

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Biologia Celular e Molecular

**Estudo comparativo da atividade catalítica e expressão protéica do
citocromo P4501A (CYP1A) em cascudos (Loricariidae) e tilápias
(Cichlidae)**

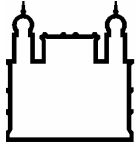
THIAGO ESTEVAM PARENTE MARTINS

Rio de Janeiro
2008

Dissertação MBCM-IOC

TEM Parente

2008



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

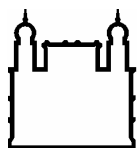
THIAGO ESTEVAM PARENTE MARTINS

**Estudo comparativo da atividade catalítica e expressão protéica do
citocromo P4501A (CYP1A) em cascudos (Loricariidae) e tilápias
(Cichlidae)**

Dissertação apresentada ao Programa de pós-graduação
em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo
Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título
de Mestre em Ciências

Orientador: Prof. Dr. Francisco José Roma Paumgarten

Rio de Janeiro
2008



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

THIAGO ESTEVAM PARENTE MARTINS

**Estudo comparativo da atividade catalítica e expressão
protéica do citocromo P4501A (CYP1A) em cascudos (Loricariidae)
e tilápias (Cichlidae)**

ORIENTADOR: Prof. Dr. Francisco José Roma Paumgarten

Aprovada em: 14/07/2008

EXAMINADORES:

Profa. Dra. Ana Gisele C. Neves-Ferreira - Presidente
Revisora, IOC/FIOCRUZ

Prof. Dra. Ana Maria Rossini Teixeira
Dep. Bioquímica/UERJ

Prof. Dr. Francisco Gerson Araújo
Dep. Biologia Animal/UFRuRJ

Suplentes:

Prof. Dr. Jayme da Cunha Bastos
Dep. Bioquímica /UERJ

Prof. Dr. Richard Hemmi Valente
IOC/FIOCRUZ

Rio de Janeiro, 14 de Julho de 2008

“Nada em biologia faz sentido a não ser à luz da evolução.”

Theodosius Dobzhansky

1900-1975

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Francisco Paumgartten, que me “criou” cientificamente, pelos inúmeros ensinamentos e momentos de diversão laboratorial desde o começo do PROVOC.

A todos do Laboratório de Toxicologia Ambiental, pela amizade e confiança de sempre.

Ao Prof. Dr. Francisco Gerson Araújo e ao Msc. Cláudio Morado, do Laboratório de Ictiologia da UFRuRJ, pela ajuda na coleta dos peixes.

Ao motorista oficial de nossas expedições, José, ao nosso tarrafeiro oficial, Paulo, e aos pescadores “Mineiro” (de Afonso Arinos) e “Parafuso” (de Sta. R. do Jacutinga), sem eles nada teria sido feito!

À estação de Piscicultura da EMATER-RJ em Rio das Flores (Bruno Cerqueira) e ao pessoal do sítio Pouso de Minas (Sr. Geraldo, Sra. Juraci, Sr. Robert, Sra. Márcia) pela manutenção dos peixes durante o período dos tratamentos.

À ETERNIT S/A pela doação das caixas d’água onde os peixes foram mantidos.

To Drs. John Stegeman and Malin Celander for donating CYP1A and CYP3A antibodies.

À equipe do Laboratório de Toxinologia, IOC pela enorme receptividade, em especial aos Drs. Jonas Perales e Alex Chapeaurouge (Henk) e à Dra. e parceira-dinâmica Daniela Beghini, por todo o grande trabalho que tivemos (e ainda vamos ter).

À Dra. Ana Gisele, pela revisão desta dissertação.

Ao Dr. Gustavo Nunan, por dividir dados não publicados, pela identificação das espécies e pela deposição dos testemunhos na coleção do Museu Nacional do Rio de Janeiro.

Antecipadamente, aos membros da banca, pelos comentários e sugestões.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), por cada um dos 24 meses de bolsa.

Ao programa de pós-graduação (BCM) e ao IOC, por todo o apoio e suporte.

À FIOCRUZ, pelo uso das plataformas de Proteômica e de Microscopia Confocal.

E à minha família (mãe, pai, irmã, “madrasta”, avó e também a Mariana, avô, avô, irmã e mãe da Mariana, e ao Bóris, à Darla, ao Dumbo e à Nina) por tudo! Por tudo mesmo! Em especial à minha querida Mãe, por tantas vezes tê-la ... “abandonado” ... em Juiz de Fora e por muitas outras coisas; e à Mariana, por mais um monte de coisas, entre elas, ter lido e opinado em cada parte desta dissertação antes de entregá-la ao Francisco, à revisora e à banca.

À cada um de vocês, o meu **MUITO OBRIGADO!**

RESUMO

Os citocromos P450 (CYP) desempenham importantes papéis na biotransformação de xenobióticos e no metabolismo de substâncias endógenas. A subfamília CYP1A foi bem conservada ao longo da evolução dos vertebrados, tendo sido encontrada em todas as espécies de peixes mandibulados estudadas até o momento. Em trabalho anterior, verificamos que algumas espécies de cascudos da família Loricariidae não apresentavam atividade da etoxiresorufina-O-desetilase (EROD) em microsossomos hepáticos. Como EROD é atividade catalisada predominantemente por CYP1A em diversos vertebrados, esse achado nos motivou a investigar em detalhe os CYP, em especial da subfamília 1A, em cascudos. Este trabalho é um estudo comparativo da capacidade de cascudos (*Hyposthomus luetkeni* e *H. affinis*), tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*; Cichlidae) e camundongos, controles e tratados com indutores conhecidos de CYP1A [50 mg/kg ip; β -naftoflavona (BNF), ou 7-12 dimetil-benzoantraceno (DMBA)] de: i – catalisar diversas reações químicas sabidamente mediadas por CYP, ii – expressar a proteína CYP1A no tecido hepático, e iii – ativar o pró-mutágeno DMBA. Nos microsossomos hepáticos das tilápias e dos camundongos, detectamos atividades constitutivas de EROD e também de desalquilação de outros ésteres da resorufina (MROD, PROD e BROD). Nessas duas espécies, as atividades dessas monooxigenases foram induzidas pelos tratamentos com BNF e DMBA. Nos cascudos, controles e tratados com os indutores de CYP1A, as atividades das alcoxi-resorufina-O-desalquilases não foram detectadas. A atividade da etoxicumarina desetilase (ECOD) foi cerca de cinco vezes maior no fígado de cascudos e de camundongos do que no das tilápias. O CYP1A não parece ter papel importante na catálise de ECOD nessas duas espécies de peixes. Os resultados também mostraram que dois anticorpos anti-CYP1A de peixe reconheceram proteínas com massa molecular compatível com o de CYPs nos microsossomos hepáticos de tilápias e camundongos tratados com indutores de CYP1A. Nos cascudos, entretanto, a detecção de CYP1A por *immunoblotting* com esses anticorpos não foi consistente. Com o emprego de espectrometria de massas, identificamos o CYP1A em microsossomos hepáticos de tilápias induzidas, mas não nos cascudos controles ou induzidos. Em conjunto, os resultados sugerem que, em contraste com o observado com tilápias e camundongos, os cascudos não exibem atividade catalítica de CYP1A e não expressam as proteínas correspondentes no fígado, ou as expressam apenas em níveis constitutivos extremamente baixos. Apesar de não apresentarem atividade catalítica de CYP1A, os cascudos foram capazes de ativar o pró-mutágeno DMBA que, em outras espécies, é ativado por enzimas da família CYP1, em especial das subfamílias 1A e 1B.

PALAVRAS CHAVE: CITOCROMOS P450, CYP1A, AHR, CASCUDOS (LORICARIIDAE), ADAPTAÇÃO AMBIENTAL

ABSTRACT

The cytochrome P450 (CYP) superfamily plays important roles in the biotransformation of xenobiotic and endogenous compounds. The CYP1A subfamily is well conserved in vertebrates and has been found in all jawed fish studied to date. In a previous study, we had found that suckermouth armored catfishes of the Loricariidae family (*Hypostomus luetkeni* and *H. affinis*) did not show ethoxy-resorufin-O-deethylase (EROD) activity in liver microsomes. Since EROD is a marker of CYP1A catalytic activity in vertebrates, this unexpected finding prompted us to investigate in depth the CYP system of loricariid catfishes, particularly the CYP1A subfamily. In this study, we compared the capacities of suckermouth armored catfishes (Loricariidae), Nile tilapias (*Oreochromis niloticus*, Cichlidae) and mice (Swiss Webster), control and treated with CYP1A-inducing agents (50 mg/kg ip β -naphthoflavone, BNF, and 7-12 dimethyl-benzoanthracene, DMBA) to: i - catalyze several activities that are known to be catalyzed by CYPs, ii - express CYP1A protein in liver tissue and iii – activate the pro-mutagen DMBA. In liver microsomes of tilapias and mice, constitutive activities of EROD, and of other alkoxy-resorufin-O-dealkylases (XROD: MROD, PROD and BROD) were found. In the two species, activities of these monooxygenases were induced after treatment with BNF and DMBA. In suckermouth armored catfishes (control and induced) no XROD activities were noted. In liver microsomes of suckermouth catfishes and mice, the ethoxycoumarin-deethylase activity (ECOD) was found to be approximately five-fold the ECOD activity recorded in tilapias. CYP1A apparently did not take part in the catalysis of ECOD reaction in the two fish species. Results also showed that two antibodies against- fish CYP1A recognized liver microsomal proteins with a CYP-compatible molecular weight in induced tilapias and mice. These putative CYP1A proteins, however, were not consistently detected in suckermouth catfish liver microsomes. Taken together, findings from this study suggested that, in contrast to tilapias and mice, suckermouth catfishes do not show CYP1A catalytic activity and do not express, or do express only tiny amounts of constitutive CYP1A proteins in the liver. Although not showing CYP1A catalytic activity in the liver, armored suckermouth catfishes were able to convert the pro-mutagen DMBA into its genotoxic metabolites, a metabolic activation usually mediated by CYP1 family enzymes, in particular, CYP1A and 1B.

