica diferenças significativamente estatísticas (p<0,05)..... 63

Figura 14 – Transcrição de CYP356A1 em glândula digestiva de *C. gigas* mantida por 24 horas e 14 dias no local referência (barras claras) ou poluído (barras escuras). RT-PCR real-time (Reação de Polimerase em cadeia associada a transcrição reversa) foi desenvolvida com 100 ng de cDNA. O RNA total foi isolado de tecidos após 24 horas ou 14 dias, e então transcrito reversamente em cDNA. O gráfico mostra a expressão de CYP356A1 em relação ao controle (fold induction). Os dados foram normalizado por β -actina. Os valores representam média (± desvio padrão) de 6 animais. *

$p < 0,05$ – diferenças significativas do grupo do sítio referência
com teste *t* Student.....65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACT	Actina
cDNA	DNA complementar
CgCYP356A1	Proteína CYP356A1
Ct	Limiar do ciclo
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CYP356A1	Citocromo P450 família 356A1
DDT	Dicloro Difenil Tricloroetano
dNTP	Desorribonucleotídeo Trifosfatado
EDTA	Ácido Etilenodiamina tetraacético
ELISA	Ensaio Imuno-Absorvente Ligado à Enzima
FAD	Flavina Adenina Dinucleotídeo
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nation
FMN	Flavina Mononucleotídeo
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato Desidrogenase
GST	glutathiona S-transferases
HAP	Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)
ICSU	Committee of International Council of Scientific Unions
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IgG	Imunoglobulina G
IP TG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
LMM	Laboratório de Moluscos Marinhos
MOF	Mono-oxigenase contendo Flavina
MAO	Monoamina Oxidase
NAD	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PBS	Tampão Fosfato Salino
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
PMSF	Fluoreto de Fenilmetanosulfonil
PNSB	Pesquisa Nacional de Saneamento Básico
P450	Citocromo P450
qPCR	PCR Quantitativo em Tempo Real
SDS-PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida-Dodecil Sulfato de Sódio
SSH	Hibridização Subtrativa Supressiva
UDP	Ribonucleotídeo de Uracila Difosfatado
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina

USEPA

TBS

$\Delta\Delta Ct$

United States Environmental Protection Agency

Tampão Tris Salino

Método comparativo de limiar do ciclo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1 ECOTOXICOLOGIA E BIOMONITORAMENTO.....	18
1.2 ESGOTO DOMÉSTICO, <i>Crassostrea gigas</i> E OS BIOMARCADORES MOLECULARES	19
1.3 AS ENZIMAS CITOCROMO P450	28
1.4. CITOCROMO P450 356A1 E SEU USO NO BIOMONITORAMENTO.....	32
2. OBJETIVOS GERAIS.....	36
3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
4.1 OBTENÇÃO DA SEQUÊNCIA DO cDNA DE CYP356A1.....	37
4.2 ANÁLISE DA SEQUÊNCIA DE PROTEÍNA PREDITA CgCYP356A1	37
4.3 EXPRESSÃO HETERÓLOGA.....	37
4.3.1 Clonagem do cDNA codificante para CgCYP356A1.....	37
4.3.2 Expressão do cDNA de CgCYP356A1.....	38
4.3.3 Solubilização de CgCYP356A1 recombinante	38
4.3.4 Purificação de CgCYP356A1 recombinante	38
4.4 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS.....	39
4.4.1 Obtenção de anticorpos anti-CgCYP356A1.....	39
4.4.2. Caracterização do soro policlonal através de Ensaio Imuno-Absorvente Ligado à Enzima (ELISA).....	40
4.5 EXPOSIÇÃO DE <i>C. gigas</i> AO ESGOTO DOMÉSTICO <i>in situ</i>	41
4.6 HOMOGENEIZAÇÃO DE PROTEÍNAS	42
4.7 ENSAIOS DE WESTERN BLOTTING E DOT BLOTTING	42
4.8 EXTRAÇÃO DE RNA, OBTENÇÃO DE cDNA E REALIZAÇÃO DE ENSAIOS DE RT-PCR	43
4.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	45
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
5.1 CARACTERIZAÇÃO DE CYP356A1	46
5.2 EXPRESSÃO HETERÓLOGA.....	54
5.3 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS ANTI-CgCYP356A1, WESTERN BLOTTING E DOT BLOTTING	58

5.4 AVALIAÇÃO DO RNA MENSAGEIRO (RNAm) DE CYP356A1	63
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	66
REFERÊNCIAS.....	69
ANEXO A – Mecanismo catalítico de enzimas P450.....	75

1. INTRODUÇÃO

1.1. ECOTOXICOLOGIA E BIOMONITORAMENTO

Desde a antiguidade utilizam-se organismos vivos para avaliar a qualidade do meio em que vivem. Há relatos de que Aristóteles (384-322 a.C.) colocou peixes de água doce em água do mar para analisar suas reações. O primeiro teste de toxicidade que se tem notícias foi realizado em 1816, com insetos aquáticos (MAGALHÃES; FERRÃO-FILHO, 2008).

O termo “ecotoxicologia” foi utilizado pela primeira vez em 1969, durante a reunião do *Committee of International Council of Scientific Unions* (ICSU), em Estocolmo, pelo toxicologista René Truhaut. Ele definiu ecotoxicologia como uma ciência que estuda os efeitos de substâncias naturais e sintéticas sobre os organismos vivos, populações e comunidades, animais ou vegetais, terrestres ou aquáticos, que constituem a biosfera, tendo como base a interação substância-organismo-meio ambiente (MAGALHÃES; FERRÃO-FILHO, 2008).

O conceito de ecotoxicologia abrange o objeto de estudo da ecologia, os organismos vivos e suas interações com o meio ambiente, e da toxicologia, no que diz respeito aos efeitos de compostos naturais e sintéticos sobre os seres vivos. Em 1977, a definição de ecotoxicologia foi alterada e caracterizada como a ciência que tem por objetivo estudar as modalidades de contaminação do meio ambiente pelos poluentes naturais ou sintéticos, produzidos por atividade humana, seus mecanismos de ação e seus efeitos sobre o conjunto de seres que habitam a biosfera (MAGALHÃES; FERRÃO-FILHO, 2008). Portanto, passou a se configurar como uma ferramenta de monitoramento ambiental, baseada principalmente na resposta de organismos individuais a estressores químicos. A ecotoxicologia trata-se, contudo, de uma ciência com um objeto próprio de estudo (o fenômeno de intoxicação ambiental em todas as suas nuances e consequências), com finalidade (impedir e prevenir determinada intoxicação ou saber como interrompê-la, revertê-la e remediá-la) e com método (MAGALHÃES; FERRÃO-FILHO, 2008).

De acordo com Magalhães e Ferrão-Filho (2008), em 1984, a USEPA estabeleceu o uso de organismos para fins de monitoramento da qualidade da água, o chamado Monitoramento Biológico ou Biomonitoramento. No Brasil, a primeira iniciativa de padronização dos testes de toxicidade aguda em animais (peixes) ocorreu em 1975. Desde então, vários testes de toxicidade aguda e crônica foram desenvolvidos utilizando grupos e espécies de organismos, tais como algas,

microcrustáceos, peixes de águas continentais e marinhas, além de testes com sedimentos.

Segundo Magalhães e Ferrão-Filho (2008), o objetivo principal da ecotoxicologia é a realização de uma análise custo-benefício na produção de bens de consumo visando minimizar os custos da produção e os efeitos da poluição química causados por esta. Para investigação destes efeitos, testes ecotoxicológicos (tais como as avaliações de toxicidade) são ótimas ferramentas, mesmo que tenham como enfoque principal a resposta do organismo, em detrimento do ecossistema como um todo.

O conceito de biomarcadores, por sua vez, insere-se nesse contexto como a resposta de organismos ou populações a agentes estressores pela variação de múltiplos parâmetros a diferentes níveis de organização. Os biomarcadores moleculares respondem de forma muito breve e constituem uma ferramenta de aviso prévio, impedindo que organismos, comunidades ou sistemas sofram danos irreversíveis (COUSINOU *et al.*, 2000). Apesar dos testes toxicológicos serem de extrema importância na determinação da qualidade dos corpos d'água e no monitoramento biológico, os biomarcadores moleculares são parâmetros muito sensíveis às alterações ambientais, sendo uma resposta primária a quaisquer fatores de estresse.

Os biomarcadores moleculares se configuram como uma ferramenta mais sensível e de resposta rápida, correspondendo a efeitos específicos a níveis fisiológicos, citológicos e bioquímicos. Este fato faz do uso desses parâmetros moleculares um método mais eficaz no biomonitoramento que os testes ecotoxicológicos acima descritos (MAGALHÃES; FERRÃO-FILHO, 2008).

1.2. ESGOTO DOMÉSTICO, *Crassostrea gigas* E OS BIOMARCADORES MOLECULARES

O esgoto doméstico é um coquetel complexo de nutrientes, coliformes fecais, metais traços, compostos orgânicos, medicamentos, produtos de uso pessoal, sabões e graxas, além de muitos outros contaminantes desconhecidos, (AVERY; DUNSTAN; NELL, 1998) que devido a sua natureza heterogênea podem causar diferentes efeitos tóxicos aos ecossistemas marinhos e estuarinos (MEDEIROS *et al.*, 2008a; MEDEIROS *et al.*, 2008b; TOLEDO-SILVA *et al.*, 2008).

Segundo Serafim (2005), aproximadamente 25% da população brasileira (o que equivaleria a 42 milhões de pessoas) está concentrada em 400 municípios na zona costeira, o que representa uma densidade populacional média de 90 hab/km², quase cinco vezes maior que a

média nacional (19 hab/km²). Esta alta densidade demográfica na região costeira brasileira representa uma grande fonte de impacto ambiental, principalmente devido aos altos índices de contaminação associado ao lançamento de esgoto, na maioria das vezes de forma não tratada, ao ambiente.

De acordo com dados da Pesquisa Nacional de Saneamento Básico (PNSB) de 2008 (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2010), houve um aumento de 6,7% no número de municípios com rede coletora de esgoto, o que representou mais 192 cidades ofertando esse tipo de serviço em comparação com PNSB de 2000. Apesar do crescimento em 2.495 municípios, distribuídos pelas Unidades da Federação, com exceção do Estado de São Paulo, onde apenas uma cidade não apresentava o serviço de esgotamento através de rede coletora, ainda é verificada uma grande deficiência desse serviço no Brasil. Estima-se que cerca de 34,8 milhões de pessoas (aproximadamente 18% da população brasileira) são expostas ao risco de contrair doenças em decorrência da inexistência de rede coletora de esgoto (Figura 1) (IBGE, 2010).

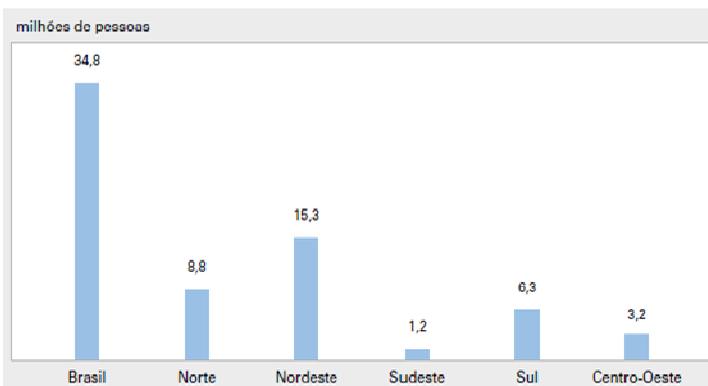


Figura 1 – Número de pessoas sem acesso à rede coletora de esgoto, segundo as Grandes Regiões do Brasil.

Fonte: IBGE (2008).

No que diz respeito ao aspecto legislativo, o setor de saneamento básico passou por importantes mudanças no Brasil (IBGE, 2010), as quais se destacam a criação da Lei n° 10.257, de 10 de julho de 2001, denominada Estatuto da Cidade, e da Lei n° 11.445, de 5 de janeiro de 2007, conhecida como Lei de Saneamento Básico, apesar de regulamentada somente em 2010, pelo Decreto n° 7.217, de 21 de junho

de 2010 (IBGE, 2010). Entretanto, é importante salientar que, para o ambiente, não basta uma adequada coleta do esgoto por meio de uma rede geral, há, ainda, a necessidade de que ele seja tratado. O PNSB (2008) mostra que apenas em 28,5% dos municípios brasileiros ocorre o tratamento de esgoto, o que acaba se refletindo na redução na qualidade de nossos recursos hídricos. Mesmo na Região Sudeste, onde 95,1% dos municípios possuíam coleta de esgoto, menos da metade desses (48,4%) realizam tratamento. Além da Região Sudeste, o melhor desempenho nesse sentido foi observado nas Regiões Centro-Oeste (25,3%) e Sul (24,1%). Estima-se que em 2008 o volume de esgoto tratado representava 68,8% da quantidade coletada (Figura 2) (IBGE, 2010).

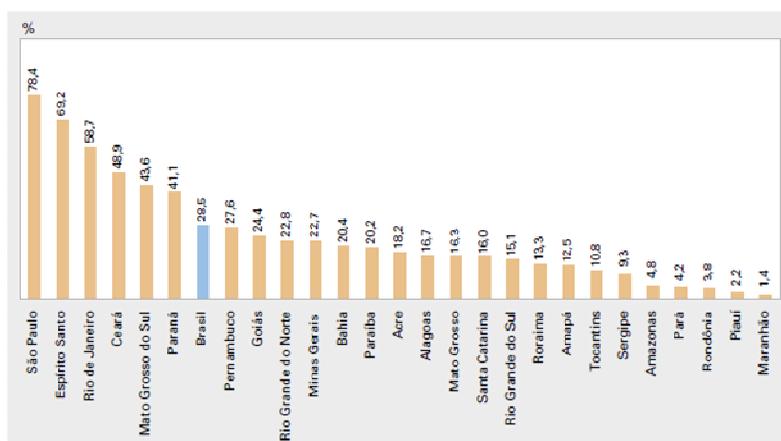


Figura 2 – Percentual de municípios com tratamento de esgoto, em ordem decrescente, segundo as Unidades de Federação - 2008

Fonte: IBGE (2008).

Essas informações, portanto, sugerem que a ausência de uma rede coletora de esgoto sanitário eficiente, apesar de ser um pouco contornada pela construção de fossas sépticas, representa um impacto significativo no que diz respeito à qualidade dos corpos d'água no Brasil. Quando se considera a região costeira, isso se torna ainda mais expressivo, tendo em vista a alta densidade demográfica no local, pois o ambiente aquático continua sendo utilizado como destino final do esgoto sanitário bruto.

Os efeitos do lançamento de esgoto doméstico na zona costeira pode ser ainda mais crítico ao levar em consideração a natureza heterogênea dos ecossistemas estuarinos. Por ser um local onde

ambiente marinho e dulcícola interagem, os habitats estuarinos apresentam uma grande diversidade biológica. As águas costeiras (incluindo estuários e lagoas) constituem uma interface entre os ambientes marinhos e de água doce, bem como entre os continentes e os oceanos. Os estuários podem ser definidos como amplas porções de rios ou córregos próximos de sua foz, influenciados pela massa de água marinha dentro da qual eles fluem. Desta forma, eles são massas de água salobra costeira semi-fechadas com livre conexão com o mar, sendo que a demarcação convencional entre essas águas continentais e o mar geralmente é o nível médio das marés (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATION, 2010).

Portanto, muitos ecossistemas estuarinos recebem águas continentais impactadas por contaminantes oriundas do escoamento dos rios ou córregos. Por outro lado, os ambientes costeiros são considerados viveiros para uma ampla variedade de espécies marinhas (FAO, 2010).

A espécie de ostra *Crassostrea gigas*, popularmente conhecida como ostra do Pacífico ou ostra japonesa por ser nativa da região do Japão, é encontrada em ambientes estuarinos, e costumam servir como substratos para as comunidades dos costões rochosos da região intermarés. Possui uma vida sedentária firmemente fixada às rochas, destroços e conchas de zonas intermarés inferiores até profundidades de 40 m. A ostra japonesa, todavia, também pode se assentar em lamas ou areias lodosas, bem como em ambientes de água doce, águas profundas com baixa luminosidade e salobras, turvas e pobres em oxigênio. Apesar disso, as bases fisiológicas e moleculares para essas adaptações permanecem ainda desconhecidas (FAO, 2010; SAAVEDRA; BACHÈRE, 2006).