Key words: Cytochromes P450, CYP1A, AhR, suckermouth armored catfishes, Loricariidae, Environmental adaptation

LISTA DE ABREVIATURAS

1-D – eletroforese unidimensional

2-D – eletroforese bidimensional

ABC – transportadores ABC

AhR – receptor de hidrocarbonetos aromáticos

AhRR - repressor do receptor de hidrocarbonetos aromáticos

Ala - alanina

aprox. - aproximadamente

Arg - Arginina

Arnt - translocador nuclear do receptor de hidrocarbonetos aromáticos

Asp – ácido aspártico

bHLH-PAS – hélice básica, volta, hélice-período, translocador nuclear do receptor de hidrocarbonetos aromáticos, mente única

BNF - β -naftoflavona

BROD - benziloxiresorufina-O-desetilase

BSA - albumina sérica bovina

CAR - receptor constitutivo de androstano

CAT - catalase

CB - tratado com 50mg/kg de BNF

CC – cascudo controle

CD - tratado com 50mg/kg de DMBA

CYP - citocromos P450

CYP1A - citocromos P4501A

CYP1A1 - citocromos P4501A1

CYP1A2 - citocromos P4501A2

CYP2B - citocromos P4502B

CYP2C - citocromos P4502C

CYP3A - citocromos P4503A

Cys - cisteína

DMBA - 7-12 dimetil-benzoantraceno

DNA – ácido desoxirribonucléico

ECOD - etoxicumarina-O-desetilase

Em. - emissão

EMATER-RJ – Empresa de assistência técnica e extensão rural do estado do Rio de Janeiro

EROD - etoxiresorufina-O-desetilase

Glu – ácido glutâmico

Gly - glicina

GST – glutationa-s-transferase

HSP90 - proteína de choque térmico de 90 kDa

i.p. - injeção intraperitoneal

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

Km – constante de Michaelis Menten

Lat. - latitude

Long. - longitude

m/z – relação massa carga

MALDI-TOF/TOF – Espectrômetria de massas usando dessorção a laser assistida por matriz e tempo de voo, tempo de voo

MB – camundongo tratado com 50mg/kg de BNF

MC – camundongo controle

Met - metionina

mRNA - RNA mensageiro

MROD - metoxiresorufina-O-desetilase

NADPH – nicotinamida adeninad nucleotídeo fosfato

NCBI – Centro Nacional de Informação em Biotecnologia (EUA)

PAH - hidrocarbonetos poliaromáticos

PBRU – elemento responsivo ao fenobarbital

PCB - bifenilas policloradas

PCR - reação em cadeia da polimerase

PDB – banco de dados de proteínas

pH – potencial hidrogeniônico

pHAH - hidrocarbonetos aromáticos polihalogenados

PROD - pentoxiresorufina-O-desetilase

PXR - receptor pregnano X

PXRE – elementos responsivos ao receptor pregnano X

RC – rato controle

RT – rato tratado com BNF

SDS – dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

Ser - serina

spf - livres de patógenos específicos

TB – tilápia tratado com 50mg/kg de BNF

TC – tilápia controle

TCB – 3,3'-4,4' bifenila tetraclorada

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

TD - tratado com 50mg/kg de DMBA

Thr - treonina

Tyr - tirosina

UDPGT – uridina difosfato glicoroniltransferase

V_{máx} – velocidade máxima

XRE - elementos responsivos a xenobióticos

XROD – EROD, MROD, PROD, BROD

α-NF – α-naftoflavona

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

- Figura 1.1)** Esquema geral da biotransformação de xenobióticos. Adaptado de (Goldstone et al., 2006)2
- Figura 1.2)** Estrutura tri-dimensional do CYP1A2 de humanos co-cristalizada com o inibidor, α -naftoflavona, α -NF (PDB: 2HI4). a) visão frontal, b) visão superior, c) visão inferior, d) visão da direita, e) visão da esquerda, f) visão do canal de acesso 1, g) visão do canal de acesso 2, h) detalhe da ligação do ferro da protoporfirina com a cisteína e i) detalhe da interação entre o grupo heme e o ligante (α -NF). α -hélices em azul, folhas β em verde, protoporfirina em amarelo, átomo de ferro e o resíduo de cisteína 458 em vermelho e a α -NF em magenta. Estruturas geradas no programa JMOL (<http://www.jmol.org/>) e as imagens “renderizadas” no POV-ray (<http://www.povray.org/>)5
- Figura 1.3)** Esquema ilustrativo das diversas funções dos citocromos P450 no metabolismo endógeno e na interação entre os organismos e o ambiente. Adaptado de (Stegeman e Livingstone, 1998)6
- Figura 1.4)** Esquema do ciclo catalítico dos citocromos P450. Adaptado de (Werck-Reichhart e Feyereisen, 2000)8
- Figura 1.5)** Esquema do mecanismo de indução de CYP via os receptores AhR, PXR e CAR10
- Figura 1.6)** Cladograma da evolução dos teleósteos segundo o projeto *Tree of life* (<http://tolweb.org/tree/phylogeny.html>). Inciso: Cladograma da evolução dos cordados adaptado de (Hahn, 1998)19
- Figura 3.1)** Peixes coletados para estudo: a) Tilápia, *Oreochromis niloticus*; b) Cascudo, *Hypostomus luetkeni*; e c) Cascudo, *Hypostomus affinis*24
- Figura 3.2:** Tanques de depuração, a) da estação de piscicultura da EMATER em Rio das Flores, onde cascudos e tilápias foram mantidos durante o primeiro experimento e b) no sítio Pouso de Minas, onde cascudos foram mantidos durante o segundo experimento24
- Figura 3.3)** Tratamento via intraperitoneal de tilápias e cascudos com BNF ou DMBA25
- Figura 3.4)** Estruturas químicas da a) β -naftoflavona (BNF) e b) do 7-12 dimetil-benzoantraceno (DMBA)26
- Figura 3.5)** Esquema das atividades enzimáticas avaliadas neste trabalho31
- Figura 4.1)** Efeito da β -naftoflavona (BNF, 50 mg/kg ip) e do 7,12-dimetilbenzoantraceno (DMBA, 50 mg/kg ip) sobre a atividade da etoxiresorufina-*O*-desetilase (EROD) em microsossomos hepáticos de camundongos (*Swiss Webster*), cascudos (*H. luetkeni*) e tilápias (*O. niloticus*). a) Camundongos: controles (MC) e tratados, 1 (MB1), 3 (MB3) e 7 (MB7) dias após a injeção de BNF; b) Cascudos: controles (CC) e tratados, 1 (CB1, CD1), 3 (CB3, CD3) e 7 (CB7, CD7) dias após a injeção de BNF (B) ou DMBA (D); c) Tilápias: controles (TC) e tratadas, 1 (TB1, TD1), 3 (TB3, TD3) e 7 (TB7, TD7) dias após a injeção de BNF (B) ou, DMBA (D). Os dados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do teste *a posteriori* de Dunn's. As diferenças em relação ao respectivo grupo controle foram assinaladas por asterisco (*: $p < 0.05$)41
- Figura 4.2)** Efeito da β -naftoflavona (BNF, 50 mg/kg ip) e do 7,12-dimetilbenzoantraceno (DMBA, 50 mg/kg ip) sobre a atividade da metoxiresorufina-*O*-desetilase (MROD) em microsossomos hepáticos de camundongos (*Swiss Webster*), cascudos (*H. luetkeni*) e tilápias (*O. niloticus*). a) Camundongos: controles (MC) e tratados, 1 (MB1), 3 (MB3) e 7 (MB7) dias após a injeção de BNF; b) Cascudos: controles (CC) e tratados, 1 (CB1, CD1), 3 (CB3, CD3) e 7 (CB7, CD7) dias após a injeção de BNF (B) ou DMBA (D); c) Tilápias: controles (TC) e tratadas, 1 (TB1, TD1), 3 (TB3, TD3) e 7 (TB7, TD7) dias após a injeção de BNF (B) ou, DMBA (D). Os dados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do teste *a posteriori* de Dunn's. As diferenças em relação ao respectivo grupo controle estão assinaladas por asterisco (*: $p < 0.05$)43
- Figura 4.3)** Efeito da β -naftoflavona (BNF, 50 mg/kg ip) e do 7,12-dimetilbenzoantraceno (DMBA, 50 mg/kg ip) sobre a atividade da pentoxiresorufina-*O*-desetilase (PROD) em microsossomos hepáticos de camundongos (*Swiss Webster*), cascudos (*H. luetkeni*) e tilápias (*O. niloticus*). a) Camundongos: controles (MC) e tratados, 1 (MB1), 3 (MB3) e 7 (MB7) dias após a injeção de BNF; b) Cascudos: controles (CC) e tratados, 1 (CB1, CD1), 3 (CB3, CD3) e 7 (CB7, CD7) dias após a injeção de BNF (B) ou DMBA (D); c) Tilápias: controles (TC) e tratadas, 1 (TB1, TD1), 3 (TB3, TD3) e 7 (TB7, TD7) dias após a injeção de BNF (B) ou, DMBA (D). Os dados

foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do teste *a posteriori* de Dunn's. As diferenças em relação ao respectivo grupo controle estão assinaladas por asterisco (*: $p < 0.05$)45