A faixa de salinidade ótima para a sobrevivência de *C. gigas* está entre 20 a 25‰, embora possa ser encontrada em salinidades abaixo de 10‰ e a 35‰, onde é improvável sua reprodução. Ela suporta uma ampla faixa de temperatura, com uma variação de 1,8 a 35° C. Porém, quando a temperatura da água alcança 20° C ou mais, a qual coincide com o período de maturação sexual e conseqüente desova, pode ocorrer mortalidade. Esta é conhecida como mortalidade de verão que, independentemente da localização, tem sido associada a altos níveis de nutrientes na água, maior susceptibilidade a patógenos, fatores genéticos, aspectos físico-químicos da água nas regiões de cultivo, práticas de cultivo, além da baixa reserva energética devido aos eventos de desova (BERTHELIN; KELLNER; MATHIEU, 2000).

A amplitude térmica e de salinidade suportada por esta espécie justificam, portanto, seu cosmopolitismo, permitindo que fosse introduzida em diversos locais no planeta, abrangendo todos os continentes (FAO, 2010).

Esse bivalve apresenta uma característica reprodutiva conhecida como hermafroditismo proandrino, onde a maturação sexual inicial produz machos. Em áreas com boa disponibilidade de alimento, a razão sexual em ostras adultas mostra uma predominância de fêmeas, ao passo que o contrário é verdadeiro em locais com baixo suprimento de alimentos. Uma reversão sexual, de fêmea para macho, pode acontecer caso o suprimento de alimento seja limitante, por exemplo, quando há superpopulação de animais (FAO, 2010).

C. gigas possui relações ecológicas importantes no ambiente em que vive, além de servir como substrato para espécies habitantes dos costões rochosos (conforme citado anteriormente), contribui para a transferência de minerais (como cálcio, visto que sua concha é formada por sais deste elemento) e de matéria orgânica em habitats bentônicos (como fonte de alimento para outros seres vivos) (SAAVEDRA; BACHÈRE, 2006). Esses bivalves são excelentes precipitadores de carbonato, configurando-se como um potencial modelo de estudo para a biomineralização (HEDGECOCK *et al.*, 2005).

A ostra japonesa é taxonomicamente identificada de acordo com a seguinte hierarquia abaixo (segundo dados do National Center for Biotechnology Information (2010)):

Reino – Animalia

Filo – Mollusca

Classe – Bivalvia (Linnaeus, 1758)

Subclasse – Pterimorfia (Beurlen, 1994)

Ordem – Ostreoida

Família – Ostreidae (Rafinesque, 1815)

Genêro – *Crassostrea* (Sacco, 1897)

Espécie – *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793)

Ela é também cladisticamente classificada dentro do clado Bilateria, por apresentar simetria bilateral. Três outros clados principais de animais são encontrados dentro deste: um deuterostômio (que inclui os vertebrados) e dois clados protostômios, o Ecdisozoa, o qual inclui artrópodes e nematóides, e Lofotrocozoa, incluindo moluscos e anelídeos (HEDGECOCK *et al.*, 2005).

Conforme dados da FAO (2010), esse bivalve é uma das espécies mais consumidas no mundo. Em 2008, o comércio deste molusco rendeu US\$1.034.084 correspondendo a 648 982 t comercializadas. A

Figura 3 mostra a evolução da produção mundial de *C. gigas*. Devido a sua grande relevância econômica, a ostra do Pacífico vem sendo cada vez mais estudada em vários países.

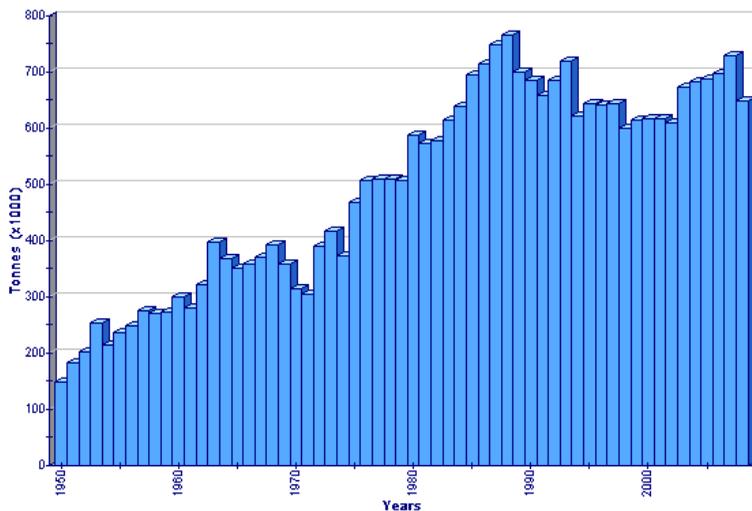


Figura 3 – Produção mundial de *Crassostrea gigas*.
Fonte: FAO (2010).

Nos bivalves, a captação de alimentos é feita por filtração da água, ou seja, eles podem acumular xenobióticos absorvidos juntamente com o alimento, constituindo-se assim um risco potencial para a saúde humana ao ser ingerido como fonte de alimento (HEDGECKOCK *et al.*, 2005; SAAVEDRA; BACHÈRE, 2006). Desta forma, *C. gigas*, apesar de ter um ciclo de vida complexo, passando por estágio larval, a qual se desenvolve no plâncton por semanas enquanto é dispersa pelas correntes marinhas, é um excelente modelo biológico para o estudo de monitoramento ambiental (HEDGECKOCK *et al.*, 2005; SAAVEDRA; BACHÈRE, 2006; MEDEIROS *et al.*, 2008b).

A contaminação da zona costeira por esgoto doméstico, fato esse que é fortemente corroborado pelos dados referentes aos padrões de esgotamento sanitário no Brasil, insere-se tanto no contexto da saúde pública quanto da ecotoxicologia. Conforme mencionado anteriormente, o esgoto constitui-se em uma mistura complexa de contaminantes inorgânicos e orgânicos, e uma imensa diversidade de organismos patogênicos, tais como vírus entéricos, bactérias, entre outros, os quais podem ser bioacumulados por *C. gigas* (CORRÊA *at. al.*, 2006).

Em relação a ostreicultura, os contaminantes são fatores ambientais de especial interesse, porque podem induzir o estresse e reduzir a qualidade da produção, provocando mortalidade e, além disso, podem afetar a saúde humana (SAAVEDRA; BACHÈRE, 2006). Organismos residentes neste ambiente poluído possivelmente exibirão alterações tanto em parâmetros bioquímicos quanto fisiológicos. O nível de produção de danos ao DNA (8-hidroxiguanina) é um parâmetro positivamente correlacionado com bioacumulação de poluentes em ostras (AVERY; DUNSTAN; NELL, 1998; VALAVANIDIS *et al.*, 2006). Metais como mercúrio, cobalto e níquel, os quais podem ser encontrados no esgoto doméstico, também têm fortes efeitos negativos sobre condições fisiológicas de bivalves a relativamente pequenas concentrações (AVERY; DUNSTAN; NELL, 1998; VALAVANIDIS *et al.*, 2006). Ou seja, os xenobióticos contidos no esgoto resultam em uma resposta multifatorial dos organismos vivos e envolvem mudanças na homeostase destes para contra-atacar os desafios ambientais (AVERY; DUNSTAN; NELL, 1998). Além disso, muitas interações entre os contaminantes podem resultar em efeitos aditivos, sinérgicos ou antagônicos com relação aos resultados tóxicos que provocam sobre o organismo (TANGUY *et al.*, 2005).

Do ponto de vista celular, a contaminação ambiental elicit respostas que prioritariamente seriam a excreção dos compostos xenobióticos, podendo ainda causar anormalidades endócrinas por interferência metabólica devido à presença de esteróides no ambiente ou por cascatas de sinalização não-genômica (sugerida como a via de desregulação endócrina em moluscos) (JANER; PORTE, 2007).

Organismos aquáticos expostos a xenobióticos, geralmente, induzem um sistema de enzimas que são capazes de realizar a biotransformação de uma ampla variedade de químicos (MEDEIROS *et al.*, 2008a). Antes da excreção, compostos exógenos apolares são convertidos a derivados solúveis em água, num processo conhecido como biotransformação (COUSINOU *et al.*, 2000). As enzimas acima mencionadas apresentam um papel fundamental na biotransformação, metabolismo e/ou detoxificação de xenobióticos, e têm sido classificadas dentro de três fases distintas, as quais estão integradas (MEDEIROS *et al.*, 2008a).

O metabolismo oxidativo é o passo inicial da biotransformação. Este pode conduzir a ativação de certos procarcinógeno e protoxicantes não-carcinógenos, além da inativação de compostos tóxicos (STEGEMAN; LECH, 1991). A fase I dos mecanismos de defesas contra xenobióticos é, portanto, mediada principalmente por sistemas de

mono-oxigenase microsossomal dependente de citocromo P450 (P450), os quais constituem a rota principal do sistema de detoxificação. Estes, entretanto, são seguidos pelas enzimas: mono-oxigenase contendo flavina (MOF), monoamina oxidase (MAO), oxidase de molibdênio hidroxilase (como aldeído e a xantina oxidase), e álcool e aldeído desidrogenase. Os produtos oxigenados são mais reativos do que os compostos originais, com potencial para interagir com DNA, lipídeos e proteínas, causando danos celulares. Alguns destes produtos de oxigenação, por sua vez, podem ser prontamente excretados, ou passar para a fase II da via de detoxificação (BOUTET, TANGUY, MORAGA, 2004a; MEDEIROS *et al.*, 2008a).

A segunda fase da biotransformação é caracterizada pela conjugação enzimática de produtos da fase I a compostos endógenos via glutationa S-transferases (GSTs), UDP-glicoronil transferase ou sulfotransferases. Já a terceira fase envolve proteínas de membrana, identificada por suas resistências multi-drogas ou multi-xenobióticos, as quais bombeiam e exportam os xenobióticos modificados para fora da célula (BOUTET, TANGUY, MORAGA, 2004a).

As principais enzimas envolvidas em cada etapa do processo de detoxificação geralmente sofrem indução por poluentes e são propostas como biomarcadores moleculares. Esta característica de indutibilidade remete ao fato desses compostos aumentarem a expressão de alguns genes, aumentando, por conseguinte, seus níveis de RNAm, os quais são traduzidos em novas proteínas, levando a um aumento final da atividade enzimática. Portanto, tal indução pode ser monitorada a três níveis diferentes: quantificação do RNAm; determinação imunológica da proteína e ensaios de atividade enzimática (COUSINOU *et al.*, 2000).

A avaliação da resposta dos biomarcadores moleculares, seguindo-se o que já foi proposto acima, representa uma ferramenta que antecipa os efeitos gerados pela poluição. Desta forma, evita-se amplificação dos danos causados, impedindo que atinjam níveis maiores na escala ecológica.

Visto que o processo de biotransformação contém os biomarcadores que se alteram de forma mais imediata à contaminação, maior atenção é conferida a esse mecanismo de defesa. Em *C. gigas*, a primeira fase da detoxificação conta com a participação das enzimas MOF e MAO. Segundo Boutet, Tanguy e Moraga (2004a), esta espécie de ostra carece da atividade de P450, sendo que sua função biológica é exercida pelas outras enzimas da fase I, MOF, MAO, álcool e aldeído desidrogenase e xantina oxidase. Além disso, as enzimas MOF e MAO

podem frequentemente gerar os mesmos metabólitos produzidos por P450 (BOUTET, TANGUY, MORAGA, 2004b).

As MOFs catalisam a oxigenação de uma ampla variedade de xenobióticos, envolvendo a redução de quatro elétrons de dioxigênio com dois elétrons derivados do cofator nicotinamida reduzido e dois elétrons advindos do substrato. Elas são enzimas ligadas à membrana, estando presentes na membrana do retículo endoplasmático liso de células eucarióticas (BOUTET, TANGUY, MORAGA, 2004b).

Quanto às MAOs, há duas formas em tecidos de mamíferos, A e B, que diferem entre si por suas especificidades ao substrato e sensibilidade a inibidores. Essas enzimas são essencialmente mitocondriais, sendo também identificada alguma atividade em microsomas. A MAO A atua em muitos tecidos, no sistema nervoso central de lula, ela parece ter relação com a pressão hidrostática (BOUTET, TANGUY, MORAGA, 2004b).

Os P450 também apresentam enorme relevância quando se fala em desregulação endócrina. Sabe-se que uma ampla variedade de poluentes químicos (compostos organoestânicos, metais pesados, herbicidas e compostos xenoestrogênicos/fitoestrogênicos) pode induzir anormalidades endócrinas em invertebrados. Entretanto, o mecanismo de ação de cada um destes agentes causais raramente tem sido elucidado, principalmente devido à carência de informação sobre o sistema endócrino dos invertebrados (JANER; PORTE, 2007).

Em vertebrados, a rota esteroidogênica de colesterol a esteróides sexuais requerem a atuação de diversas enzimas P450 (CYP11A, 17, 19 e 21), além das β -hidroxiesteróides dehidrogenases. Porém, as enzimas P450 da via biossintética dos hormônios esteroidais são ausentes em invertebrados tais como equinodermos e espécies protostomadas (MIZUTA; KUBOKAWA, 2007). Além disso, análises genéticas e filogenéticas sugerem que receptores para hormônios esteróides de vertebrados originaram a partir de um gene ancestral comum de deuterostômios, similar ao de um receptor de estrógeno. Tal suposição é reforçada pelo fato de que nenhum receptor para andrógenos e progesterona tem sido identificado em invertebrados. Em contrapartida, rotas metabólicas para esteróides sexuais têm sido descrita em invertebrados, as quais podem ser uma indicação de que outros esteróides, diferentes daqueles encontrados em vertebrados podem ser sintetizados em protostômios. Estes, por sua vez, funcionam como hormônios ativos nas espécies que os produzem. Pelo menos em alguns filos de invertebrados, como por exemplo, em moluscos e

equinodermos, esteróides sexuais possuem um papel na reprodução e diferenciação sexual (JANER; PORTE, 2007).

Apesar da maioria dos estudos sugerirem a inexistência de P450 em invertebrados, investigações recentes realizadas em nosso laboratório comprovaram a existência de uma isoforma dessa classe de enzimas em *C. gigas*. Medeiros *et al.* (2008a) identificaram a isoforma CYP356A1 após experimento de exposição de ostra japonesa ao esgoto doméstico não tratado. Esta enzima foi induzida pelo esgoto nas condições utilizadas no estudo. Toledo-Silva *et al.* (2008) obtiveram e clonaram a sequência completa de CYP356A1. Eles também determinaram os motivos característicos das enzimas P450 em CYP356A1 e, a partir de análises filogenéticas, sugeriram uma possível semelhança com a família CYP17-“like” de outros invertebrados. Apesar dela ainda apresentar homologia de sequência com CYP1 e CYP2, enzimas conhecidamente relacionadas à via de biotransformação de xenobióticos. Por outro lado, de acordo com este estudo, esta nova isoforma é mais expressa em tecidos do manto de *C. gigas* do que em brânquias, glândula digestiva e músculo adutor, o que, mais uma vez, poderia ser uma indicação de sua participação em eventos de desregulação endócrina.

Devido à importância das enzimas P450 para o biomonitoramento e de sua expressiva indução em *C. gigas* por poluentes encontrados no esgoto doméstico, a enzima CYP356A1 representa um potencial alvo para futuras avaliações ecotoxicológicas nesta espécie.

1.3. AS ENZIMAS CITOCROMO P450

Os citocromos P450 (P450) compreendem a maior e mais versátil família de proteínas. Conforme previamente explicitado, eles são particularmente conhecidos como participantes do metabolismo de fase I de uma variedade de xenobióticos lipofílicos, como por exemplo, drogas, pesticidas, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP) e aloquímicos de plantas. Entretanto, muitos P450s possuem funções endógenas, sendo especializados no metabolismo de moléculas de sinal, tais como os hormônios esteróides, eicosanóides (em vertebrados) e ferormônios (REWITZ *et al.*, 2006).

Os P450, em geral, são enzimas heme-tiolato conhecidas por sua atividade de mono-oxigenase, catalisando a incorporação de um átomo de dióxigênio aos substratos. A estequiometria global da reação é: $\text{Substrato-H} + \text{O}_2 + \text{NAD(P)H} + \text{H}^+ \rightarrow \text{Substrato-OH} + \text{H}_2\text{O} + \text{NAD(P)}^+$. Eles catalisam um amplo espectro de reações, incluindo

hidroxilações, epoxidações, deaminações oxidativas, N-, O-, S-dealquilações e dehalogenações (REWITZ *et al.*, 2006).

Os genes P450 são ordenados em famílias e subfamílias tendo como critério a identidade de aminoácidos, filogenia e organização gênica. A raiz do símbolo CYP é derivada de seu nome no idioma inglês, *cytochrome P450*, e é seguida por um número Arábico indicando a família, uma letra indicando a subfamília e, finalmente, um número Arábico para designar um membro individual de uma subfamília. Geralmente grupos de proteínas com mais de 40% de identidade na sequência primária de aminoácidos é incluído na mesma família. Já aquelas enzimas que possuem mais do que 55% de identidade de aminoácidos são organizadas na mesma subfamília. O número 450 representa o espectro máximo de absorção a 450 nm da forma da enzima ligada ao monóxido de carbono (REWITZ *et al.*, 2006; WERK-REICHHART; FEYEREISEN, 2000).

O grande volume de novas sequências P450 estudadas nos últimos anos conduziu a uma nova forma de estruturação das famílias relacionadas em grupos maiores chamados Clans, ou seja, uma designação em clados das famílias P450. Os Clans são definidos como um grupo de genes que claramente divergiram de um ancestral comum, isto é, a organização por Clan indica famílias inerentemente relacionadas. Desta forma, teremos o Clan 2 que se compõe de CYP2 e outras enzimas relacionadas tais como CYP1; o Clan 3 inclui CYP3 e outras como CYP6 e CYP9, o Clan 4 que compreende CYP4 e outras proximamente relacionadas; o Clan Mito o qual agrupa P450s mitocondriais. Outra forma de designação dos genes P450 é por alelos específicos, particularmente utilizadas em humanos (REWITZ *et al.*, 2006; WERK-REICHHART; FEYEREISEN, 2000).

Segundo dados do banco de sequências P450 (<http://drnelson.uthsc.edu/cytochromeP450.html>), o último levantamento realizado apresentou 3.282 genes agrupados em 120 famílias e 500 subfamílias. Das famílias descritas, Nelson (1998) relata a presença de apenas 2 em moluscos, CYP10 e CYP30. O banco de dados (<http://drnelson.uthsc.edu/cytochromeP450.html>) traz ainda que algumas espécies de moluscos possuam gene CYP20, inclusive este foi identificado no bivalve *Crassostrea virginica*. Snyder (2000) sugere existência de genes CYP4 em mexilhão e gastrópode. CYP10, 20 e 30 até então não apresentam função conhecida, entretanto, a família CYP4 parece estar envolvida em hidroxilações de ácido graxo, sugerindo ser esta a função mais primitiva desta superfamília de enzimas. Possivelmente, as enzimas P450 teriam alguma importância na

assimilação de fontes de carbono no início da história da vida (Nelson, 1998).

A diversidade de superfamílias P450 parece ter sua origem em extensivos processos de duplicações e por prováveis casos de amplificação de genes, conversões, duplicações genômicas, perdas de genes e transferência lateral. Evidências fósseis destes processos podem ser encontradas em alinhamentos de sequências, como também na presença de muitos grupos de genes P450 na maioria dos organismos. A organização exon-íntron dos genes P450 revela consideráveis diversidades na estrutura do gene, e poucas, quando nenhuma, posição de íntron é conservada entre famílias divergentes. Portanto, a história evolutiva desses genes inclui múltiplas perdas e ganhos de íntrons (WERK-REICHHART; FEYEREISEN, 2000).

As superfamílias P450 originaram ainda nos procariotos, antes mesmo do surgimento dos eucariotos e da acumulação de oxigênio molecular na atmosfera, sendo encontrada em procariotos e eucariotos. Assim, principalmente as consecutivas duplicações gênicas e subsequente divergência de genes conduziram a uma grande diversidade de famílias de genes P450, sendo as mais antigas relacionadas a funções fisiológicas importantes, como a síntese de esteróides. Mudanças ambientais e estratégias de vida provavelmente dirigiram a diversificação funcional conduzindo a um amplo espectro de atividade contra compostos exógenos. Por exemplo, uma planta que desenvolveu uma fitoalexina protetiva recrutará um novo P450 para detoxificação deste composto (OUZOUNIS; MELVIN, 1991; REWITZ *et al.*, 2006).

Apesar desses eventos genéticos relacionados ao P450, aqueles que participam de importantes rotas biossintéticas são preservados entre espécies e às vezes entre filos. Essas enzimas possuem uma estreita especificidade ao substrato. Em contraste, muitos P450 que metabolizam compostos exógenos têm um amplo espectro de especificidade, ou seja, não exibem a mesma conservação gênica observada para aqueles que envolvem vias metabólicas (REWITZ *et al.*, 2006).

Apesar de haver sobreposição de especificidade de substratos exibida por aqueles P450 catalisadores de reações envolvendo substratos exógenos, de modo geral, eles possuem preferência para determinada especificidade de reação. Edwards *et al.* (1998) analisou o conteúdo de diversas enzimas P450 de fígado humano comparando com suas respectivas atividades. CYP1A2 apresentou atividade fenacetina O-deetilase; CYP2A6 exibiu cumarina 7-hidroxilase como reação preferencial; CYP2C8, atividade ácido láurico 12-hidroxilase; CYP2C9,

tolbutamida 4-hidroxilase; CYP2C19, S-mefenitoina 4-hidroxilase; CYP2D6 catalisa a reação desbrisoquina 4-hidroxilase; CYP2E1, clorzoxazone 6-hidroxilase; CYP3A4 tem como atividade principal midozolam 1-hidroxilase, além de cumarina 7-hidroxilase; CYP4A11 teve atividade ácido láurico 12-hidroxilase, mesma reação catalisada por CYP2C8. Todos esses resultados foram encontrados utilizando-se fármacos comumente prescritos e refletem a importância dos P450 na metabolização de compostos exógenos.

Hirakawa *et al.* (2007) investigou a atividade hepática das enzimas CYP1A1, 1A2 e 1B1 em foca *Pusa sibirica*, sugerindo-se que proteínas CYP1A-like e CYP1B-like poderiam possuir atividade EROD (etoxiresorufina O-deetilase) e MROD (metoxiresorufina O-demetilase), sendo a primeira, dependendo da espécie animal, podendo realizar reações PROD (pentoxiresorufina O-depentilase) e BROD (benziloxiresorufina o-debenzilase), apesar de sua atividade preferencial ser EROD. CYP1A2 parece ter atividade MROD.

Em peixes, a reação mais bem caracterizada na investigação de atividade P450 é EROD. Isso se deve ao fato de enzimas CYP1A1 responderem a maioria dos xenobióticos presentes no ambiente, tais como dibenzodioxinas policloradas, dibenzofurans, bifenilas e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (JÖNSSON; BRANDT; BRUNSTRÖM, 2002). Para invertebrados marinhos, de acordo com Rewitz *et al.* (2006), utiliza-se ensaios EROD, bem como detecção imunológica por anticorpos heterólogos anti-CYP1A de peixe.

Mesmo exibindo diversificadas funções na célula, e tendo diferentes especificidades pelo substrato, os P450 possuem um mecanismo enzimático característico. Elas catalisam ataque oxidativo regioespecífico e estereoespecífico a hidrocarbonetos não ativados a temperaturas fisiológicas. Tal reação, quando não catalisada, requereria temperaturas extremamente altas e não seria específica. Os detalhes do mecanismo pelo qual os P450 realizam todas as reações ainda não são compreendidos, sendo que a ativação de oxigênio é o único aspecto bem documentado (WERK-REICHHART; FEYEREISEN, 2000).

O centro ativo dessa classe de enzimas é o ferro-protoporfirina IX (heme) ligado a um resíduo conservado de cisteína (tiolato), a qual atua como quinto ligante. O P450 em repouso está na forma férrica e com a sexta ligação disponível estabelecendo uma coordenação com uma molécula do solvente (água). A parte mais bem caracterizada da sequência catalítica envolve quatro passos (Anexo A). O primeiro refere-se à ligação do substrato, com deslocamento do sexto ligante, o solvente, induzindo a uma mudança na absorção máxima, no estado de

spin e potencial redox do sistema proteína-heme. No segundo passo, tem-se a redução de um elétron do complexo para o estado ferroso, conduzido por um aumento no potencial de oxidação-redução resultante do passo anterior. O terceiro passo do processo é a ligação do oxigênio molecular que gera um complexo superóxido. O quarto é um segundo passo de redução que leva a formação de espécies ativadas de oxigênio (WERK-REICHHART; FEYEREISEN, 2000).

A exata natureza das espécies ativas de oxigênio de duração extremamente curta, a qual acompanha o longo ataque ao substrato, permanece incerta. Sugere-se que haja uma mistura de oxidantes eletrofílicos, o ferro-peroxo e o ferro-oxo. Ambos complexos são formados pela protonação de dioxiênio reduzido por dois elétrons, um processo que ocorre quando um canal hídrico se forma no sulco da hélice I em cima da ligação do O₂. A espécie oxo (oxiferril), resultante da clivagem da ligação O-O e um átomo de oxigênio sai com dois elétrons e dois prótons como água. Essa forma é aparentemente mais abundante. A espécie ferro-hidroperóxido insere o elemento OH⁺ no complexo ferro-proteína, produzindo alcoóis protonados que podem causar rearranjo catiônico dos produtos. As espécies ferro-oxo, por sua vez, inserem um átomo de oxigênio (WERK-REICHHART; FEYEREISEN, 2000).

Monóxido de carbono pode se ligar ao ferro das proteínas P450 ao invés do dioxiênio, induzindo a uma mudança no máximo de absorbância do heme (chamado de pico Soret) para 450 nm. CO se liga com alta afinidade e previne a ligação e ativação do O₂. O resultado é a inibição da atividade de P450. A ligação e inibição por CO pode ser revertida pela luz, com eficiência máxima a 450 nm. Outros ligantes, substratos e inibidores, induzem a mudança de absorbância Soret em P450. Substratos que deslocam a sexta ligação coordenada com o solvente na proteína em repouso, geralmente provocam uma mudança para o azul (420 a 390 nm), a qual reflete uma transição de spin baixo para alto do ferro (WERK-REICHHART; FEYEREISEN, 2000).

1.4. CITOCROMO P450 356A1 E SEU USO NO BIOMONITORAMENTO

Diante do volume de informações concernentes a essa classe de enzimas, há muitas lacunas que ainda não foram preenchidas, especialmente quando se observa a vasta quantidade de novas enzimas P450 descobertas, sem que se saibam a função fisiológica destas (WERK-REICHHART; FEYEREISEN, 2000). Exemplificando este

fato tem-se a própria isoforma CYP356A1, que permanece por ter seu papel biológico determinado.

Há várias estratégias para se tentar determinar funções específicas para enzimas P450, as quais incluem mutagênese sítio dirigida e evolução dirigida *in vitro*. Além dessas, metodologias que melhoram a solubilidade e possibilitam a cristalização de enzimas ligadas a membrana, provavelmente, abrem uma nova era na compreensão dos mecanismos e substratos específicos das P450s, como também a engenharia de suas propriedades catalíticas (WERK-REICHHART; FEYEREISEN, 2000).

De modo geral, com o advento da genômica, houve um maior interesse em classificar e prever a função das proteínas utilizando análises de sequência, com o uso de informações da estrutura primária (sequência de aminoácidos), secundária (padrões e motivos) e terciárias (modelos) (OUZOUNIS; MELVIN, 1991; REWITZ *et al.*, 2006). Porém, devido a suas características catalíticas, os P450s, mesmo aqueles evolutivamente distantes (com menos de 40% de identidade na estrutura primária), contem motivos conservados que determinam um limite mínimo de identidade/similaridade entre as diferentes sequências (OUZOUNIS; MELVIN, 1991; WERK-REICHHART; FEYEREISEN, 2000; REWITZ *et al.*, 2006).

Para Rewitz *et al.* (2006), experimentos de detecção imunológica podem vir a ser uma abordagem útil no monitoramento da exposição a contaminantes ambientais. Contudo, esse tipo de experimento vem sendo realizado em invertebrados através de anticorpos heterólogos, ou seja, que reagem contra proteínas P450 de outros organismos, geralmente um vertebrado. Isto é, a reação destes anticorpos se baseia, principalmente, na semelhança entre as moléculas pertencentes a essa superfamília de enzimas. Segundo esse autor, esse tipo de especificidade de anticorpos não tem obtido resultados satisfatórios devido ao fato de a maioria das famílias encontradas nos vertebrados não serem identificadas nos invertebrados. Os dados gerados por esse método de análise necessitam de uma interpretação crítica e são preliminares, portanto, transmitem uma informação biológica muito limitada. Tem sido sugerida a identificação de sequências P450 em invertebrados marinhos para a produção de anticorpos específicos direcionados a estudos futuros. Esses anticorpos possibilitariam um maior esclarecimento referente à regulação e função desses novos P450 com papel biológico desconhecido.

Além disso, a necessidade de se estudar as funções das novas sequências P450 identificadas, especialmente em invertebrados, é ainda

mais importante quando são estudadas vias metabólicas como a biossíntese de hormônios esteroidais. De acordo com Janer e Porte (2007), os sistemas endócrinos são muito complexos e tem múltiplas retroalimentações regulatórias que diferem entre espécies e prejudicam a extrapolação dos efeitos dos xenobióticos de espécie para espécie.

Edwards *et al.* (1998) mostram que a mensuração do nível de proteínas P450 via reação com anticorpos é uma alternativa para a identificação da atividade biológica de P450 que catalisam reações desconhecidas.

Diante disso, é indiscutível a importância da utilização da imunodeteção na elucidação de questões de grande relevância referentes a novas isoformas P450. CYP356A1, por exemplo, é uma enzima identificada no invertebrado marinho *C. gigas* que responde satisfatoriamente à presença de contaminantes do esgoto doméstico, o qual representa uma fonte complexa de contaminação. Esse resultado, todavia, contraria investigações prévias, as quais comprovavam a inexistência de enzimas P450 nesse organismo. Por outro lado, mesmo que essa informação justifique a utilização da expressão dessa enzima no biomonitoramento, sua função ainda é desconhecida e a utilização da metodologia de detecção imunológica seria de particular interesse na resolução de tal impasse.

Para a produção de anticorpos que serão utilizados nos testes imunoquímicos, a expressão heteróloga é uma etapa crucial. Entre as estratégias descritas na literatura, o uso de *Escherichia coli* é o mais amplamente usado na produção de proteínas recombinantes, as quais não necessitam de modificações pós-traducionais. A expressão baseada na metodologia que usa maquinaria bacteriana, geralmente, rende alto nível de proteína recombinante em um tempo bastante reduzido (pET System Manual, Novagen). Entretanto, tal nível de expressão atingido em *E. coli* frequentemente resulta na acumulação da proteína em agregados insolúveis *in vivo*, os corpos de inclusão. Proteínas de corpos de inclusão são desprovidas de atividade biológica e necessitam de uma elaborada solubilização, redobrimento e procedimentos de purificação para recuperar o produto final ativo biologicamente. Porém, protocolos que utilizam solubilização “branda” permitem a recuperação de proteínas bioativas, que poderão ser usadas em ensaios de atividade, como também na imunização de animais visando a produção de anticorpos (SINGH e PANDA, 2005).

CYP356A1, por ter sua sequência completa já conhecida, e se mostrar como uma molécula promissora nas investigações ecotoxicológicas, representa uma importante alvo para procedimentos de

expressão heteróloga e estudos de imunodeteccção. O que se justifica, ainda, na ausência de informações referentes à rota metabólica que está envolvida, bem como no fato de ter sido identificada em condições de estresse ambiental por esgoto doméstico.

2. OBJETIVOS GERAIS

Este trabalho se propõe a realizar a expressão heteróloga e caracterizar a proteína CYP356A1, visando sua utilização em investigações relacionadas à presença de contaminantes no ambiente, posicionando-a como um novo biomarcador molecular para análise de locais contaminados por esgoto doméstico.