Figura 4.4) Efeito da β -naftoflavona (BNF, 50 mg/kg ip) e do 7,12-dimetilbenzoantraceno (DMBA, 50 mg/kg ip) sobre a atividade da benziloxiresorufina-*O*-desetilase (BROD) em microsossomos hepáticos de camundongos (*Swiss Webster*), cascudos (*H.luetkeni*) e tilápias (*O. niloticus*). a) Camundongos: controles (MC) e tratados, 1 (MB1), 3 (MB3) e 7 (MB7) dias após a injeção de BNF; b) Cascudos: controles (CC) e tratados, 1 (CB1, CD1), 3 (CB3, CD3) e 7 (CB7, CD7) dias após a injeção de BNF (B) ou DMBA (D); c) Tilápias: controles (TC) e tratadas, 1 (TB1, TD1), 3 (TB3, TD3) e 7 (TB7, TD7) dias após a injeção de BNF (B) ou, DMBA (D). Os dados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do teste *a posteriori* de Dunn's. As diferenças em relação ao respectivo grupo controle estão assinaladas por asterisco (*: $p < 0.05$)47

Figura 4.5) Efeito da β -naftoflavona (BNF, 50 mg/kg ip) e do 7,12-dimetilbenzoantraceno (DMBA, 50 mg/kg ip) sobre a atividade da etoxicumarina-*O*-desetilase (ECOD) em microsossomos hepáticos de camundongos (*Swiss Webster*), cascudos (*H.luetkeni*) e tilápias (*O. niloticus*). a) Camundongos: controles (MC) e tratados, 1 (MB1), 3 (MB3) e 7 (MB7) dias após a injeção de BNF; b) Cascudos: controles (CC) e tratados, 1 (CB1, CD1), 3 (CB3, CD3) e 7 (CB7, CD7) dias após a injeção de BNF (B) ou DMBA (D); c) Tilápias: controles (TC) e tratadas, 1 (TB1, TD1), 3 (TB3, TD3) e 7 (TB7, TD7) dias após a injeção de BNF (B) ou, DMBA (D). Os dados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do teste *a posteriori* de Dunn's. As diferenças em relação ao respectivo grupo controle estão assinaladas por asterisco (*: $p < 0.05$)50

Figura 4.6) Influência do pH (6,5; 7,8; 8,5) sobre as atividades de EROD (a), MROD (b), PROD (c) e BROD (d) em microsossomas hepáticos de tilápias (*O. niloticus*) (●) e cascudos (*H.luetkeni*) (○) mortos 3 dias após a administração de DMBA 50 mg/kg ip (n=5). Temperatura: 30°C; Quantidade de proteína por poço: 25 μ g. Tempo de reação: 10 minutos, Concentração de substrato = 5 μ M53

Figura 4.7) Influência da temperatura (20, 30, 37°C) sobre as atividades de EROD (a), MROD (b), PROD (c) e BROD (d) na fração microsossomal hepática de tilápias (*O. niloticus*) (●) mortas 7 dias após o tratamento com BNF e cascudos (*H.luetkeni*) (○) mortos 1 dias após a administração de BNF 50 mg/kg ip (n=5). pH: 7,8; Quantidade de proteína por poço: 25 μ g. Concentração de substrato = 5 μ M; tempo de reação: 10 minutos54

Figura 4.8) Acúmulo de resorufina produzida a partir da etoxiresorufina (EROD) com o prolongamento do tempo de reação (1, 2, 5, 10 e 15 minutos) em microsossomas hepáticos de tilápias (*O. niloticus*) (●) e cascudos (*H.luetkeni*) (○) n=5. pH = 7,8; Temperatura: 30°C; Quantidade de proteína por micro-poço: 25 μ g, Concentração de substrato = 5 μ M55

Figura 4.9) Relação entre o acúmulo da resorufina produzida a partir da etoxiresorufina (EROD) e a quantidade de proteína microsossomal hepática adicionada (25, 50, 100 μ g de proteína) aos poços. Foram usados microsossomos hepáticos de tilápias (*O. niloticus*) (●) e cascudos (*H.luetkeni*) n=5 (○). Tempo de incubação = 10 minutos, pH = 7,8; Temperatura: 30°C; Concentração de substrato = 5 μ M57

Figura 4.10) Gráfico de Michaelis-Menten da atividade da etoxiresorufina-*O*-desetilase (EROD) em microsossomos hepáticos de tilápia (*O. niloticus*) controle na ausência e na presença de α -NF (0,1 e 1 nM). Inserção: Gráfico de Lineweaver-Burk para a transformação linear da curva de Michaelis-Menten e cálculo de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ 59

Figura 4.11) Gráfico de Michaelis-Menten da atividade da etoxicumarina-*O*-desetilase (ECOD) em microsossomos hepáticos de a) tilápia (*O. niloticus*) e b) cascudo (*H.luetkeni*) controles na ausência e na presença de α -NF (0,1 e 1 nM). Inserção: Gráfico de Hanes-Woolf para a transformação linear da curva de Michaelis-Menten e cálculo de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ 60

Figura 4.12) Atividade da etoxicumarina-*O*-desetilase (ECOD) em microsossomos hepáticos de cascudos (*H.affinis*) tratados com BNF (50 mg/kg ip) e mortos durante o dia (n=5) ou durante a noite (n=4)62

Figura 4.13) *Imunoblotting* de proteínas microsossomais de rato, camundongo, cascudo (*H.luetkeni*) e tilápia (*O. niloticus*) usando o anticorpo monoclonal (Mab 1-12-3) anti-CYP1A. Em todos os poços foram colocados 20 μ g de proteína total. RC: rato controle; RT: rato tratado com BNF; MC: camundongo controle; MT: camundongo tratado com BNF; CC: *pool* dos cascudos do grupo controle; CB: *pool* dos cascudos do grupo tratado com BNF 50 mg/kg ip (mortos 1, 3 e 7 dias após o tratamento); CD: *pool* dos cascudos do grupo tratado com DMBA 50 mg/kg ip (mortos 1, 3 e 7 dias após o tratamento); TC: *pool* das tilápias do grupo controle; TB: *pool* das tilápias