3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Clonar e subclonar a sequência completa do cDNA de CYP356A1 em vetores de clonagem pGEM-T e pET14b, respectivamente;
- Realizar a expressão da proteína recombinante CgCYP356A1 em *Escherichia coli*;
- Solubilizar a proteína recombinante, e, consecutivamente, proceder com a purificação por meio de ensaios de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC);
- Investigar, por meio de ferramentas da bioinformática, padrões e motivos na proteína predita;
- Obter os anticorpos policlonais anti-CgCYP356A1 após imunização de camundongos adultos da linhagem balb/c e avaliar os títulos atingidos;
- Analisar a expressão do gene *CYP356A1* em ostras *Crassostrea gigas* expostas ao esgoto doméstico *in situ*;
- Comparar a expressão deste gene nos organismos mantidos no local contaminado com os do local referência.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. OBTENÇÃO DA SEQUÊNCIA DO cDNA DE CYP356A1

A sequência de CYP356A1 foi identificada após análise de expressão diferencial de genes em *C. gigas* exposta a esgoto doméstico bruto (não tratado), a partir de técnicas que envolveram hibridização subtrativa supressiva (SSH – *Suppressive Subtractive Hybridization*) (MEDEIROS *et al.*, 2008b). CYP356A1 foi identificado como um dos genes induzidos nos animais expostos ao esgoto, sendo, portanto, de grande interesse nas avaliações ecotoxicológicas. A sequência completa do cDNA de CYP356A1 foi identificada, posteriormente obtida e clonada por Toledo-Silva *et al.* (2008). O cDNA resultante da biblioteca subtrativa gerada após SSH foi obtido a partir de tecidos de brânquias de ostras *C. gigas*, sendo toda a metodologia desenvolvida nesta técnica descrita por Medeiros *et al.* (2008b).

4.2. ANÁLISE DA SEQUÊNCIA DE PROTEÍNA PREDITA CgCYP356A1

A identidade e similaridade da proteína predita CgCYP356A1 com outras seqüências de P450 foi analisada utilizando os programas Expsy Proteomics Server (<http://expasy.org/>) (GASTEIGER *et al.*, 2003) e Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

4.3. EXPRESSÃO HETERÓLOGA

4.3.1. Clonagem do cDNA codificante para CgCYP356A1

A sequência completa do cDNA codificante para a enzima CgCYP356A1, obtida de biblioteca de cDNA de brânquias gerada após SSH, foi amplificada através de “Reação em Cadeia de Polimerase” (PCR) utilizando-se os oligonucleotídeos *cyp356a1-f* (5'-AAACAGCCATATGCGGTATCGTCTGCCAC-3') e *cyp356a1-r* (5'-GCAGCCGGATCCTTAATCTCTATTTCTCTCTTTCACCAC-3'), os quais continham os sítios de restrição das enzimas de *Nde* I e *Bam* HI (sublinhado), respectivamente.

O programa de amplificação consistiu de uma desnaturação inicial de 3 min a 94° C, seguido por 30 ciclos de 1 min a 94° C, 2 min a 59° C e por 90 s a 72° C, e um período de alongação final de 10 min a 72° C. Os produtos da PCR foram, portanto, subclonados no vetor pGEM-T (Promega). A seqüência do cDNA de CgCYP356A1 foi confirmada através de seqüenciamento, sendo, em seguida, excisada pela digestão com *Nde* I e *Bam* HI. O cDNA excisado foi subclonado

nos sítios de *Nde* I e *Bam* HI do vetor de expressão pET14b (Figura 8), resultando na fusão pET14b-CgCYP356A1. *E. coli* BL21 (DE3) pLysS, abrigando plasmídeo recombinante, foi utilizada para induzir a expressão da seqüência codificante de CgCYP356A1.

4.3.2. Expressão do cDNA de CgCYP356A1

Para os procedimentos de indução da expressão da enzima, uma cultura de células *E. coli* BL21 (DE3) pLysS, contendo o plasmídeo recombinante pET14b-CgCYP356A1, foi inoculada em 1.000 mL de meio de cultura Luria-Bertani (LB), com 100 µg/mL de ampicilina, 50 µg/mL de cloranfenicol e 20 mM de glicose. Isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) foi adicionado à cultura em uma concentração final de 0,4 mM, a qual, na seqüência, foi mantida a 30 °C sob forte agitação até densidade óptica de $A_{600nm} = 0,6$.

Supõe-se que enzima CgCYP356A1 recombinante se encontre em corpos de inclusão após a expressão, havendo a necessidade de sua subsequente solubilização.

4.3.3. Solubilização de CgCYP356A1 recombinante

O procedimento de solubilização foi modificado de Sambrook e Russel (2001) e Singh e Panda (2005). Células *E. coli* após a indução por IPTG foram coletadas por centrifugação a 4.500xg por 15 min na temperatura de 4° C, e então ressuspensas em tampão fosfato salino (13,7 mM de NaCl, 0,27 mM de KCl, 0,1 mM de Na₂HPO₄, 0,2 mM de KH₂PO₄, pH 7,4) (PBS) contendo 0,5% de Triton X-100. A suspensão celular passou por sonicação (7 ciclos de 20 segundos) no gelo, sendo os destroços celulares coletados posteriormente por centrifugação a 10.000xg durante 15 min a 4° C. O extrato bruto obtido foi solubilizado com tampão PBS pH 11 contendo 3M de Uréia e 1 mM de PMSF (fluoreto de fenilmetanosulfonil, Sigma-Aldrich). O sobrenadante foi coletado após 90 min de centrifugação a 13.500xg, e seu pH foi ajustado para 8,0.

4.3.4. Purificação de CgCYP356A1 recombinante

Todo o sistema e colunas de HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência) foram obtidos da empresa GE healthcare, sendo que o equipamento ÄKTA HPLC system foi utilizado nos ensaios. Antes de ser injetado no “looping” do aparelho, o sobrenadante foi filtrado a 0,22 µm (Millipore), para evitar um possível aumento da pressão na coluna durante o procedimento. Um volume final de 5 mL de sobrenadante contendo a proteína recombinante foi carregado na coluna HisTrap™

HP Columns, anteriormente equilibrada com tampão A (20 mM de fosfato de sódio a, 500 mM NaCl pH 7.8). O sistema foi calibrado para que o fluxo fosse de 1 mL/min, e houvesse um gradiente linear de concentração de imidazol variando de 0 a 500 mM. A proteína CgCYP356A1 foi eluída por um gradiente linear de 60 a 500 mM de imidazol. A fração contendo a proteína de interesse purificada foi coletada e dialisada. A diálise consistiu de incubação em um gradiente decrescente de imidazol, ficando aproximadamente 16 h (“overnight”) em tampão A contendo 150 mM de imidazol, e em tampão A com 75 mM de imidazol, 35 mM de imidazol e sem imidazol, respectivamente nessa ordem, com troca do tampão a cada 2 h. A amostra dialisada foi concentrada utilizando-se um filtro de exclusão de tamanho de 30 kDa (Millipore), após 7 min de centrifugação a 3.500 rpm.

Em cada passo, desde a indução da expressão, passando pela solubilização, purificação, diálise e concentração, uma alíquota da amostra foi coletada e monitorada através de eletroforese em gel de Poliacrilamida-Dodecil Sulfato de Sódio a 10% (SDS-PAGE) (LAEMMLI, 1970) sendo corado com Comassie Blue (NEUHOFF *et al.*, 1988).

4.4. PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS

4.4.1. Obtenção de anticorpos anti-CgCYP356A1

Para obtenção dos anticorpos policlonais foram utilizados três camundongos adultos, da linhagem isogênica Balb/c, criados e mantidos em condições apropriadas no Biotério Setorial do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Universidade Federal de Santa Catarina. A reposição de água e ração foi realizada diariamente e a limpeza das caixas efetuada duas vezes por semana.

Os camundongos foram imunizados com a proteína CgCYP356A1 recombinante purificada, sendo as doses administradas conforme o esquema abaixo:

- Primeira Dose - Dia 0: 25 µg de CgCYP356A1 em 50% adjuvante completo de Freund, volume final de 0,5 mL, via subcutânea;
- Segunda Dose - Dia 7: 25 µg de CgCYP356A1 em 50% adjuvante incompleto de Freund, volume final de 0,5 mL, via subcutânea;
- Terceira Dose - Dia 14: 25 µg de CgCYP356A1 em PBS, volume final de 0,5 mL, via intraperitoneal (i.p.);

- Quarta Dose - Dia 28: 25 µg de CgCYP356A1 em PBS, volume final de 0,5 mL, via i.p.

A coleta de sangue foi realizada por punção submandibular, sete dias após a administração da última dose, sendo precedida de anestesia com 2,78 mg de cloridrato de cetamina (Dopalen, Vetbrands) e 0,12 mg de cloridrato de xilazina (Rompum, Bayer), em volume de 50 microlitros administrados por via i.p. O soro contendo os anticorpos policlonais anti-CgCYP356A1 foi testado por ensaio imunoenzimático.

O presente projeto foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) e aprovado sob o número 23080.008782/2009-24.

4.4.2. Caracterização do soro policlonal através de Ensaio Imuno-Absorvente Ligado à Enzima (ELISA)

O ensaio foi realizado em placa de 96 poços, à qual passou por uma etapa inicial de sensibilização com 200 µl de proteína recombinante diluída em tampão carbonato/bicarbonato 0,05M por poço. Após um período de incubação de 3h a 37°C, a solução de sensibilização foi removida e, 300 µl de tampão contendo 50 mM de Tris, 150 mM de NaCl e 0,5% de gelatina foram adicionados em cada poço, sendo a placa, em seguida, mantida novamente a 37°C por 30 min. A próxima etapa consistiu de 5 lavagens da placa com 300 µl/poço de PBS contendo 0,05% de Tween, para impedir possíveis interações inespecíficas entre a placa e o anticorpo primário testado.

Previamente à incubação, o anticorpo primário policlonal anti-CgCYP356A1 foi diluído em tampão PBS/0,05% Tween contendo 0,5% de gelatina, sendo adicionado 100 µl em cada poço. A placa foi mantida a 37°C por 1h para a ligação do anticorpo ao substrato, e, subsequentemente, foi lavada 5 vezes com 200 µl/poço de PBS/0,05% Tween. O anticorpo secundário utilizado foi anti-imunoglobulina total de camundongo conjugado à peroxidase e, antes do uso, diluído em tampão PBS/0,05% Tween com 1% de BSA. A reação com o anticorpo conjugado foi realizada com 100 µl/poço com 1h de incubação a 37°C. Outra sequência de 5 lavagens com 200 µl/poço de PBS/0,05% Tween foi realizada. A detecção foi realizada com 100 µl/poço de solução substrato/cromógeno incubado por 10 min no escuro, sendo que antes da leitura 50 µl/poço da solução de parada (ácido sulfúrico 0,25 N) foram adicionados. Os dados foram gerados após leitura da placa a 492 nm de comprimento de onda.

4.5. EXPOSIÇÃO DE *C. gigas* AO ESGOTO DOMÉSTICO *in situ*

As ostras da espécie *C. gigas*, com comprimento total médio de 5 e 8 cm, foram obtidas na estação de cultivo do Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), na Praia de Sambaqui, Florianópolis, SC. Os animais foram acondicionados em mini-balsas em diferentes locais: Ribeirão da Ilha, Florianópolis, SC (local Referência) e Foz do Rio Bücheler, São José, SC (Contaminado por esgoto doméstico) (n= 10 animais para cada grupo experimental) (Figura 4). Os tempos de exposição avaliados foram: tempo zero (T0), amostras coletadas antes da exposição, cujo objetivo foi analisar as condições iniciais; 24 horas (T24h) e 14 dias (T14d).

Cada ostra teve suas brânquias e glândula digestiva coletadas, ao passo que uma parte destas foi mantida em nitrogênio líquido (experimentos de imunodeteccção da proteína CgCYP356A1) e outra em reagente para conservação de RNA (RNA Later®) para análise da transcrição do gene *CYP356A1* nos animais mantidos nos distintos tempos e locais utilizados.

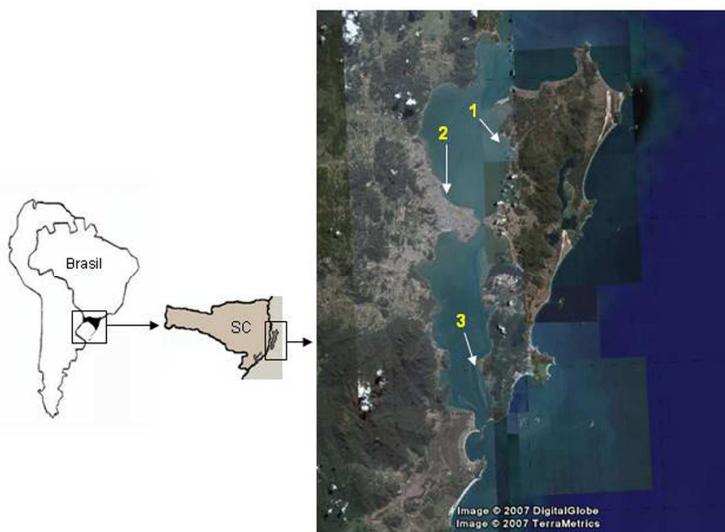


Figura 4 - Localização dos pontos de exposição das ostras *Crassostrea gigas*. Estação de cultivo do Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) (Sambaqui, Florianópolis, SC) (tempo 0) (1), ponto contaminado (foz do Rio Bücheler, São José, SC) (2) referência (Ribeirão da Ilha, Florianópolis, SC) (3).

4.6. HOMOGENEIZAÇÃO DE PROTEÍNAS

Os tecidos amostrados foram pesados e homogeneizados com quatro vezes o volume de tampão de homogeneização (20 mM de Tris-HCl, 1 mM de EDTA, 1 mM de DTT, 0,5M de sacarose, 0,15M de KCl, 1 mM PMSF, pH 7,6), utilizando homogeneizador “Tissue tearor” (Biospec Prod. INC.). O homogeneizado foi centrifugado a 9.000xg por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e submetido a um processo de ultracentrifugação a 90.000xg durante 70min. A fração protéica obtida foi dissolvida em tampão para microssoma (0,1M Tris HCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,1M KCl, 20% glicerol). Uma alíquota foi utilizada para determinação da concentração de proteínas.

A determinação da concentração de proteína da fração microssomal foi realizada pelo método de Lowry *et al.* (1951), modificado por Peterson (1977), utilizando-se soro albumina bovina como padrão.

4.7. ENSAIOS DE WESTERN BLOTTING E DOT BLOTTING

As amostras microssomais dos tecidos em estudo foram analisadas por imunodeteção segundo metodologia descrita por Kloepper-Sams *et al.* (1987). Fração microssomal (20 µg) e CgCYP356A1 recombinante purificada (5 µg) foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida-Dodecil Sulfato de Sódio a 10% (SDS-PAGE). Posteriormente, as proteínas foram eletroforéticamente transferidas para uma membrana de nitrocelulose usando o sistema de transferência Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad). Para os ensaios de *Dot blotting*, as amostras foram colocadas diretamente na membrana de nitrocelulose, a qual sofreu secagem à temperatura ambiente previamente aos passos subsequentes.

Para todos os ensaios de imunodeteção, incubação com tampão de bloqueio (0,01 M de Tris, 0,1 M de NaCl, pH 7,5 (TBS), 0,1% vol/vol de Tween, 5% peso/vol de leite em pó desnatado) por 1h a temperatura ambiente, sob agitação branda, foi realizada para bloquear possíveis sítios de interação inespecíficos entre a membrana e o anticorpo primário. Após três passos de lavagem com tampão de bloqueio (5 min a temperatura ambiente sob agitação branda), o anticorpo policlonal anti-CgCYP356A1 diluído em tampão de bloqueio foi adicionado, e a membrana mantida a temperatura ambiente por 1h sob agitação constante. Lavagens (cinco) foram realizadas antes da incubação com o anticorpo secundário conjugado a peroxidase. Estas foram procedidas intercalando-se o tampão de bloqueio sem leite e

tampão de bloqueio (com 5% de leite), as quais consistiram de incubações de 5 min sob agitação. Por conseguinte, a membrana foi mantida por uma hora a temperatura ambiente com o anticopro anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase (Amersham) diluído em tampão de bloqueio, novamente sob agitação constante. A membrana foi, então, lavada cinco vezes intercalando-se tampão de bloqueio sem leite com tampão TBS.

As bandas e “dots” foram detectadas por ensaios de quimioluminescência. Os resultados obtidos foram escaneados e a quantificação densitométrica realizada com a utilização do programa Scion Image.

Antes de serem iniciados os experimentos de *Western blotting* e *Dot blotting* definitivos, a determinação da diluição adequada dos anticorpos primário e secundário foi realizada (com 1:15.000 para o anticorpo primário e 1:6.000 para o anticorpo conjugado), a qual foi utilizada em todos os ensaios. Paralelamente a essa padronização, soro negativo (advindo de camundongo não imunizado) foi testado nas mesmas diluições descritas acima para confirmar que os resultados obtidos não são gerados por reações inespecíficas.

4.8. EXTRAÇÃO DE RNA, OBTENÇÃO DE cDNA E REALIZAÇÃO DE ENSAIOS DE RT-PCR

O RNA total de brânquias e glândula digestiva foi extraído a partir de homogeneização com reagente comercial a base de etanol e tiocianato de guanidina (TRIZol - Invitrogen). A proporção utilizada de amostra para reagente foi de 200 mg para 1 mL, sendo que, subsequentemente a homogeneização, uma etapa de incubação a temperatura ambiente de 1,5h foi realizada. O RNA total obtido foi mantido em água para biologia molecular, tendo sua concentração e pureza previamente determinada através de leitura espectrofotométrica em equipamento Nanodrop ND-1000 UV-Vil (Nanodrop Technologies). Para tanto, comprimento de onda de 260 nm e as razões 280/260 e 260/230 foram utilizados na quantificação e qualificação do RNA final.

Nos ensaios de avaliação da expressão gênica das ostras mantidas em local contaminado por esgoto doméstico em relação àquelas situadas no local referência, indivíduos (n=6 por grupo) foram analisados individualmente, sendo o ensaio realizado em duplicata, para cada tempo (24 horas e 14 dias) e local (Ribeirão da Ilha e Rio Bücheler) de exposição. A síntese do cDNA foi realizada utilizando o kit Omniscript Reverse Transcriptase (Qiagen) com 2 µg de RNA total acrescido de dNTP (5 mM); oligo-(dT)15 (1 µM) (Promega); inibidor de RNase

RNase OUT (Invitrogen), transcriptase reversa Omniscript (Qiagen) (4U). As amostras foram incubadas por 90 min a 37°C para síntese do cDNA. Os cDNAs foram precipitados utilizando 2,5x volume de isopropanol (Sigma), 10% de acetato de amônia 5 M, pH 5.2 (Fluka) e 0,2 µg/µL de glicogênio (Qiagen), e mantidos a -20°C durante 16 h para remoção de interferentes da reação de PCR, tais como os dNTPs não utilizados e enzima transcriptase reversa. A concentração e a pureza do cDNA foram checadas por espectrofotometria conforme descrito acima.

Para realização das reações de qPCR, o kit QuantiFast® Probe PCR (Qiagen) foi utilizado. O volume final de cada reação foi de 20 µL, contendo 10 µL de QuantiFast Probe PCR Master Mix, o qual apresentava o fluoróforo SYBR Green I, a Taq pó limerase, o mix de dNTPs, MgCl₂, e o tampão da enzima; já os 10 µL restantes foram adaptados entre volume de amostra, iniciadores e água. Os ensaios foram realizados no aparelho Rotor Gene 6000 (Corbett Lifesciences), com rotor de 36 poços. Os iniciadores utilizados foram: *cypF* (5'-ATGAAACCCGCGAAACCAG-3') e *cypR* (5'-ATAAATTCGGCTTCACGCCCT-3'), para o gene CYP356A1 (com número de acesso no *GenBank* EF645271), cujo fragmento amplificado foi de 156 pb e a temperatura de anelamento de 51°C; e os pares de iniciadores para os genes constitutivos, gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) (cujo número de acesso é CAD67717), sendo *gapdhF* (5'-AAGCAACAAGGATTGGCGTGGT-3') e *gapdhR* (5'-AACTGGTACGCGGAAAGCCATT-3') os oligonucleotídeos utilizados, cujos quais geraram um amplicon de 182 pb e cuja temperatura de anelamento foi de 55°C; e actina (ACT) (com número de acesso AB071191) cujos iniciadores foram *actF* (5'-ATGTCCCCAGGTATTGCTGACCGT-3') e *actR* (5'-TCCACATCTGTTGGAAGGTGGACA-3'), gerando um fragmento de 157pb e com temperatura de anelamento de 53° C. O programa de ciclagem para cada gene incluía um ativação inicial da enzima a 65° C por 15 min, seguida por 40 ciclos de 10 s de desnaturação a 95° C, 15 s de anelamento à respectiva temperatura do par de iniciadores, e 20 s de extensão a 72° C, momento em que ocorre a aquisição da fluorescência. Após a corrida, uma curva de dissociação foi realizada, aumentando-se a temperatura de 1° C a cada 5 s, com temperatura inicial de 50° C e final de 99°C. A concentração de amostra utilizada foi de 100 ng por reação e do oligonucleotídeos foi de 1.000 nM (segundo recomendações do fabricante do kit utilizado).

Anteriormente aos testes definitivos, uma curva padrão de amostra foi construída como uma padronização da eficiência global da

reação, a qual deve ficar, quando não exatamente, próxima de 1 (100% de amplificação por ciclo). O programa disponível no aparelho Rotor Gene 6000 transformou os valores brutos de fluorescência em uma escala logarítmica, e assim o limiar (*threshold*) foi delimitado baseando-se no coeficiente de correlação (R^2) e na eficiência da curva, calculada pelo próprio aparelho. Desta forma, o Ct (*threshold cycle*) é determinado para cada gene avaliado.

4.9. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para análise da expressão relativa, foram subtraídos os valores de Ct do gene de interesse dos valores de Ct do gene constitutivo para cada amostra. O resultado obtido foi subtraído pela média dos Ct do controle para cada amostra, incluindo aquelas do próprio controle. Finalmente, cada valor gerado serviu como um expoente negativo de base 2. A partir desse último dado, foram realizadas as análises estatísticas. Esse cálculo foi feito de acordo com o que foi proposto por Schmittgen e Livak (2008) seguido a fórmula do método comparativo de Cts, $2^{-\Delta\Delta CT} (\Delta\Delta Ct = (Ct_{alvo} - Ct_{constitutivo})^{tratado} - (Ct_{alvo} - Ct_{constitutivo})^{controle})$.

Os dados foram submetidos a testes estatísticos de Kolmogorov-Smirnov para determinar a normalidade. Devido ao fato do “n” amostral utilizado ser pequeno (6 indivíduos por grupo), os testes D’Agostino e Shapiro-Wilk, os quais são normalmente usados nesse tipo de análise, não puderam ser aplicados. Utilizou-se, portanto, a teste de Bartlett para determinar a homocedacidade dos dados. As diferenças comparativas dos dados foram identificadas através o teste *t* de Student. A escolha do gene constitutivo foi determinada por testes preliminares e estatísticos, os quais foram mantidos idênticos para cada gene. As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o programa GraphPad 5.0 para Windows.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. CARACTERIZAÇÃO DE CYP356A1

A sequência completa do cDNA de CYP356A1 apresenta 1.627 pb, uma ORF (*Open Reading Frame*) de 1.503 pb (Figura 5; para informações adicionais ver em Toledo-Silva *et al.* (2008)), a qual codifica uma proteína predita com 500 resíduos de aminoácidos. A partir de análises computacionais (<http://expasy.org>, Gasteiger *et al.*, 2003) da proteína predita CgCYP356A1, identificou-se uma região hidrofóbica N-terminal que se configura como um possível sítio de ancoramento à membrana. Essa região representa uma sequência com aproximadamente 20 resíduos de aminoácidos (como mostrado na Figura 5), a qual foi removida nos passos iniciais do processo de expressão heteróloga, nas etapas de amplificação do cDNA CYP356A1. Neste procedimento, o oligonucleotídeo que anela na extremidade 5' do cDNA foi desenhado a partir de uma região localizada a 81 pb do início da tradução, excluindo a sequência codificante para a região hidrofóbica da proteína ainda no processo de PCR, antes mesmo da clonagem em pGEM-T do cDNA de CYP356A1 e da construção do plasmídeo recombinante pET14b-CYP356A1. Consequentemente, a expressão heteróloga foi realizada sem essa região hidrofóbica. Como mostrado na Figura 6, o fragmento amplificado de CYP356A1, a partir do oligonucleotídeo 5' interno da sequência, apresentou 1.422 pb, e não 1.503 pb.

-47 ggcattcgatgagagaaaacagtagagacaccaagagagcaatc^{M L K L}ATGTTGAAGTTGT
 5 S ^{M N T O T V L A G I C V G L L V Y Y V}
 14 CCATGAACACCCAGACCGTTTTAGCGGGAAATATCGTGTGGTCTTTTGGTATATACGTCA
 25 ^{I K} R M R Y R L P P G P W C I P L V G H
 74 TCAAACGGATCGCGTATCGTCCACCGGGCCATGGTGATCCCTCTTGTGGTCATT
 45 Y K I Y S S P E M H K K I A A L L S K D Y
 134 ATAAAAATTTATTCATCTCCCGAGATGCACAAGAAAATCGCAGCGCTGTCCAAGGACTACG
 65 G P V V R I S F G P Q T W V V L N D I N
 194 GCCCTGTCGTCCGAATTCGTTTGGCCCCAAAACCTGGGTTGTGCTTAATGACATCAACA
 85 T V V E A M V K R K A D F A G R R P H F T
 254 CCGTGGTGAAGCCATGGTCAAAGGAAGGCTGATTTTGCCGGAGGCCGCATTTACAT
 105 S G D V F T E G G K D I A F S N Y S A S
 314 CGGTTGATGTGTCCAGAAAGGAGAAAGGATATAGCCCTTCAGCAATATTCAGCTTCCT
 125 W K F H R K I A G K A L R H Y L Q G D L
 374 GGAAATCCATAGGAAAATAGCCGGAAGGCTCTCAGGCATTAATCAACAGGAGATTAC
 145 L E N M I Q E N M N K F L N K M A E E K
 434 TGGAAAACATGATTCAGAGAACATGAATAAATTTTGAACAAGATGGCCGAGGAAAAAG
 165 E P F M F K E Y V D L M V F H Q L Y T C I
 494 AGCCGTTTATGTTTAAAGAAATCGTCGATCTGATGGTTTTTCATCAACTATACATAAT
 185 C F G E K R P T D D P E V N K L L K I D
 554 GCTTTGGAGAAAAGCGTCCACAGATGACCCGGAAGTGAATAAATTCGTTAAGATAGACA
 205 N D L I D K L G T G L F E D I I P Y F K
 614 ATGATTTGATTAGACAAGCTAGGTACCGGGCTTTTTGAGGATATAATCCCTTTTAAAG
 225 D I Y P T K K W Q M F L S M V D E M L T
 674 ACATCTATCCAACGAAAAAATGGCAGATGTTCTCTCCATGGTGGACGAAATGCTCACG
 245 V L R R K F R E H V E T F Q P G V N R R D
 734 TTCCTTAGAAGAAAATTTAGAGAGCATGTTGAAAACCTTCCAGCAGGAGTCAACAGGAGACT
 265 F I D S M L I A K Q E A K D E G D E A A
 794 TCATTGACAGCATGTTAATCGTAAACAGGAAGCGAAGGATGAGGGCGATGAGGGCGCC
 285 L E V M D D T H L V Q T I S D I F F G
 854 TGGAGTTCATGGATGATACGCACCTCGTTCAGACCATCTGATATCTTCTTTAGCGGGGG
 305 V D T T R F T M D W F V Y F M T R F P E
 914 TAGACACTACTCGTTTCAAAATGGACTGGTTCGTTTATTTTCATGACACGATTTCCGGAAAT
 325 F Q A K C Q E E I D R V V G S E Q P S M
 974 TCCAAAGCAAAATGTCAAGAGAAAATTTGACAGAGTTGTTGGATCAGAAACCACTTCAATGA
 345 K D R S K L D Y T E A C L F E S M R L S
 1034 AGGACAGAAACAAATTTGGATTACACCGAGGCGTCTGTTTGAATCGATGCGGCTTTCGA
 365 N V V G I G L P H M T I C D S Q V G G Y
 1094 ATGTTGTAGGCATAGGGCTCCACACATGACAAATTTGTGATTCCAAAGTTGGTGGATACG
 385 D V P K G T T V V I N H W A L H H D P K
 1154 ATGTCCTAAAAGGTACCACGTAGTCATCAACCACTGGGCGCTTCCACATGACCTAAAT
 405 Y W K D P E E F D P L R Y L D E N G K M
 1214 ATTGAAGGAGCCAGAAAGAAATTTGACCCACTTCGCTATCTCGATGCAAAACGGTAAATGA
 425 K P A K P D S W L P F S A G R R V C L G
 1274 AACCCGCGAAACAGATAGCTGGCTTCCTTCTCAGCCGACGTAGAGTTTGCTTGGGAG
 445 E S L A K P E I L L M C A N L L Q R F E
 1334 AAAAGTTGGCCAAACAGAAAATCCTACTGATGTGTGCCAATCTTCTACAGCGGATTTGAAA
 465 I S L P E G V K P N L E H R L P G F G V
 1394 TAAGTCTCCAGAGGGCGTGAAGCCGAATTTAGAGCACCGACTTCCGGCTTTGGCGTAG
 485 E L P S D Y K I V V K E R N R D #
 1454 AGCTTCCGTCGGATTACAAAATCGTGGTGAAGAGAGAAAATAGAGATTA^{TA}agaataatgg
 1514 cgcttgcgatctttttgtattacagacaccactaacacaactgactattttaatattaat
 1574 acaatgt

Figura 5 – Nucleotídeos e sequência deduzida de aminoácidos de CgCYP356A1. A ORF (*Open Reading Frame*) é mostrada em letras maiúsculas, enquanto que as regiões não-codificantes estão em letras minúsculas. A proteína predita codificada é dada pelo código de uma letra acima do segundo nucleotídeo de cada códon. Setas representam os iniciadores usados e a amplificação do cDNA de CgCYP356A1. A numeração para os aminoácidos começa na metionina codificada pelo primeiro códon de iniciação e termina no primeiro códon de terminação. A região de ancoramento na membrana de CgCYP356A1 é mostrada em caixa. (*) indicam os sítios de fosforilação e (♦) sítios de N-glicosilação.

Estudos comprovam a presença de 4 classes diferentes de citocromo P450, de acordo com seus sistemas catalíticos: classe I, requerem tanto redutase contendo FAD quanto uma redoxina ferro-enxofre; classe II, necessitam apenas de uma redutase P450 contendo FAD/FMN para transferência de elétrons; classe III, são enzimas auto-suficientes e não requerem doador de elétrons; já as enzimas da classe IV recebem elétrons diretamente de NAD(P)H (WERK-REICHHART; FEYEREISEN, 2000).

Em eucariotos, de um modo geral, as enzimas P450 de classe I estão associadas à membrana interna da mitocôndria e catalisam a biossíntese de moléculas endógenas. Já as de classe II, tanto P450 quanto a redutase do complexo estão ancoradas, independentemente, à face externa do retículo endoplasmático por âncora amino-terminal hidrofóbica. Essas enzimas catalisam reações de mono-oxigenação em substratos endógenos, como também participam de processos de detoxificação de compostos exógenos. As enzimas de classe III, não requerem oxigênio molecular e catalisam reações de rearranjo e desidratação de alquilhidroperóxidos ou alquilperóxidos inicialmente gerados por dioxigenases, participando da biossíntese de moléculas sinalizadoras endógenas em animais. As enzimas de classe III são encontradas em diversos compartimentos subcelulares. Por fim, as enzimas de classe IV é uma P450 rara presente em fungos, solúvel e que reduzem óxido nítrico (NO) gerado por denitrificação a óxido nítrico. Em procariotos, são encontradas P450 de classe I e II, ambas solúveis (WERK-REICHHART; FEYEREISEN, 2000).

De modo geral, podemos dizer que as enzimas P450 de animais são encontradas associadas à membrana interna da mitocôndria ou ancoradas à face externa do retículo endoplasmático. Esses dois tipos de proteínas são identificados pela presença de sinais divergentes em suas sequências N-terminais. Na primeira situação, a enzima apresenta vários resíduos positivos N-terminal que são proteoliticamente clivados

durante a importação. No outro caso, é frequente encontrar um agrupamento de prolina (Pro-X-Pro) que formam um anel e é precedido por resíduos de aminoácidos básicos. Essa região representa um sinal de parada de transferência localizado entre o segmento amino-terminal hidrofóbico de ancoramento (com cerca de 20 aminoácidos) e a parte globular da proteína (REWITZ *et al.*, 2006; WERK-REICHHART; FEYEREISEN, 2000).