do grupo tratado com BNF 50 mg/kg ip (mortas 1, 3 e 7 dias após o tratamento); TD: <i>pool</i> das tilápias do grupo tratado com DMBA 50 mg/kg ip (mortas 1, 3 e 7 dias após o tratamento)	65
Figura 4.14) <i>Imunoblotting</i> de proteínas microsossomais de cascudo (<i>H.luetkeni</i>) e tilápia (<i>O. niloticus</i>) usando o anticorpo monoclonal (MAb 1-12-3) anti-CYP1A. CC: <i>pool</i> dos cascudos do grupo controle; CB: <i>pool</i> dos cascudos do grupo tratado com BNF 50 mg/kg ip (mortos três dias após a injeção); TC: <i>pool</i> das tilápias do grupo controle. Foram aplicadas ao gel três diferentes quantidades de proteína microsossomal (20, 50 ou 100 µg) para cada grupo como mostrado na figura	66
Figura 4.15) <i>Imunoblotting</i> de proteínas microsossomais de camundongo, cascudo (<i>H.luetkeni</i>) e tilápia (<i>O. niloticus</i>) usando o anticorpo monoclonal (MAb 1-12-3) anti-CYP1A. Em todos os poços foram colocados 40 µg de proteína. PMM: padrão de massa molecular; MC: camundongo controle; CC: cascudos do grupo controle; CD: cascudos do grupo tratado com DMBA 50 mg/kg ip (mortos 1, 3 e 7 dias após a injeção); TC: tilápia do grupo controle	66
Figura 4.16) <i>Imunoblotting</i> de proteínas microsossomais de camundongo, cascudo (<i>H.luetkeni</i>) e tilápia (<i>O. niloticus</i>) controles usando o anticorpo monoclonal (MAb 1-12-3) anti-CYP1A. Em todos os poços foram colocados 50 µg de proteína. MC: camundongo controle; CC: cascudos do grupo controle; TC: tilápia do grupo controle	67
Figura 4.17) <i>Imunoblotting</i> de proteínas microsossomais de camundongo, cascudo (<i>H.luetkeni</i>) e tilápia (<i>O. niloticus</i>) controles usando o anticorpo monoclonal (MAb 1-12-3) anti-CYP1A. Em todos os poços foram colocados 20 µg de proteína. MB: camundongo tratado com BNF (mortos 3 dias após a injeção); CB: cascudos do grupo tratado com BNF 50 mg/kg ip (mortos 3 dias após a injeção); TB: tilápias do grupo tratado com BNF 50 mg/kg ip (mortas 3 dias após a injeção)	67
Figura 4.18) <i>Imunoblotting</i> de proteínas microsossomais de camundongo, cascudo (<i>H.luetkeni</i>) e tilápia (<i>O. niloticus</i>) controles usando o anticorpo monoclonal (MAb 1-12-3) anti-CYP1A. MB: camundongo tratado com BNF 50 mg/kg ip (mortos 24 horas após a injeção); CB: cascudos do grupo tratado com BNF 50 mg/kg ip (mortos 24 horas após a injeção); TB: tilápias do grupo tratado com BNF 50 mg/kg ip (mortas 24 horas após a injeção). Foram aplicadas ao gel as seguintes quantidades de proteína microsossomal: 10 µg para as amostras de camundongo, 50 µg para as amostras de cascudo e 5 µg para as amostras de tilápias	68
Figura 4.19) <i>Imunoblotting</i> de proteínas microsossomais de camundongo, cascudo (<i>H.luetkeni</i>) e tilápia (<i>O. niloticus</i>) usando o anticorpo monoclonal (MAb 1-12-3) anti-CYP1A. Em todos os poços foram colocados 40 µg de proteína (exceto TB = 10 µg). PPM: padrão de massa molecular; MC: camundongo controle; CC: cascudos do grupo controle; CB: cascudos do grupo tratado com DMBA 50 mg/kg ip (mortos 1, 3 e 7 dias após a injeção); TC: tilápia do grupo controle; TB: tilápia do grupo tratado com BNF 50 mg/kg ip (morta 24 horas após a injeção)	68
Figura 4.20) <i>Imunoblotting</i> usando o anticorpo policlonal anti-CYP1A (CP-226 Biosense®) mostrando algumas das espécies onde esse anticorpo foi usado para a detecção do CYP1A. Nota-se a presença de bandas inespecíficas e o não reconhecimento do CYP1A em peixes controles de diversas espécies. Fonte: Folha de informações sobre o produto (www.biosense.com)	71
Figura 4.21) <i>Imunoblotting</i> de proteínas microsossomais de rato <i>Wistar</i> , camundongo, cascudo (<i>H.luetkeni</i>) e tilápia (<i>O. niloticus</i>) usando o anticorpo policlonal CP-226 anti-CYP1A. Em todos os poços foram colocados 20 µg de proteína. RC: rato controle; RT: rato tratado com BNF (50 mg/kg/dia ip x 3 dias); MC: camundongo controle; MB: camundongo tratado com BNF (50 mg/kg ip); CC: <i>pool</i> dos cascudos do grupo controle; CB: <i>pool</i> dos cascudos do grupo tratado com BNF 50 mg/kg (mortos 1, 3 e 7 dias após a injeção); CD: <i>pool</i> dos cascudos do grupo tratado com DMBA 50 mg/kg ip (mortos 1, 3 e 7 dias após a injeção); TC: <i>pool</i> das tilápias do grupo controle; TB: <i>pool</i> das tilápias do grupo tratado com BNF 50 mg/kg ip (mortas 3 dias após a injeção); TD: <i>pool</i> das tilápias do grupo tratado com DMBA 50 mg/kg ip (mortas 3 dias após a injeção)	71
Figura 4.22) <i>Imunoblotting</i> de proteínas microsossomais de cascudo (<i>H.luetkeni</i>) e tilápia (<i>O. niloticus</i>) usando o anticorpo policlonal CP-226 anti-CYP1A. CC: <i>pool</i> dos cascudos do grupo controle; CB: <i>pool</i> dos cascudos do grupo tratado com BNF 50 mg/kg ip (mortos três dias após a injeção); TC: <i>pool</i> das tilápias do grupo controle. Foram aplicadas ao gel três diferentes quantidades de proteína microsossomal (20, 50 ou 100 µg) para cada grupo como mostrado na figura	72

Figura 4.23) <i>Imunoblotting</i> de proteínas microsossomais de camundongo <i>Swiss Webster</i> , cascudo (<i>H. luetkeni</i>) e tilápia (<i>O. niloticus</i>) usando o anticorpo policlonal CP-226 anti-CYP1A. Em todos os poços foram colocados 40 µg de proteína (exceto TB = 10 µg). PMM: padrão de massa molecular; MC: camundongo controle; CC: cascudos do grupo controle; CB: cascudos do grupo tratado com DMBA 50 mg/kg ip (mortos 1, 3 e 7 dias após a injeção); TC: tilápia do grupo controle; TB: tilápia do grupo tratado com BNF 50 mg/kg ip (morta 24 horas após a injeção)72	72
Figura 4.24) <i>Imunoblotting</i> de proteínas microsossomais de camundongo, cascudo (<i>H. luetkeni</i>) e tilápia (<i>O. niloticus</i>) usando o anticorpo policlonal CP-226 anti-CYP1A. Em todos os poços foram colocados 40 µg de proteína. MC: camundongo controle; CC: cascudos do grupo controle; CD: cascudos do grupo tratado com DMBA 50 mg/kg ip (mortos 1, 3 e 7 dias após a injeção); TC: tilápia do grupo controle73	73
Figura 4.25) <i>Imunoblotting</i> de proteínas microsossomais de rato, camundongo, cascudo (<i>H. luetkeni</i>) e tilápia (<i>O. niloticus</i>) usando o anticorpo policlonal anti-CYP3A. Em todos os poços foram colocados 20 µg de proteína. RC: rato controle; MC: camundongo controle; CC: cascudos do grupo controle; CD: cascudos do grupo tratado com DMBA 50 mg/kg ip (mortos 24 horas após a injeção); TC: tilápia do grupo controle; TD: tilápias do grupo tratado com DMBA 50 mg/kg ip (mortas 24 horas após a injeção)74	74
Figura 4.26) <i>Imunoblotting</i> de proteínas microsossomais de rato, camundongo, cascudo (<i>H. luetkeni</i>) e tilápia (<i>O. niloticus</i>) usando o anticorpo policlonal anti-CYP3A. Em todos os poços foram colocados 50 µg de proteína. MC: camundongo controle; CC: cascudos do grupo controle; CD: cascudos do grupo tratado com DMBA 50 mg/kg ip (mortos três dias depois da injeção); TC: tilápia do grupo controle; TD: tilápias do grupo tratado com DMBA 50 mg/kg ip (mortas 3 dias após a injeção)75	75
Figura 4.27) Gel de poliacrilamida 10% corado com Coomassie R-250. As bandas localizadas na região entre 45-66 kDa foram cortadas para identificação. MC: camundongo controle, MB: camundongo tratado com BNF, CC: cascudo controle, CB: cascudo tratado com BNF, CD: cascudo tratado com DMBA, TC: tilápia controle, TB: tilápia tratada com BNF e TD: tilápia tratada com DMBA77	77
Figura 4.28: Espectros de massas dos fragmentos trípticos do CYP1A identificado em tilápias. a) espectro MS (fingerprinting); b) espectro MS/MS que identificou a seqüência SLSFSTDQAGIWR; e c) espectro MS/MS que identificou a seqüência LVTEHYATFDKNI79	79
Tabela 4.1: Comprimento (CM), peso corporal (G) e peso do fígado (G), dos peixes e camundongos utilizados (média ± DP)38	38
Tabela 4.2: Comprimento (CM) e pesos (G) do corpo, do fígado, do intestino, do coração e das brânquias dos cascudos (<i>H. AFFINIS</i>) utilizados (média ± DP)38	38
Tabela 4.3: Freqüência de eritrócitos com micronúcleos no sangue periférico de tilápias (<i>O. NILOTICUS</i>) e cascudos (<i>H. LUETKENI</i>) controles (0) e tratados com DMBA (50 MG/KG IP), 1, 3 e 7 dias após o tratamento39	39
Tabela 4.4) Efeitos da β-naftoflavona (BNF 50 mg/kg ip) e do 7,12-dimetilbenzoantraceno (DMBA 50 mg/kg ip) sobre as atividades (médias ± D.P.) de EROD, MROD, PROD, BROD e ECOD em microsomas hepáticos de camundongos Suíços (BNF apenas), cascudos (<i>H. luetkeni</i>) e tilápias (<i>O. niloticus</i>), 1, 3 e 7 dias após o tratamento. Os fatores de indução (FI = atividade média do tratado / atividade média do controle) são mostrados entre parênteses51	51
Tabela 4.5) Proteínas identificadas por MALDI-TOF/TOF em cada banda cortada de gel 1D de acordo com as amostras de cascudos e tilápias78	78

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	v
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
LISTA DE FIGURAS E TABELAS	xi
SUMÁRIO	xv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 BIOTRANSFORMAÇÃO DE XENOBIÓTICOS	1
1.2 CITOCROMOS P450	3
1.2.1 <i>Formas e Funções</i>	3
1.2.2 <i>Evolução molecular e o papel do ambiente na diversificação</i>	6
1.2.3 <i>Mecanismo de reação</i>	7
1.2.4 <i>Indução dos citocromos P450</i>	9
1.2.5 <i>Citocromo P4501A (CYP1A)</i>	14
1.3 CITOCROMOS P450 EM PEIXES	15
1.3.1 <i>CYP1A - o mais estudado</i>	15
1.3.2 <i>Indução de CYP em peixes</i>	16
1.3.3 <i>Resistência adquirida à indução de CYP1A</i>	16
1.3.4 <i>Resistência natural à indução do CYP1A</i>	17
1.4 CLASSIFICAÇÃO DOS PEIXES	19
1.4.1 <i>Os Acanthomorpha</i>	20
1.4.2 <i>Os Ostariophysi</i>	20
2. OBJETIVOS	21
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
3. MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 COLETA DOS PEIXES	23
3.2 EXPOSIÇÃO AOS XENOBIÓTICOS	25
3.3 EUTANÁSIA E DISSECÇÃO	27
3.4 CAMUNDONGOS SUÍÇOS	27
3.5 AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE DO DMBA EM CASCUDOS E TILÁPIAS	28
3.6 PREPARO DA FRAÇÃO MICROSSOMAL	28
3.7 DOSAGEM DE PROTEÍNAS TOTAIS	29
3.8 DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS	29
3.8.1 <i>Alcoxiressorufina-O-desaquilases</i>	29
3.8.2 <i>Etoxicumarina-O-desetilase (ECOD)</i>	30
3.8.3 <i>Determinação da velocidade máxima ($V_{máx}$), constante de Michaelis-Menten (K_m) e inibição enzimática</i>	32
3.8.4 <i>Fixação do pH, temperatura, concentração de proteínas e tempo de reação</i>	32
3.9 ELETROFORESE UNIDIMENSIONAL	33
3.10 WESTERN-BLOTTING E IMUNORREVELAÇÃO	33
3.11 EXCISÃO DAS BANDAS E DIGESTÃO ENZIMÁTICA PARA IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS	34
3.12 MALDI-TOF/TOF E IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS	34
3.13 ESTATÍSTICA	35
4. RESULTADOS	37
4.1 EFEITO CLASTOGÊNICO DO DMBA EM TILÁPIAS E CASCUDOS	37
4.2 ATIVIDADE DE MONOOXIGENASES HEPÁTICAS EM TILÁPIAS E CASCUDOS	39
4.2.1 <i>Etoxiressorufina-O-desetilase (EROD)</i>	39
4.2.2 <i>Metoxiressorufina-O-desmetilase (MROD)</i>	42

4.2.3	<i>Pentoxiresorufina-O-despenteilase (PROD)</i>	44
4.2.4	<i>Benziloxiresorufina-O-desbenzilase (BROD)</i>	46
4.2.5	<i>Etoxicumarina-O-desetilase (ECOD)</i>	48
4.3	ATIVIDADE DAS ALCOXI-RESORUFINA-O-DESALQUILASES (EROD, MROD, PROD E BROD) EM MICROSSOMAS HEPÁTICOS DE CASCUDOS E TILÁPIAS: INFLUÊNCIA DO pH, DA TEMPERATURA E DA QUANTIDADE DE PROTEÍNA	52
4.3.1	<i>Influência do pH</i>	52
4.3.2	<i>Influência da temperatura</i>	53
4.3.3	<i>Linearidade da reação: acúmulo do produto (resorufina) versus tempo de reação</i>	54
4.3.4	<i>Influência da quantidade de proteínas</i>	56
4.3.5	<i>Determinação do Km e V_{max} da etoxiresorufina-O-desetilase (EROD) e etoxicumarina-O-desetilase (ECOD) em microssomos hepáticos de tilápias (O. niloticus) e cascudos (H. luetkeni)</i>	57
4.4	EFEITO DA α-NAFTOFLAVONA SOBRE AS ATIVIDADES DE EROD EM MICROSSOMOS HEPÁTICOS DE TILÁPIAS (<i>O. niloticus</i>) E DE ECOD EM MICROSSOMAS HEPÁTICOS DE CASCUDOS (<i>H. luetkeni</i>) E TILÁPIAS	58
4.5	INVESTIGAÇÃO DA VARIAÇÃO CIRCADIANA DAS ATIVIDADES DE MONOOXIGENASES EM MICROSSOMOS HEPÁTICOS DE CASCUDO (<i>H. affinis</i>)	61
4.6	ATIVIDADE DE ALCOXI-RESORUFINA-O-DESALQUILASES (XROD) E DA ETOXICUMARINA-O-DESETILASE (ECOD) EM TECIDOS EXTRA-HEPÁTICOS DE CASCUDO (<i>H. affinis</i>)	61
4.7	IMMUNOBLOTTING	62
4.7.1	<i>Immunoblotting com anticorpo monoclonal anti-CYP1A (MAb 1-12-3)</i>	62
4.7.2	<i>Immunoblotting com anticorpo policlonal anti-CYP1A (CP-226, Biosense®)</i>	69
4.7.3	<i>Immunoblotting com anticorpo policlonal anti-CYP3A</i>	73
4.8	PROTEÔMICA	75
5.	DISCUSSÃO	80
5.1	PROTEÍNAS CYP1A SÃO OU NÃO SÃO EXPRESSAS NO FÍGADO DE CASCUDOS?	80
5.2	CONVERSÃO DO DMBA EM METABÓLITOS GENOTÓXICOS NOS CASCUDOS	86
6.	CONCLUSÕES	87
7.	PERSPECTIVAS	89
	ANEXO 1 – Tabela completa com a identificação das proteínas por MALDI-TOF/TOF	90
	ANEXO 2 - Trabalhos publicados no período do mestrado	99
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100

1. INTRODUÇÃO

Os ecossistemas são ambientes dinâmicos que passam por constantes alterações em sua composição física, química e biológica. O impacto das atividades humanas sobre o ambiente tem aumentado a intensidade e a velocidade das variações dos ecossistemas (Grimm *et al.*, 2008).

As populações naturais precisam estar adaptadas ao meio para se perpetuarem e essa adaptação fisiológica às mudanças ambientais é mediada por um repertório de defesas expresso pelos organismos (Chen e Li, 2007). Recentemente, esse conjunto de estratégias de defesa passou a ser conhecido pelo termo “defensoma”. O defensoma é composto por um conjunto de famílias gênicas e vias metabólicas responsáveis pela proteção contra fatores ambientais adversos e pelo reparo dos danos causados por esses fatores (Goldstone *et al.*, 2006). Os componentes do defensoma também são chamados de genes de resposta a fatores ambientais ou “genes de luxo”. A biotransformação de xenobióticos (também chamada de defensoma químico) é parte central desse sistema, permitindo ao organismo estabelecer respostas orquestradas contra compostos tóxicos de origem natural ou antropogênica (Figura 1.1). Neste trabalho, estudamos comparativamente as principais proteínas da fase I da biotransformação de xenobióticos, os citocromos P450, em peixes das famílias Loricariidae (cascudos) e Cichlidae (tilápias do Nilo), e em camundongos suíços.

1.1 Biotransformação de xenobióticos

Os xenobióticos são compostos estranhos ao organismo que não são aproveitados como fontes de energia e nutrientes. Muitos xenobióticos de relevância toxicológica são altamente lipofílicos. Neste grupo, estão presentes compostos estruturalmente diversos, desde produtos de origem natural, como metabólitos tóxicos de plantas e fungos (*e.g.* furanocumarinas e aflotoxinas) até fármacos e poluentes ambientais (*e.g.* bifenilas policloradas – PCB, hidrocarbonetos poliaromáticos – PAH, e dioxinas). Os xenobióticos lipofílicos são, via de regra, facilmente absorvidos e, quando lentamente metabolizados, tendem a acumular nos organismos. A biotransformação de xenobióticos é o processo pelo qual esses compostos são transformados através de uma série de reações enzimáticas em substâncias mais hidrossolúveis e de mais fácil excreção pelo organismo.