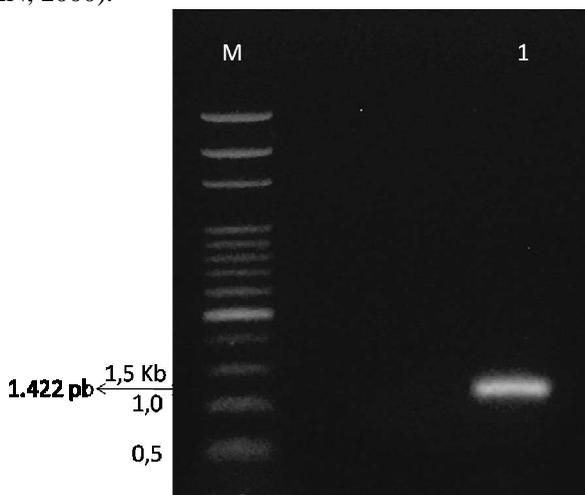


Figura 6 – Eletroforese em gel de agarose 1% indicando o produto de amplificação do cDNA de CYP356A1.

Analisando a sequência de cDNA de CYP356A1, pode ser observado, conforme já exposto, uma possível região hidrofóbica precedendo um provável sinal de parada de transferência composto por resíduos de arginina que antecedem o tripeptídeo Pro-Gli-Pro. Portanto, tais informações sugerem uma localização associada ao retículo endoplasmático de *CgCYP356A1*.

A Figura 5, traz ainda vários sítios prováveis de modificações pós-traducionais na sequência predita de *CgCYP356A1*, como N-glicosilação e fosforilação. Apenas um sítio de N-glicosilação foi predito, ao passo que vários locais de fosforilação são possíveis (análises feitas a partir do programa <http://expasy.org>, GASTEIGER *et al.*, 2003). De acordo com Wang *et al.* (2009), investigações referentes ao papel da fosforilação em CYP3A4 de fígado humano mostraram que a atuação de quinases citosólicas estabelece uma ligação com ubiquitinação e degradação proteossomal. Ou seja, sugere-se que a

inativação estrutural de P450 ocorra a partir da fosforilação, marcando tais proteínas para degradação proteossomal dependente de ubiquitina.

Apesar desses resultados corroborarem a hipótese de que CgCYP356A1 é uma proteína microsomal, com um segmento hidrofóbico N-terminal inserido na membrana e o domínio globular voltado para o citosol, não se tem informações a respeito da importância biológica dessa proteína.

De acordo com Toledo-Silva *et al.* (2008) análises filogenéticas mostraram que CYP356A1 agrupa-se juntamente com enzimas CYP17-“like” de invertebrados deuterostômios, apresentando homologia de 32-36% com esta família. Enzimas P450 tanto de invertebrados quanto de vertebrados se agruparam formando três ramos distintos, um com sequências CYP1, outro com enzimas CYP2, e um com elementos da família CYP17. A sequência de CYP356A1 apresentou, entretanto, menor homologia com as famílias CYP1 e CYP2, de 30-33%, o que sugere uma maior proximidade de função com CYP17 do que com estas últimas duas famílias. CYP17 é uma importante enzima que atua em um ramo crítico da biossíntese de esteróides. Ela apresenta atividade tanto 17 α -hidroxilase quanto 17,20 liase em vertebrados, sendo responsável pela produção de andrógenos, androstenediona e deidroepiandrosterona, a partir de progesterona e pregnenolona (MIZUTA; KUBOKAWA, 2007; JANER; PORTE, 2007).

A despeito disso, estes dados não são suficientes para prever possíveis atividades biológicas para CYP356A1, informações adicionais são necessárias. Enzimas P450, principalmente devido às características catalíticas (atuando como mono-oxigenases), apresentam regiões que foram amplamente conservadas, com resíduos de aminoácidos intactamente retidos, desde procariotos até vertebrados superiores.

As regiões conservadas das proteínas P450 são formadas de quatro hélices (D, E, I e L), as hélices J e K, dois conjuntos de folhas β , e uma região espiral chamada de meandros (OUZOUNIS; MELVIN, 1991; REWITZ *et al.*, 2006; WERK-REICHHART; FEYEREISEN, 2000). Essas regiões comprometem: primeiro, o gancho de ligação do grupo heme, o qual apresenta a sequência consenso característica das P450s, localizada na face proximal do heme imediatamente antes da hélice L, com a cisteína absolutamente conservada que serve como quinto ligante para o anel ferro-porfirina; segundo, o motivo da hélice K, conservado também no lado proximal de heme na estrutura secundária da proteína, e que serve para estabilizar a estrutura central de ligação do heme; e finalmente, a hélice I que apresenta outra sequência consenso considerada uma assinatura dos P450, a qual corresponde ao

sulco de transferência de prótons no lado distal do heme (regiões consenso detalhadas na Figura 7) (WERK-REICHHART; FEYEREISEN, 2000).

Figura 7 – Alinhamento de sequências de aminoácidos de citocromo P450 de *C. gigas* CYP356A1 (ABR45717.1), *Saccoglossus kowalevskii* CYP17A-like (XP_002730850.1), *Danio rerio* CYP1A (BAB90841.1), *D. rerio* CYP17A1 (AAI62669.1), *Homo sapiens* CYP1A1 (NP_000490.1), *H. sapiens* CYP17A1 (NP_000093.1), *Nematostella vectensis* CYP17A-like (XP_001640254.1) e *Strongylocentrotus purpuratus* CYP17A-like (XP_001182935.1). Regiões conservadas na estrutura primária estão em negrito e sombreadas, hélices C, K, I e regiões de ligação ao grupamento heme. Os asteriscos (*) indicam os aminoácidos conservados e os pontos (.) e dois pontos (:) indicam uma ordem crescente de similaridade, respectivamente.

Para Ouzounis e Melvin (1991), um padrão na estrutura secundária dos P450 pode ser observado, com segmentos absolutamente conservados. A hélice C (Figura 7) é uma região altamente conservada a qual apresenta uma sequência consenso que funciona como doadora de hidrogênios ligados. Ela contribui para o seqüestro do grupo heme propionato, papel exercido pelo anel indol heterocíclico do triptofano. Outra região de P450 altamente conservada é a hélice D, apesar de não haver qualquer resíduo invariante, essa região está na superfície da proteína. É predita como sendo uma hélice anfifílica e não apresenta nenhuma importância funcional, apenas contribui para a estabilidade estrutural global da molécula. Em *CgCYP356A1* (padrão predito a partir de análises computacionais através programa <http://expasy.org>, GASTEIGER *et al.*, 2003), a hélice D corresponderia a uma região de 144-160.

Outra hélice importante é a hélice I (Figura 7) que, além de participar da transferência de prótons, conforme mencionado anteriormente, é extremamente importante para a função catalítica dos P450s, caracterizando-se como o sítio de ligação do oxigênio. Um resíduo de glicina alarga a hélice para a acomodação do oxigênio molecular, e o resíduo de treonina deforma a hélice, representando o fim do local da distorção. A hélice J é também altamente conservada e iniciada por uma prolina, além de ser predita como uma hélice curta. Em *CgCYP356A1*, ela inicia-se no aminoácido 323. Hélice K (Figura 7) é outro segmento curto altamente conservado entre os P450, cuja sua função também foi descrita acima (OUZOUNIS; MELVIN, 1991).

Uma região β , localizada entre a hélice K e o começo do pacote de cisteína, com 57 resíduos, 366-423 em *CgCYP356A1*, é caracterizada por não apresentar “gaps” e possuir um resíduo de lisina invariante, em 388, o qual está envolvido na transferência de elétrons de NADP-citocromo P450 redutase via interações eletrostáticas. Após esta última, a sequência que caracteriza as enzimas P450s é encontrada

(Figura 7), o pacote de cisteína, no qual um resíduo de arginina (na posição 440 de CgCYP356A1) interage com grupos propionato do heme. Por fim, tem-se a hélice L, um segmento adjacente à região de ligação ao heme. Embora essa estrutura não participe diretamente da atividade enzimática, ela representa um elemento de integridade estrutural, contribuindo para a estabilização da ligação do heme (OUZOUNIS; MELVIN, 1991).

Portanto, de modo geral, as enzimas P450 apresentam várias regiões conservadas, as quais estão comprometidas com sua atividade catalítica. O que determinaria um limiar mínimo na porcentagem de homologia entre sequências, dificultando, através de técnicas de bioinformática, uma possível inferência na função da proteína, baseando-se apenas na comparação com outras sequências P450.

5.2. EXPRESSÃO HETERÓLOGA

Análises da proteína predita pelo programa Compute PI/Mw (<http://expasy.org>, GASTEIGER *et al.*, 2003) indicam que CgCYP356A1, apresenta uma massa molecular estimada de 57,8 kDa e um *pI* 6,2. O fragmento expresso da proteína, ou seja, sem a região de ancoramento na membrana, apresentou uma massa molecular de aproximadamente 56,8 kDa e um *pI* estimado de 6,2 (Figura 11). A massa molecular encontrada, contudo, refere-se à da proteína de fusão, ou seja, a proteína de interesse (com massa molecular predita de 54,7 kDa) juntamente com a cauda de fusão, que possui um peso molecular estimado de 2,1 kDa. Tal fusão, por sua vez, adiciona uma etiqueta de 6 resíduos de histidina na porção N-terminal da proteína recombinante, de acordo com o que é previsto para o sistema de clonagem e expressão de pET14b (Novagen) (Figura 8).

Cada complexo é formado através de uma coordenação do nitrogênio do motivo imidazol da polihistidina com um sítio de coordenação disponível no metal. Logo, quanto mais complexos são formados mais fortemente a proteína fica retida na esfera carregada. Desta forma, proteínas que possuem uma cauda de histidina se ligam com mais afinidade à resina, ao contrário das que estão presentes em um extrato de *E. coli*, por exemplo, e que apresentam uma quantidade menor de histidina em sua sequência primária.

Para eluir a proteína de interesse, altas quantidades de imidazol são necessárias. Concentrações baixas deste reagente são usadas para remover a proteína com afinidade de ligação mais baixa, sem que a proteína alvo seja eluída. Portanto, no sistema HPLC, o fluxo inicial (a 1 mL/min, durante 5 min) foi realizado com tampão A (sem imidazol), para remoção das proteínas que não se ligam à resina da coluna. Um segundo fluxo, de 2 min, com tampão A, foi procedido para eluir as proteínas que se ligam fracamente à resina. O primeiro patamar de concentração de imidazol representa um fluxo de 10 min com tampão A e 2% de tampão B (tampão A com 500 mM de imidazol). Esse patamar significa a primeira lavagem da resina, a qual contém uma baixa concentração de imidazol, e serve para remover as proteínas que apresentaram afinidade de ligação mais baixa. No segundo patamar foi utilizado tampão A com 12% de tampão B, com um fluxo de 10 min. Neste, algumas proteínas são eluídas, ou seja, seria uma segunda lavagem. A partir de então, uma rampa com concentração crescente de imidazol (60-500 mM) foi realizada, durante 20 min de corrida, cujo objetivo é a eluição da proteína de interesse.

Os resultados com o teste por HPLC mostraram que CgCYP356A1 recombinante é eluída a partir do segundo patamar de concentração de imidazol (a 60 mM), a qual é continuamente removida na rampa de concentração do eluente. Um pico de absorção na concentração de 37,225% de tampão B, isto é, 186,125 mM de imidazol, foi obtido.

A proteína purificada, por sua vez, passou por um processo de diálise com quatro trocas de soluções para remoção da uréia e imidazol presentes nos tampões de purificação. A primeira solução continha uma concentração maior de imidazol (150 mM), o que evita uma possível precipitação da proteína de interesse. As outras concentrações foram decrescentes, 75 mM, 35 mM e sem imidazol.

Frações representativas de cada evento da corrida por HPLC foram avaliadas através de SDS-PAGE 10% para verificar o comportamento da proteína recombinante e a qualidade da purificação

ao longo do ensaio. Observou-se que a proteína de interesse com o mínimo de impurezas (proteínas bacterianas) encontrava-se nas frações coletadas correspondentes à segunda lavagem e à rampa de concentração do eluente (Figura 9), apesar de uma pequena quantidade desta não se ligar na resina da coluna ou ser eluída na primeira lavagem.

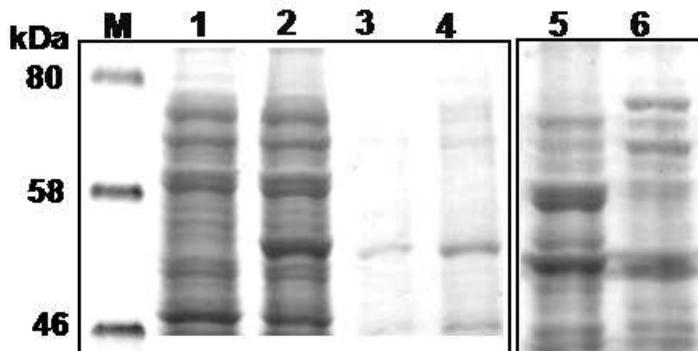


Figura 9 – Eletroforese em SDS-PAGE 10% da purificação de extratos protéicos de *E. coli* transformada com o gene codificante para CgCYP356A1 por cromatografia com resina de níquel (HisTrap™ HP). Linha 1: Extrato de *E. coli* abrigando CgCYP356A1 antes da adição de IPTG. Linha 2: Extrato de *E. coli* contendo CgCYP356A1 após indução com 0,4 mM de IPTG; Linha 3: Fração líquida referente ao segundo patamar de concentração de imidazol (60 mM); Linha 4: Fração líquida correspondente ao gradiente de concentração de imidazol de 60-500 mM; Linha 5: Fração líquida correspondente às proteínas que não se ligaram a resina da coluna; Linha 6: Fração líquida contendo as proteínas eluídas no primeiro patamar de concentração de imidazol (10 mM).

Desta forma, após o procedimento de diálise, as frações que continham a proteína purificada foram agrupadas e concentradas. Nesta etapa da concentração da amostra, a proteína fica retida na parte superior do filtro (não filtrada), cuja exclusão de tamanho era de 30 kDa, a maior parte do líquido, juntamente com as proteínas que atravessam a membrana filtrante, ficam na porção filtrada. Apenas uma pequena quantidade de tampão é retida na parte não filtrada, a qual é utilizada para ressuspender a proteína retida.

Tanto as frações não filtradas quanto à porção filtrada também foram submetidas à análise por SDS-PAGE 10%. O padrão de banda visualizado mostrou que CgCYP356A1 recombinante não foi 100% purificada, mas teve um grau de pureza suficiente para sua utilização na produção de anticorpos policlonais.

5.3. PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS ANTI-CgCYP356A1, WESTERN BLOTTING E DOT BLOTTING

No ensaio de imunização de camundongos utilizados na produção de anticorpos anti-CgCYP356A1, a proteína recombinante purificada, foi diluída na proporção de 1:2 em tampão PBS devido ao fato de não se encontrar totalmente purificada. Uma vez que a proteína de interesse estava mais concentrada do que as proteínas contaminantes, a diluição reduziria a interferência destas últimas no título final dos anticorpos e nos experimentos de imunodeteção.

Após a última dose de imunização, uma padronização do título do soro contendo os anticorpos de interesse foi realizada. Diluições seriadas deste, foram testadas através de ELISA. Os dados mostraram que entre as diluições de 1:6.250 e 1:31.250 do soro houve uma nítida diferença na reação obtida contra a proteína CgCYP356A1 purificada, quando comparada ao controle negativo (extrato de *E. coli* sem a proteína recombinante). As leituras médias foram de 0,840 e 0,418, respectivamente para as diluições especificadas acima, comparando-se com 0,215 e 0,127, para o controle negativo nas respectivas diluições.

Entretanto, foi necessária a determinação de qual diluição seria mais adequada para avaliação da expressão da proteína nativa por meio de imunodeteção. Para isso, foi realizado um *Dot blotting* preliminar (Figura 10), utilizando ainda um soro negativo como controle (camundongo não imunizado). A utilização do soro negativo teve o objetivo de confirmar que o sinal obtido realmente foi consequência da interação da proteína nativa com seu respectivo anticorpo, e não por interações inespecíficas.

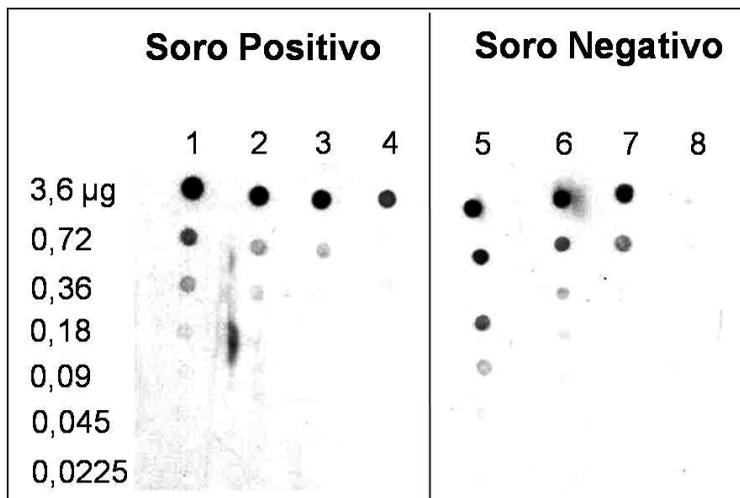


Figura 10 – Ensaio de *Dot blot* referente à padronização da titulação do soro contendo os anticorpos policlonais anti-CgCYP356A1. Soro positivo representa um “pool” de sangue coletado dos três animais imunizados. Soro negativo é o soro obtido a partir de um animal não-imunizado. A diluição da proteína recombinante CgCYP356A1 é mostrada no lado esquerdo da figura. Linha 1 e 5: Anticorpo primário diluído de 1:10.000 e anticorpo conjugado de 1:3.000; Linha 2 e 6: Anticorpo primário na diluição de 1:15.000 e conjugado de 1:3.000; Linha 3 e 7: Diluição do anticorpo primário de 1:10.000 e título do anticorpo conjugado foi 1:6.000; Linha 4 e 8: Anticorpo primário diluído de 1:15.000 e anticorpo conjugado na diluição de 1:6.000.

A padronização do título de anticorpos a ser utilizada mostrou que a diluição de 1 para 15.000 do anticorpo anti-CgCYP356A1 e de 1 para 6.000 do anticorpo conjugado foi a mais adequada para a realização dos ensaios. Nessas condições, foi possível observar que não houve o aparecimento do sinal para o soro negativo, confirmando, portanto, a ausência de interações inespecíficas do anticorpo primário.

Os resultados do *Western blotting* são mostrados na Figura 11, onde um sinal de aproximadamente 57 kDa foi observado tanto para amostras da fração microsomal de brânquias quanto de glândula digestiva. O sutil aumento observado do peso molecular da proteína nativa em relação à proteína recombinante possivelmente é devido à presença da região distando de 27 aminoácidos na região N-terminal, removidos anteriormente aos procedimentos de expressão. Outro fator que pode interferir com essa variação na massa molecular é a presença de alterações pós-traducionais (N-glicosilações e fosforilações).

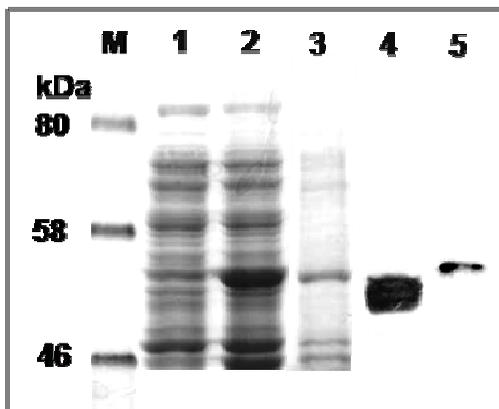


Figura 11 – Expressão recombinante de *CgCYP356A1* em *E. coli*. Linha 1: Eletroforese em SDS-PAGE 10% mostrando extrato de *E. coli* abrigando *CgCYP356A1* antes da adição de IPTG. Linha 2: Eletroforese em SDS-PAGE 10% mostrando extrato de *E. coli* contendo *CgCYP356A1* após indução com 0,4mM de IPTG; Linha 3: Eletroforese em SDS-PAGE 10% mostrando *CgCYP356A1* recombinante purificada por HPLC usando a coluna HP HisTrap™; Linha 4: *Western blotting* da proteína *CgCYP356A1* purificada por HPLC com utilização de coluna HP HisTrap™; Linha 5: *Western blotting* de extratos da fração microsomal de brânquias de *C. gigas*.

Ao observar os resultados do *Western blotting* (Figura 11), verifica-se o aparecimento de banda única, apesar do que normalmente é encontrado na maioria dos ensaios baseados na detecção de P450 por anticorpos. De modo geral, esses estudos resultam em reações cruzadas do anticorpo com proteínas P450 relacionadas, especialmente quando se utiliza anticorpos policlonais, gerando um padrão com muitas bandas. Tal fato dificulta a investigação de uma enzima específica, sendo que uma maneira de contornar esse problema é a produção de anticorpos monoclonais contra a proteína de interesse (EDWARDS *et al.*, 1998).

A maior parte dos estudos com anticorpos monoclonais se limita a investigação de proteínas de vertebrados, como roedores, ou até mesmo o homem. Na tentativa de identificar proteínas P450 com funções relacionadas àquelas dos vertebrados (como por exemplo, enzimas metabolizadoras de xenobióticos com funções semelhantes à de CYP1A), esses anticorpos monoclonais geralmente são usados contra enzimas de invertebrados (um exemplo disso é a utilização de anticorpos monoclonais na identificação de P450 de peixe em experimentos envolvendo invertebrados marinhos, tais como ostras). A interpretação dos resultados gerados por essa estratégia é uma tarefa difícil e

arriscada, visto que esses anticorpos reconhecem proteínas pouco relacionadas devido ao surgimento de reações cruzadas com motivos evolutivamente retidos ou idênticos aos das proteínas desses invertebrados. Podem ocorrer situações em que, mesmo a proteína sendo homóloga à que gerou o anticorpo monoclonal, o reconhecimento por este não acontece. Ou seja, a utilização de anticorpos monoclonais heterólogos nesses tipos de situações é inviável (REWITZ *et al.*, 2006).

Logo, a produção de anticorpos policlonais anti-CgCYP356A1 gerou um resultado extremamente interessante, uma vez que não houve reações cruzadas com outras proteínas, sendo reconhecida especificamente CgCYP356A1. Esse dado configura o anticorpo anti-CgCYP356A1 como um excelente reagente de detecção nas avaliações ecotoxicológicas envolvendo esgoto doméstico, por não reconhecer outras proteínas relacionadas nas condições utilizadas no ensaio. Anticorpos policlonais também podem gerar um padrão de bandas inespecíficos em experimentos de imunodeteção com enzimas P450, fato este que não ocorreu com o anticorpo produzido neste trabalho. Outro fator que ressalta a importância do anticorpo policlonal anti-CgCYP356A1 é a eliminação da necessidade de se utilizar anticorpos heterólogos, cujos quais apresentam algumas desvantagens, conforme explicitado acima.

Técnicas que se utilizam desse anticorpo policlonal anti-CgCYP356A1 poderão, por conseguinte, ser de grande auxílio na caracterização de CgCYP356A1 e determinação de certos parâmetros que auxiliarão no reconhecimento de sua relevância biológica, já que, após este estudo, aumenta-se as expectativas com relação a esta enzima, especialmente no âmbito da toxicologia ambiental.

Neste contexto, o anticorpo policlonal produzido foi utilizado na investigação do perfil de expressão de CgCYP356A1 em animais expostos *in situ* ao esgoto doméstico através de ensaios de *Dot blotting*, baseando-se na técnica de comparação da intensidade dos sinais (“dots”) obtidos (densitometria). Por meio dessa metodologia, gráficos foram gerados com os sinais obtidos após avaliação de amostras submetidas a diferentes tratamentos (Figura 12 e 13). O delineamento experimental utilizado consistia de três diferentes tempos de coleta: T0, T=24horas e T=14dias, sendo que para estes últimos tinham-se dois locais de amostragem, referência e poluído. A expressão de CgCYP356A1 foi avaliada comparativamente, podendo ser visualizado o padrão de expressão desta, antes da exposição e durante a exposição no local contaminado por esgoto em relação àquele considerado não contaminado. Dois tecidos importantes foram utilizados nas análises,

brânquias, as quais estão em contato direto com o ambiente contaminado, e glândula digestiva (análogas ao fígado), que sabidamente está envolvida em mecanismos de detoxificação de contaminantes (UENG, UENG, PARK, 1992).

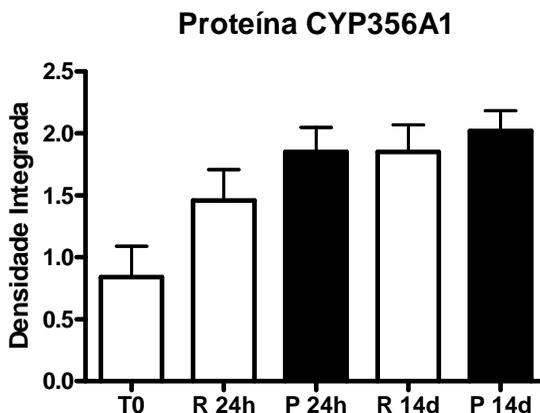


Figura 12 – Análises densitométricas de experimentos de imunodeteccção após exposição *in situ* de *C. gigas* ao esgoto doméstico. Os resultados estão em densidade integrada, e as amostras utilizadas foram fração microsossomal de brânquias. T0 representa animais avaliados antes da exposição; R 24h indica os resultados obtidos do local referência 24 horas após a exposição; P 24h representa os dados encontrados de animais do ponto poluído 24 horas após a exposição; R 14d mostra amostras analisadas a partir local referência 14 dias após a exposição; P 14d indica os resultados do ponto poluído 14 dias após a exposição. As barras representam média \pm desvio padrão, e * indica diferenças significativamente estatísticas ($p < 0,05$).

Os resultados sugerem que não houve diferença estatisticamente significativa na expressão desta enzima em amostras de brânquias para as diferentes condições de exposição e tempos utilizados. Contudo, as amostras dos pontos referência e poluídos apresentam uma expressão ligeiramente maior do que aquelas avaliadas em $t=0$. Quanto às análises realizadas em glândula digestiva, pode-se observar uma diferença significativa no tempo 14 dias para o local poluído. Isto indica um aumento na expressão de CgCYP356A1 em virtude da presença de contaminantes advindos do lançamento de esgoto doméstico neste local. Pode-se inferir, portanto, que o anticorpo policlonal anti-CgCYP356A1 pode ser um importante instrumento na deteccção da presença de contaminantes no ambiente marinho.

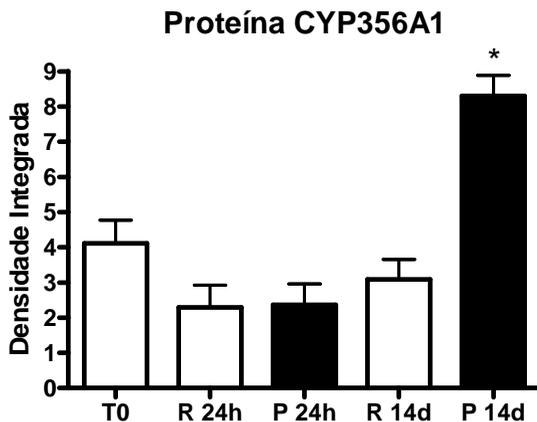


Figura 13 – Análises densitométricas de experimentos de imunodeteccção após exposição *in situ* de *C. gigas* ao esgoto doméstico. Os resultados estão em densidade integrada, e as amostras utilizadas foram fração microssomal de glândula digestiva. T0 representa animais avaliados antes da exposição; R 24h indica os resultados obtidos do local referência 24 horas após a exposição; P 24h representa os dados encontrados de animais do ponto poluído 24 horas após a exposição; R 14d mostra amostras analisadas a partir local referência 14 dias após a exposição; P 14d indica os resultados do ponto poluído 14 dias após a exposição. As barras representam média \pm desvio padrão, e * indica diferenças significativamente estatísticas ($p < 0,05$).

5.4. AVALIAÇÃO DO RNA MENSAGEIRO (RNAm) DE CYP356A1

Em relação aos resultados observados acima, não necessariamente o nível de RNAm de CYP356A1 seguiu um padrão de comportamento semelhante ao da expressão da proteína. Muitos mecanismos de regulação podem estar envolvidos, controlando a meia vida deste RNA de acordo com a necessidade da célula. O gráfico mostrado na Figura 14, indica um comportamento peculiar da quantidade de RNAm nas diferentes situações as quais *C. gigas* foi submetida. As amostras utilizadas neste experimento foram as mesmas testadas na avaliação da expressão da proteína. Logo, dois tempos de exposição foram analisados ($t=24h$ e $t=14d$), sendo que comparou-se o local poluído em relação ao sítio referência para cada tempo determinado. Somente glândula digestiva foi avaliada neste experimento, e pode-se observar uma inibição estatisticamente

significativa da expressão do RNAm de CYP356A1 no local contaminado após 14 dias de exposição, quando comparado ao local referência. Uma pequena redução no nível de RNA dos animais no local contaminado também foi visualizada para o período de exposição de 24h, porém esta não foi significativa.

A redução na expressão do RNAm de CYP356A1 após exposição prolongada ao esgoto poderia ser explicada por um mecanismo pós-transcricional de regulação da expressão do gene. A célula utiliza-se de várias estratégias de controle da expressão gênica, entre elas, a disponibilidade do RNAm, o qual pode estar inacessível a maquinaria de tradução ou por motivos conformacionais (assumindo uma estrutura tridimensional) ou, ainda, por sua rápida degradação. Neste experimento, a inibição da quantidade de RNAm poderia indicar sua degradação após atingir-se um certo nível de proteína ativa. Entretanto, o delineamento experimental utilizado não permite uma extrapolação confiável. Para isso, seria necessário a investigação de tempos de exposição mais curtos, para se acompanhar o real comportamento da transcrição do gene *CYP356A1*.

Porém, é importante salientar que foi exatamente no tempo de 14 dias que foi observado uma maior expressão da proteína no local contaminado (Figura 13), sendo identificada, comparativamente, uma redução na quantidade de RNAm para este mesmo período neste local em relação ao sítio referência. Isto é, sugere-se uma regulação da expressão de CYP356A1 através do controle da quantidade de RNAm disponível na célula, mas as informações não corroboram suficientemente esta afirmação.

Comparando-se a Figura 13 e Figura 14, o padrão observado para o local contaminado durante 14 dias de exposição foi inverso ao encontrado para o mesmo período no local referência. Nesta situação, a quantidade de RNAm foi maior do que em todos os outros tratamentos, ao passo que a expressão da proteína *CgCYP356A1* permaneceu baixa. Tal situação poderia comprovar a hipótese de que os níveis de RNAm de CYP356A1 disponíveis na célula podem estar regulando a expressão da proteína. Porém, devido ao fato de se utilizar um intervalo de tempo muito grande entre as amostragens, não foi possível hipotetizar como a célula poderia estar regulando a expressão do gene *CYP356A1* de glândula digestiva de *C. gigas*.