Didaticamente, esse processo é dividido em duas fases: a fase I, em que ocorre a adição ou a exposição de grupamentos funcionais presentes na molécula parental; e a fase II, em que há a conjugação de moléculas endógenas ao metabólito da fase I (ou diretamente ao composto parental), aumentando sua polaridade e facilitando sua excreção em meios aquosos. A figura 1.1 mostra um esquema do sistema de biotransformação de xenobióticos. Há casos, no entanto, em que as reações de fase I convertem xenobióticos originalmente pouco ou não tóxicos para o organismo em intermediários eletrofílicos capazes de se ligar de forma covalente a macromoléculas biológicas, como o DNA, causando dano ao indivíduo (toxicidade). A conversão enzimática de moléculas pouco reativas em metabólitos mais tóxicos é conhecida como ativação metabólica. O efeito mutagênico e carcinogênico de alguns poluentes ambientais, como os PAH, são exemplos típicos de ativação metabólica mediada por enzimas do citocromo P450. A superfamília dos citocromos P450 (CYP) destaca-se na fase I da biotransformação de xenobióticos, sendo responsável por 70-80% de suas reações (Nebert e Dalton, 2006).

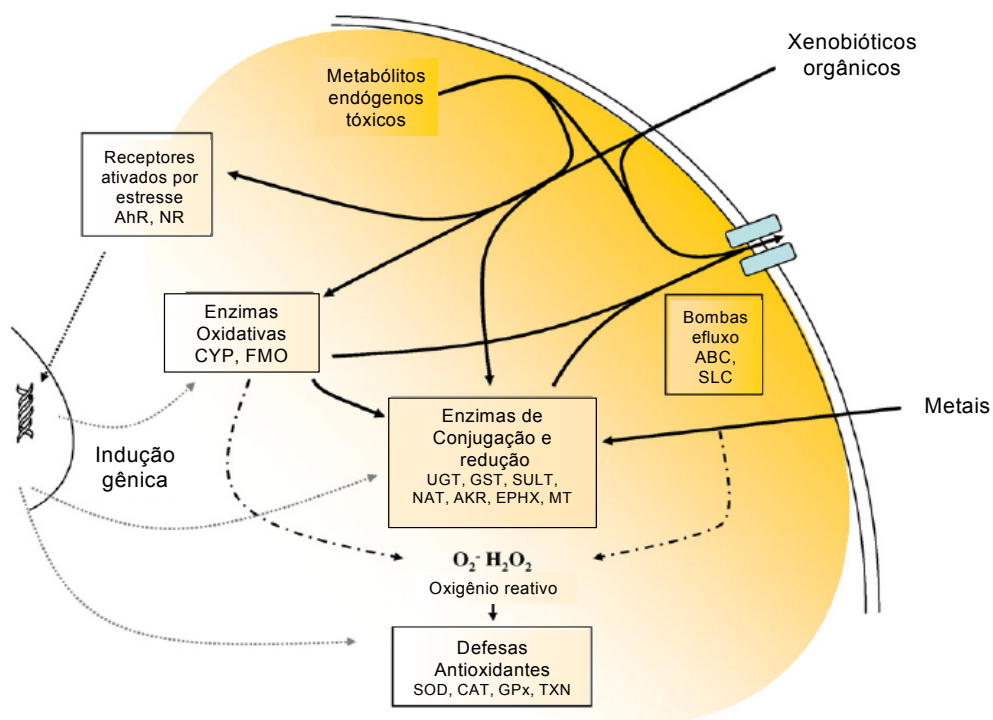


Figura 1.1) Esquema geral da biotransformação de xenobióticos. Adaptado de (Goldstone et al., 2006).

1.2 Citocromos P450

Os citocromos P450 foram descritos inicialmente por Klingenberg (1959) como um pigmento microsomal com absorção máxima em 450 nm quando reduzido pela ligação ao monóxido de carbono (Klingenberg, 1958). Logo em seguida, a natureza hemo-protéica desse pigmento foi revelada por Omura e Sato (Omura e Sato, 1962; 1964a; b) que batizaram essa nova proteína como citocromo P450. Estabrook e colaboradores (1963) demonstraram que essas novas proteínas eram responsáveis pela hidroxilação no carbono 21 da 17-hidroxi-progesterona e também pela oxidação de diversas drogas (Estabrook et al., 1963).

1.2.1 Formas e Funções

Os citocromos P450 (CYP) catalisam a monooxigenação de uma enorme variedade de substratos orgânicos, com críticas conseqüências para a saúde e o funcionamento dos organismos (Stegeman e Livingstone, 1998). Em procariotos, os CYP são proteínas solúveis no citosol. Em células eucarióticas, os CYP estão principalmente associados às membranas do retículo endoplasmático, mas também podem ser encontrados na membrana interna de mitocôndrias e na membrana plasmática da célula. Essas proteínas são expressas em todas as fases do desenvolvimento e em praticamente todos os tecidos dos organismos, sendo o fígado o órgão que exhibe maior expressão (Ding e Kaminsky, 2003). Rim, intestino e pulmão também apresentam alta expressão de diversas isoformas de CYP (Ding e Kaminsky, 2003). Em regiões do tecido epitelial que revestem estruturas como traquéia, faringe e mucosa nasal, a expressão dessas proteínas também é elevada (Ding e Kaminsky, 2003). Em peixes, há considerável expressão de CYP no fígado e também nas brânquias e no coração (Handley-Goldstone et al., 2005; Abrahamson et al., 2007). Os CYP são em geral abundantemente encontrados em regiões mais expostas ou portas de entrada dos xenobióticos no organismo (Ding e Kaminsky, 2003).

Acredita-se que a superfamília dos citocromos P450 tenha surgido em procariotos, antes mesmo do aumento dos níveis de oxigênio na atmosfera e do surgimento da célula eucariótica (Werck-Reichhart e Feyereisen, 2000). Dessa forma, os CYP são encontrados em praticamente todas as espécies e nos três domínios da biodiversidade (Stegeman e

Livingstone, 1998). Essa superfamília é constituída até agora por mais de 7000 enzimas, distribuídas entre 858 famílias e mais de 814 subfamílias, classificadas de acordo com a identidade na seqüência de aminoácidos, e critérios filogenéticos e de organização gênica estabelecidos por um comitê de nomenclatura (Werck-Reichhart e Feyereisen, 2000; Nelson, 2006). Em geral, proteínas com mais de 40% de identidade na seqüência de aminoácidos são classificadas na mesma família e, as que têm mais de 70% são incluídas na mesma subfamília. Devido à enorme diversidade de formas, em alguns casos, genes de diferentes famílias do CYP possuem apenas 20% de identidade em sua seqüência nucleotídica (Werck-Reichhart e Feyereisen, 2000). É importante salientar que o aumento da quantidade de estruturas tridimensionais de CYP resolvidas por cristalografia tem mostrado uma inesperada conservação nos padrões de enovelamento e na topografia dessas moléculas, em especial nas regiões mais próximas ao grupo heme (Werck-Reichhart e Feyereisen, 2000). Existem apenas três resíduos de aminoácidos totalmente conservados e algumas regiões consenso nos CYP. A principal região consenso está localizada na volta (*loop*) de ligação ao heme. Essa região é composta pela seqüência: Phe-X-X-Gly-X-Arg-X-Cys-X-Gly, onde o resíduo de cisteína é o quinto ligante do átomo de ferro do grupo heme e é totalmente conservado entre os CYP (Werck-Reichhart e Feyereisen, 2000). O motivo Glu-X-X-Arg localizado na hélice K também é completamente conservado entre os CYP e acredita-se que deva ser necessário para estabilizar o núcleo da proteína onde o heme está localizado (Werck-Reichhart e Feyereisen, 2000). Outro motivo característico de CYP é o bolso onde ocorre a transferência de prótons na hélice I no lado distal do heme. A seqüência desse motivo é Ala/Gly-Gly-X-Asp/Glu-Thr-Thr/Ser (Werck-Reichhart e Feyereisen, 2000). A figura 1.2 mostra a estrutura do CYP1A2 de humanos, e ilustra algumas dessas características estruturais conservadas entre os CYP. A identificação de cada proteína é feita por um número arábico que designa a família, seguido por uma letra, que indica a subfamília e, quando necessário, por outro número arábico que identifica a isoforma específica. Assim o CYP1A1, por exemplo, é a isoforma um da subfamília A da família um dos citocromos P450.

Os CYP têm importante papel tanto no metabolismo endógeno (*e.g.*: biossíntese de ácidos graxos, hormônios esteróides, neurotransmissores), como na biotransformação de produtos naturais e poluentes ambientais. Os CYP são fundamentais na determinação da susceptibilidade de cada espécie a esses compostos e na sua interação com o ambiente (Stegeman e Livingstone, 1998; Omura, 1999; Nebert e Dalton, 2006). Em vertebrados, as famílias CYP1, 2, 3 e 4 estão envolvidas principalmente com a biotransformação de

xenobióticos. Estas famílias apresentam considerável redundância, sobreposição e inespecificidade em relação à afinidade por seus ligantes e desempenham um importante papel tanto na proteção quanto na susceptibilidade ao desenvolvimento de câncer em decorrência da exposição a carcinógenos ambientais (Nebert e Dalton, 2006; Burnett *et al.*, 2007). A figura 1.3 ilustra as várias funções dos CYP no metabolismo endógeno e na interação com o ambiente.

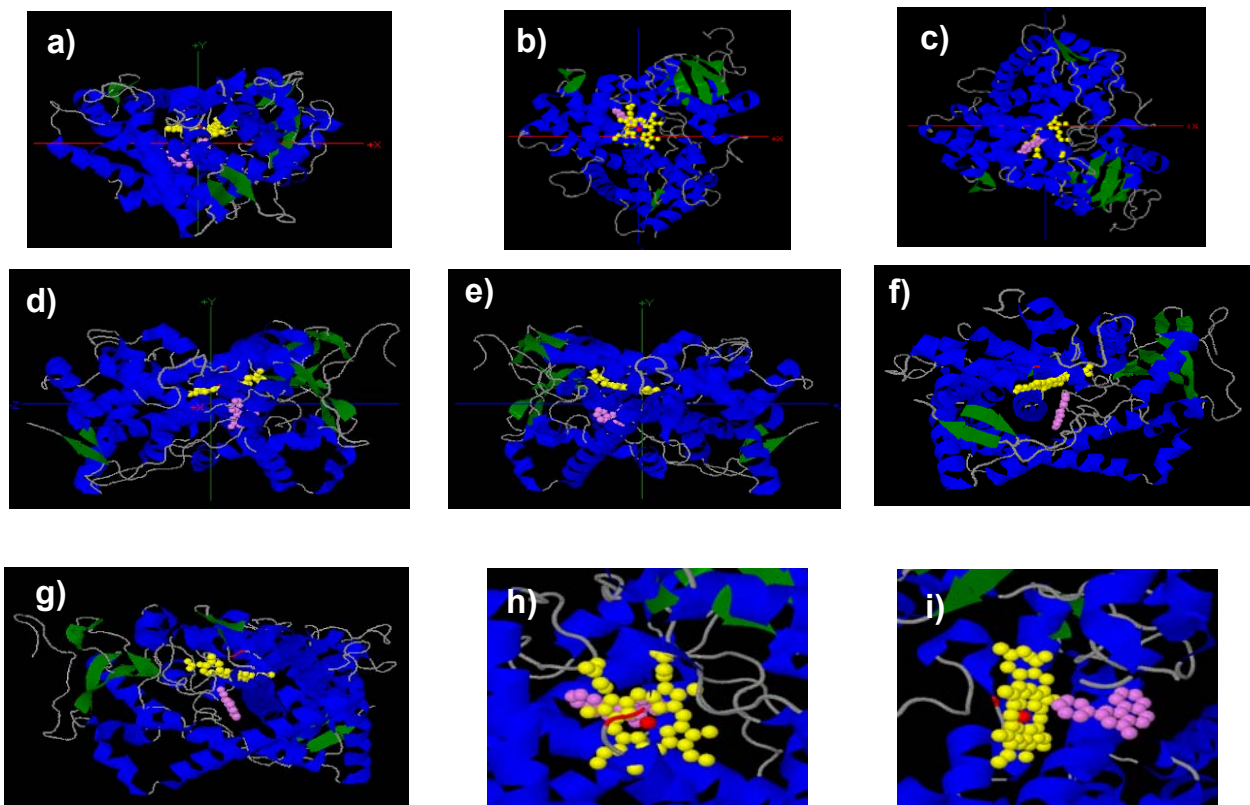


Figura 1.2) Estrutura tri-dimensional do CYP1A2 de humanos co-cristalizada com o inibidor, α -naftoflavona, α -NF (PDB: 2HI4). a) visão frontal, b) visão superior, c) visão inferior, d) visão da direita, e) visão da esquerda, f) visão do canal de acesso 1, g) visão do canal de acesso 2, h) detalhe da ligação do ferro da protoporfirina com a cisteína e i) detalhe da interação entre o grupo heme e o ligante (α -NF). α -hélices em azul, folhas β em verde, protoporfirina em amarelo, átomo de ferro e o resíduo de cisteína 458 em vermelho e a α -NF em magenta. Estruturas geradas no programa JMOL (<http://www.jmol.org/>) e as imagens “renderizadas” no POV-ray (<http://www.povray.org/>).

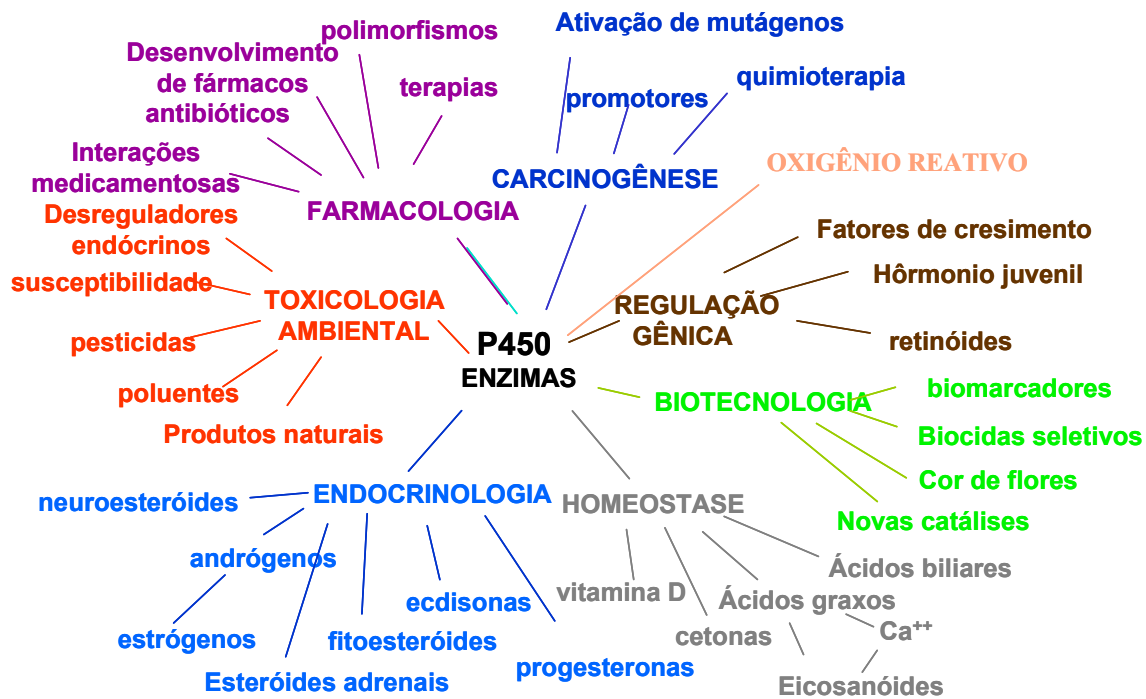


Figura 1.3) Esquema ilustrativo das diversas funções dos citocromos P450 no metabolismo endógeno e na interação entre os organismos e o ambiente. Adaptado de (Stegeman e Livingstone, 1998).

1.2.2 Evolução molecular e o papel do ambiente na diversificação

A grande diversidade de formas e funções dos CYP foi conseguida ao longo da evolução principalmente através de eventos de duplicação gênica. Processos de duplicação de genomas, transferências laterais de genes, amplificação, conversão, rearranjo e perda de genes também foram documentados (Werck-Reichhart e Feyereisen, 2000; Goldstone e Stegeman, 2006). Recentemente, a participação de elementos de transposição (*transposons*) na evolução de CYP em milho e em *Drosophila* foi sugerida (Chen e Li, 2007). Chen e Li (2007) mostraram que a frequência desses elementos é maior nas proximidades de genes de CYP envolvidos na biotransformação de xenobióticos do que próximo aos CYP envolvidos na biosíntese do hormônio da muda (ecdisona) em *Drosophila* (Chen e Li, 2007).

A maioria dos CYP descritos não possui função endógena conhecida. Dos cerca de 60 genes de CYP presentes no genoma humano: 15 CYP possuem apenas xenobióticos como substratos, 10 CYP não têm nenhum substrato conhecido, outros possuem moléculas endógenas e xenobióticos como substrato e 22 CYP metabolizam apenas substratos endógenos (Thomas, 2007). Acredita-se que as funções de muitos desses CYP sem substrato endógeno conhecido estejam relacionadas à interação com o ambiente através da biotransformação de xenobióticos naturais (Schmidt e Bradfield,

1996; Whitlock, 1999). Embora essa área ainda seja objeto de intensa discussão, especula-se que muitas dessas isoformas não possuiriam nenhum ligante. Esses CYP, também chamados de “enzimas de luxo”, estariam disponíveis para a atuação da seleção natural na eventualidade de alguma mudança nas pressões seletivas do meio. As mudanças ambientais poderiam expor indivíduos de uma determinada espécie a novos compostos, que poderiam ser metabolizados por essas enzimas “de luxo” (Chen e Li, 2007). Casos como este são comuns e bem caracterizados na co-evolução entre plantas e insetos herbívoros (Wen et al., 2006). Em outras espécies, no entanto, é muito difícil caracterizar a pressão seletiva do meio como uma força evolutiva capaz de aumentar a diversidade dos CYP. Contudo, um estudo recente usando 203 genes de CYP de primatas e roedores mostrou *in silico* que apenas as mutações nos CYP envolvidos na biotransformação de xenobióticos são selecionadas positivamente pela mudança da exposição a xenobióticos (Thomas, 2007). Essas evidências apóiam a hipótese de que um dos fatores que levou à grande diversificação dessa superfamília tenha sido o seu papel na adaptação das espécies às alterações na diversidade de xenobióticos aos quais elas estiveram expostas ao longo da evolução (seja por mudanças ambientais ou por alterações comportamentais, relacionadas principalmente aos hábitos alimentares).