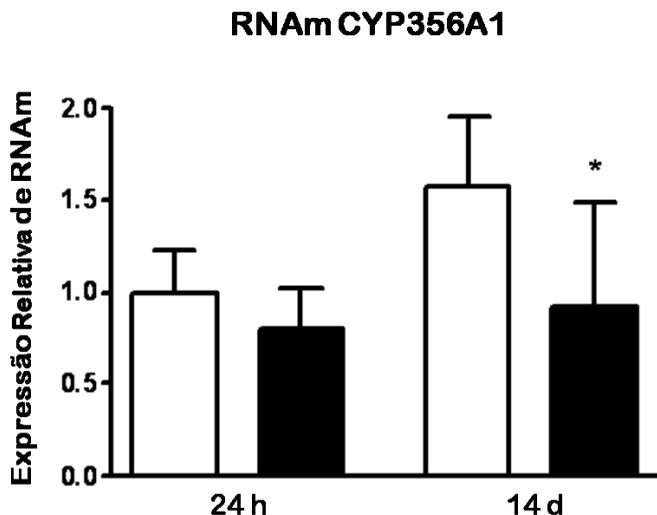


Figura 14 – Transcrição de CYP356A1 em glândula digestiva de *C. gigas* mantida por 24 horas e 14 dias no local referência (barras claras) ou poluído (barras escuras). RT-PCR real-time (Reação de Polimerase em cadeia associada a transcrição reversa) foi desenvolvida com 100 ng de cDNA. O RNA total foi isolado de tecidos após 24 horas ou 14 dias, e então transcrito reversamente em cDNA. O gráfico mostra a expressão de CYP356A1 em relação ao controle (fold induction). Os dados foram normalizados por β -actina. Os valores representam média (\pm desvio padrão) de 6 animais. * $p < 0,05$ – diferenças significativas do grupo do sítio referência com teste *t* Student.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

A ecotoxicologia é um ramo da ciência relativamente recente e que vem se expandindo cada vez mais no mundo. Torna-se evidente quando se observa o quanto os problemas ambientais e a preocupação com os recursos naturais têm ocupado posição de destaque, principalmente diante dos eventos ecológicos enfrentados em todo o mundo, sem comentar as recorrentes catástrofes ecológicas.

A contaminação dos recursos aquáticos por esgoto doméstico se insere neste quadro, e se transforma num ponto crítico devido às condições em que se encontra o saneamento básico em nosso país. A pressão demográfica e a urbanização vêm sendo a fonte dessa poluição, a qual é mais expressiva nas regiões costeiras do país. Ou seja, tal poluição se torna a causa da degradação de um ambiente extremamente rico em biodiversidade e berçário para várias espécies marinhas, o ecossistema estuarino.

A ostra *C. gigas* é uma espécie cujo hábitat é o ambiente estuarino, com enorme relevância econômica e de grande interesse nos estudos de impactos ambientais gerados pela poluição. De modo geral, a utilização de respostas celulares (os biomarcadores moleculares) desse organismo é uma estratégia ecotoxicológica recomendada na avaliação da contaminação ambiental. Recentemente foi identificado, nessa espécie de ostra, um potencial biomarcador de contaminação aquática, CYP356A1. Este teve sua expressão induzida a nível de RNAm, em condições laboratoriais após 48 h de exposição de *C. gigas* ao esgoto doméstico, e a nível de proteína, por meio de experimentos de exposição *in situ*, por 24h e 14 dias. Neste último, o RNAm também foi analisado, mas exibindo um comportamento ambíguo em relação à expressão da proteína.

Para se avaliar o comportamento desta molécula, CYP356A1, tanto a nível de seu RNAm quanto de sua proteína, um conjunto sistematizado de experimentos foram elaborados, os quais passaram pela expressão recombinante da proteína, produção de anticorpos policlonais e imunodeteção da proteína nativa. Os resultados obtidos geraram conclusões importantes e ampliaram as expectativas com relação a novas metodologias que poderiam ser utilizadas na elucidação das principais dúvidas referentes a essa nova isoforma.

Abaixo, segue alguns comentários e conclusões obtidas desse trabalho:

1. Análises computacionais da proteína predita CgCYP356A1 mostraram uma região hidrofóbica N-terminal que se configura como um possível sítio de ancoramento à membrana. Essa região

contém aproximadamente 20 resíduos de aminoácidos e corresponde a 81 pb no cDNA, sendo removida nos passos iniciais da expressão heteróloga;

2. CgCYP356A1 apresentou uma massa molecular de 57 kDa. O fragmento expresso da proteína (sem a região de ancoramento na membrana), porém, apresentou uma massa molecular de aproximadamente 56 kDa, a qual se refere à da proteína de fusão;
3. Existem quatro classes diferentes de citocromo P450, de acordo com seus sítios catalíticos. As análises da sequência de CgCYP356A1 sugerem que ela pertença a classe II, as quais necessitam apenas de uma redutase P450 contendo FAD/FMN para transferência de elétrons;
4. CgCYP356A1 possivelmente apresenta uma localização associada ao retículo endoplasmático;
5. A sequência predita da proteína apresentou um sítio de N-glicosilação e vários de fosforilação, estes últimos podendo estar relacionados à inativação estrutural, atuando como uma marcação para degradação proteossomal dependente de ubiquitina;
6. Os resultados com o teste por HPLC mostraram que CgCYP356A1 recombinante é eluída a partir do segundo patamar de concentração de imidazol (a 60mM), a qual é continuamente removida na rampa de concentração do eluente;
7. A densitometria, após realização de detecção imunológica por *Dot blotting*, mostrou que não houve diferença estatisticamente significativa na expressão desta enzima em amostras de brânquias para as diferentes condições de exposição e tempos utilizados;
8. Foi observado um aumento significativo na expressão de CYP356A1 em glândula digestiva de ostras expostas por 14 dias a efluentes contendo esgoto doméstico;
9. Os níveis de RNAm de *CYP356A1* apresentaram uma diminuição significativa na glândula digestiva das ostras mantidas no local contaminado, quando comparado àquelas que permaneceram no local referência;
10. Hipoteticamente, os níveis de RNAm de CYP356A1 disponíveis em 14 dias de exposição na célula podem estar regulando a expressão da proteína. Porém, as informações obtidas ainda são muito vagas, e necessitam de investigações adicionais;
11. Os dados confirmam a utilização do anticorpo policlonal anti-CgCYP356A1 aqui produzido como útil para os ensaios de avaliação de contaminação aquática por esgoto;

12. Do ponto de vista biotecnológico, os resultados encontrados se destacam por sua aplicabilidade e reprodutibilidade, o que possivelmente poderá permitir avanços no campo ecotoxicológico.

Tais conclusões remetem a algumas perspectivas importantes para este estudo, entre elas:

- Delineamento experimental mais detalhado se faz necessário para os experimentos envolvendo a análise do RNAm. Isto permitiria compreender melhor como o gene *CYP356A1* poderia estar se comportando frente a presença de contaminantes;
- Investigação sobre como a célula poderia estar regulando a expressão de *CYP356A1* via análises de RNAm e de expressão da proteína;
- Estudos adicionais devem ser realizados com o intuito de determinar a função biológica de *CYP356A1*, como regulação da expressão do gene (se é via receptores, por exemplo), substratos, participação em vias metabólicas. Estes, por sua vez, podem ser facilitados pelo uso de anticorpo;
- Experimentos em diferentes grupos de indivíduos, incluindo parâmetros como sexo, estágios da vida, época (ou estação) do ano, poderiam auxiliar na compreensão da importância desta enzima para a espécie *C. gigas*.

REFERÊNCIAS

- AVERY, E. L.; DUNSTAN, R. H.; NELL, J. A. The use of lipid metabolic profiling to assess the biological impact of marine sewage pollution. **Environmental Contamination and Toxicology**, v. 35, p. 229-235, 1998.
- BERTHELIN, C.; KELLNER, K.; MATHIEU, M. Storage metabolism in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in relation to Summer mortalities and reproductive cycle (West Coast of France). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 125, p. 359-369, 2000. Part B.
- BOUTET, I.; TANGUY, A.; MORAGA, D. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hydrocarbon contamination under experimental conditions. **Gene**, v. 329, p. 147-157, 2004a.
- BOUTET, I.; TANGUY, A.; MORAGA, D. Molecular identification and expression of two non-P450 enzymes, monoamine oxidase A and flavin-containing monooxygenase 2, involved in phase I of xenobiotic biotransformation in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1679, p. 29-36, 2004b.
- CORRÊA, A. A.; TOSO, J.; ALBARNAZ, J. D.; SIMÕES, C. M. O.; BARARDI, C. R. M. Detection of *Salmonella typhimurium* in oysters by PCR and molecular hybridization. **Journal of Food Quality**, v. 29, p. 458-469, 2006.
- COUSINOU, M.; NILSEN, B.; LÓPEZ-BAREA, J.; DORADO, G.. New methods to use fish cytochrome P4501A to assess marine organic pollutants. **The Science of the Total Environment**, v. 247, n. 2-3, p. 213-225, 2000.
- EDWARDS, R. J.; ADAMS, D. A.; WATTS, PATRICIA S.; DAVIES, D. S.; BOOBIS, A. R. Development of a Comprehensive Panel of Antibodies against the Major Xenobiotic Metabolising Forms of

Cytochrome P450 in Humans. **Biochemical Pharmacology**, v. 56, p. 377–387, 1998.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). In: FAO Fisheries and Aquaculture Department. **Fisheries and Aquaculture topics**. Disponível em: <<http://www.fao.org/fishery/en>>. Acessado em: 26 novembro 2010.

GASTEIGER, E., GATTIKER, A., HOOGLAND, C., IVANYI, I., APPEL, R.D., BAIROCH, A. ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 31, p. 3784–3788, 2003.

HEDGECOCK, D.; GAFFNEY, P. M.; GOULLETQUER, P.; GUO, X.; REECE, K.; WARR, G. W. The case for sequencing the pacific oyster genome. **Journal of Shellfish Research**, v. 24, p. 429–441, 2005.

HIRAKAWA, S.; IWATA, H.; TAKESHITA, Y.; KIM, E. Y.; SAKAMOTO, T.; OKAJIMA, Y.; AMANO, M.; MIYAZAKI, N.; PETROV, E. A.; TANABE, S. Molecular characterization of cytochrome P450 1A1, 1A2, and 1B1, end effects of pchlorinated dibenzo-*p*-dioxin, dibenzofuran, and biphenyl congeners on their hepatic expression in Baikal Seal (*Pusa sibirica*). **Toxicological Sciences**, v. 97, p. 318–335, 2007.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão, Diretoria de Pesquisas, Coordenação de População e Indicadores Sociais. **Pesquisa Nacional de Saneamento Básico - 2008**, Rio de Janeiro, 2010. 219p.

JANER, G.; PORTE, C. Sex steroids and potencial mechanisms of non-genomic endocrine disruption in invertebrate. **Ecotoxicology**, v. 16, p. 145–160, 2007.

JÖNSSON, E. M.; BRANDT, I.; BRUNSTRÖM, B. Gill filament-based EROD assay for monitoring waterborne dioxin-like pollutants in fish. **Environment Science Technology**, v. 36, p. 3340-3344, 2002.

KLOEPPER-SAMS, P. J.; PARK, S. S.; GELBOIN, H. V.; STEGEMAN, J. J. Specificity and cross-reactivity of monoclonal and polyclonal antibodies against cytochrome P-450E of the marine fish scup. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 253, p. 268-278, 1987.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

MAGALHÃES, D. P.; FERRÃO-FILHO, A. S. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, v. 12, n. 3, p. 355-381, 2008.

MEDEIROS, I. D.; SIEBERT, M. N.; TOLEDO-SILVA, G.; RODRIGUES, T. B., MARQUES, M. R. F.; BAINY, A. C. D. Induced gene expression in oyster *Crassostrea gigas* exposed to sewage. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 26, p. 362-365, 2008a.

MEDEIROS, I. D.; SIEBERT, M. N.; TOLEDO-SILVA, G.; MORAES, M. O.; MARQUES, M. R. F.; BAINY, A. C. D. Differential gene expression in oyster exposed to sewage. **Marine Environmental Research**, v. 66, p. 156-157, 2008b.

MIZUTA, T.; KUBOKAWA, K. Presence of Sex Steroids and Cytochrome P450 Genes in Amphioxus. **Endocrinology**, v. 148, p. 3554–3565, 2007.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI). National Library of Medicine. **NCBI: Taxonomy**. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/taxonomy/>>. Acessado em: 26 novembro 2010.

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

NEUHOFF, V.; AROLDO, N.; TAUBE, D.; RHRHADT, W. Improving staining of protein in polyacrilamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Comassie Brilliant Blue G-250. **Electrophoresis**, v. 9, p. 255-262, 1988.

OUZOUNIS, C. A.; MELVIN, W. T. Primary and secondary structural patterns in eukaryotic cytochrome P-450 families correspond to structures and of the helix-rich domain of *Pseudomonas putida* cytochrome P-450_{cam}: indications for a similar overall topology. **European Journal of Biochemistry**, 198, p. 307-315, 1991.

PETERSON, G.L. A simplification os protein assay metod of Lowry *et al.* which is more generally applicable. **Analytical Biochemistry**, v. 83, p. 346-356, 1977.

REWITZ, K. F.; STYRISHAVE, B.; LØBNER-OLESEN, A.; ANDERSEN, O. Marine invertebrate cytochrome P450: Emerging insights from vertebrate and insect analogies. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 143, p. 363-381, 2006. Part C

SAAVEDRA, C.; BACHÈRE, E. **Bivalve Genomics**. **Aquaculture**, v. 256, p. 1–14, 2006. Review

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3. ed. Nova Iorque: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 3 v.

SERAFIM, C.F.S. (org). **Geografia: o mar no espaço geográfico**. Ministério da Educação, Secretaria de Educação Básica, Brasília, 2005. 304 p. (Coleção explorando o ensino, 8 v.)

SCHMITTGEN, T. e LIVAK, K. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. **Nature Protocols**, v. 3, p. 1101-1108, 2008.

SINGH, S. M.; PANDA, A. K. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 99, p. 303-310, 2005. Review.

SNYDER, M. J. Cytochrome P450 enzymes in aquatic invertebrates: recent advances and future directions. **Aquatic Toxicology**, v. 48, p. 529-547, 2000.

STEGEMAN, J. J.; LECH, J. J. Cytochrome P-450 monooxygenase systems in aquatic species: carcinogen metabolism and biomarkers for carcinogen and pollutant exposure. **Environmental Health Perspectives**, v. 90, p. 101-109, 1991.

TANGUY, A.; BOUTET, I.; LAROCHE, J.; MORAGA, D. Molecular identification and expression study of differentially regulated genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in response to pesticide exposure. **The FEBS Journal**, v. 272, p. 390-403, 2005.

TOLEDO-SILVA, G.; SIEBERT, M. N.; MEDEIROS, I.; SINCERO, T. C.M.; MORAES, M. O.; GOLDSTONE, J. V.; BAINY, A. C. D. Cloning a new cytochrome P450 isoform (CYP356A1) from oyster

Crassostrea gigas. **Marine Environmental Research**, v. 66, p. 15-18, 2008.

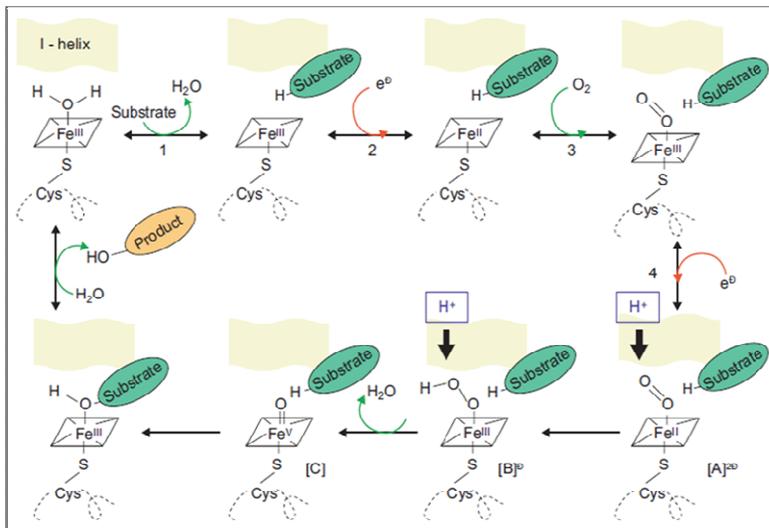
UENG, T.; UENG, Y.; PARK, S. S. Comparative induction of cytochrome P450-dependente monooxygenases in the livers and gills of tilapia and carp. **Aquatic Toxicology**, 23, p. 49-64, 1992.

VALAVANIDIS, A.; VLAHOGIANNI, T.; DASSENAKIS, M.; SCOULLOS, M. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 64, p. 178-189, 2006.

WANG, Y.; LIAO, M.; HOE, N.; ACHARYA, P.; DENG, C.; KRUTCHINSKY, A. N.; CORREIA, M. A. A role for protein phosphorylation in C]cytochrome P450 3A4 ubiquitin-dependent proteasomal degradation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, p. 5671-5684, 2009.

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

ANEXO A – Mecanismo catalítico de enzimas P450



Fonte: Werck-Reichhart e Feyereisen (2000).