1.2.3 Mecanismo de reação

Apesar da ampla diversidade de isoformas encontradas nessa superfamília, todos os CYP compartilham o mesmo mecanismo de transferência de elétrons para seus substratos (Mansuy, 1998; Werck-Reichhart e Feyereisen, 2000). Esse mecanismo envolve o grupo prostético heme e pode ser dividido em quatro etapas. A primeira etapa é considerada o início do ciclo catalítico quando a enzima não está ligada ao seu substrato. Nessa fase, o ferro do grupo heme é encontrado como uma mistura em dois estados: a) o estado Fe^{+3} hexacoordenado, ligado na posição *cis* aos quatro ligantes da protoporfirina e na posição *trans* ao ânion tiolato ($-\text{S}^-$) de uma cisteína totalmente conservada entre os CYP e a uma molécula de água, e b) o estado Fe^{+3} pentacoordenado, quando o ferro está ligado a todos aqueles ligantes, exceto a água. A ligação do substrato à proteína desloca esse equilíbrio no sentido da formação de Fe^{+3} pentacoordenado e aumenta o potencial de oxidação do ferro. A doação de um elétron ao Fe^{+3} transformando-o em Fe^{+2} é a segunda etapa. Essa doação é mediada, na maioria dos casos, por outra enzima: a

NADPH citocromo P450 redutase. A terceira etapa é a reação do Fe^{+2} a uma molécula de oxigênio (O_2), levando o átomo de ferro ao estado férrico (Fe^{+3}) e formando um superóxido. A quarta etapa é outra doação de elétron pela NADPH citocromo P450 redutase transformando o íon férrico em ferroso (Fe^{+2}). Nessa etapa o oxigênio molecular pode ser substituído por uma molécula de água. Através de um estado altamente oxidado (Fe^{+5}), o ferro transfere um átomo de oxigênio para o substrato. Um esquema do mecanismo de reação dos CYP pode ser visto na figura 1.4. Com esse único mecanismo de reação, os CYP são capazes de catalisar além das clássicas monooxigenações, reações de desalquilação, desidratação, desidrogenação, isomerização, dimerização, clivagem de ligações duplas entre carbonos e redução (Werck-Reichhart e Feyereisen, 2000).

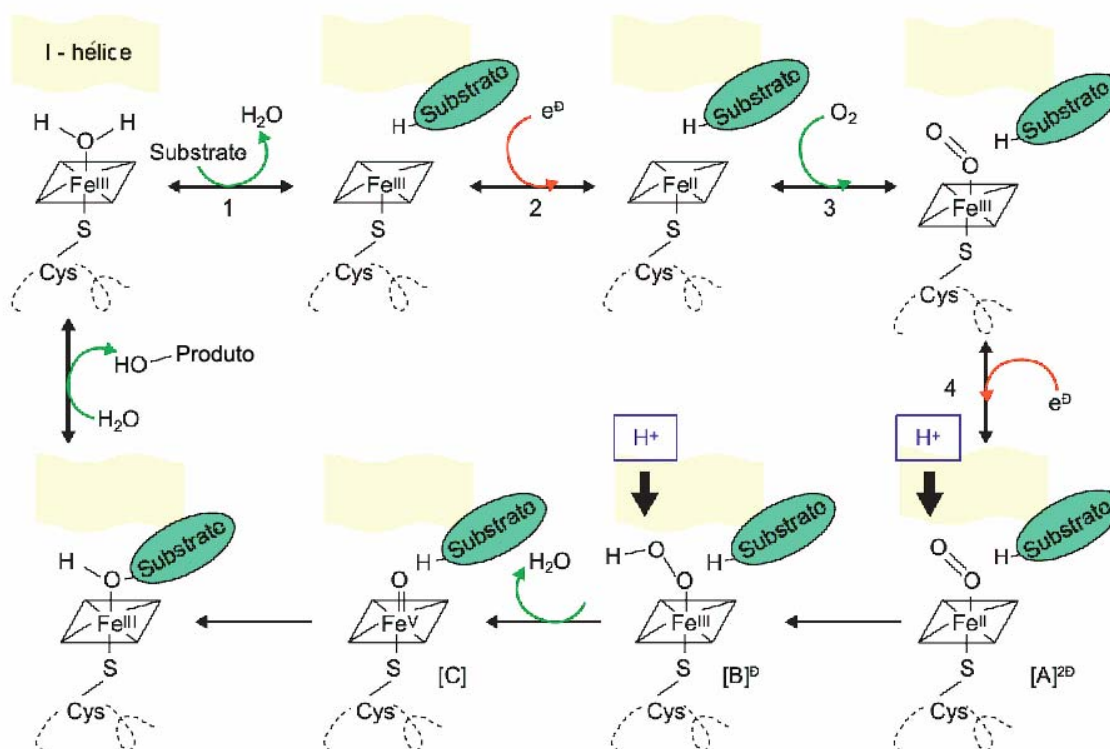


Figura 1.4) Esquema do ciclo catalítico dos citocromos P450. Adaptado de (Werck-Reichhart e Feyereisen, 2000).

1.2.4 Indução dos citocromos P450

Uma clara diferença entre os CYP envolvidos no metabolismo de compostos endógenos e aqueles que participam da biotransformação de xenobióticos é a sua distinta capacidade de indução. Em geral, enquanto os CYP que se ligam apenas a substratos endógenos apresentam expressão constitutiva e não são induzíveis, os que metabolizam tanto compostos endógenos como xenobióticos apresentam expressão constitutiva e induzível, e os que biotransformam apenas xenobióticos tem expressão basal baixa mas são altamente induzíveis pela exposição ao(s) xenobiótico(s) (Handschin e Meyer, 2003).

A regulação de CYP é controlada por mecanismos transcricionais, traducionais e pós traducionais (Hahn et al., 1998). Os mecanismos transcricionais de indução do CYP são mais freqüentemente ativados por xenobióticos e mediados por receptores nucleares e citoplasmáticos em diversas espécies. Os xenobióticos lipofílicos atravessam com facilidade as membranas celulares, podendo, teoricamente, atingir todos os compartimentos celulares. No citoplasma, podem se ligar a receptores que, após a ligação, são translocados para o núcleo da célula, onde se ligam a co-receptores e a elementos responsivos na região promotora de genes sob sua regulação. Alguns xenobióticos só reconhecem receptores já no interior do núcleo. Após a ligação aos receptores nucleares, o complexo se liga a regiões promotoras, regulando a expressão de genes. Os principais receptores nucleares envolvidos na regulação de genes de biotransformação são o receptor constitutivo de androstano (CAR) e o receptor pregnano X (PXR). A ativação do CAR induz uma resposta do tipo da produzida pelo fenobarbital, com a regulação positiva principalmente de citocromos P450 da subfamília CYP2B. Já a ativação do PXR induz principalmente enzimas da subfamília CYP3A (Handschin e Meyer, 2003). A indução de CYP via CAR e PXR parece ter se originado cedo na evolução dos vertebrados (Goldstone et al., 2007) e está ilustrada na figura 1.5.

Outro receptor que desempenha importante papel na regulação de CYP é o receptor de hidrocarbonetos aromáticos (AhR), que pertence à família dos fatores de transcrição do tipo bHLH-PAS (*basic Helix-Loop-Helix Per-Arnt-Sim*). Geralmente, fatores de transcrição dessa família estão envolvidos em processos fisiológicos, como a regulação dos ritmos circadianos, diferenciação celular, regulação de tensão de oxigênio, sinalização do receptor de estrogênio e o desenvolvimento embrionário do sistema nervoso (Mcguire et al., 1995; Hahn, 1998). O receptor AhR e seu co-receptor nuclear

Arnt (translocador nuclear do receptor Ah) são exceções, não possuindo ligantes endógenos conhecidos. Entretanto, o AhR e o Arnt são fundamentais na indução de CYP, principalmente os da família 1 (CYP1) em resposta a exposição à poluentes ambientais, como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAH) e hidrocarbonetos aromáticos polihalogenados (pHAH) (Hahn, 1998). O receptor AhR não ativo permanece no citoplasma da célula ligado a duas moléculas de proteína de choque térmico de 90 kDa (HSP90). A ligação do xenobiótico ao receptor desestabiliza esse complexo, promovendo a liberação do receptor AhR. O complexo AhR-ligante é então translocado para o núcleo celular. No núcleo, após a ligação com a proteína Arnt, o complexo AhR-ligante-Arnt passa a ter afinidade por regiões promotoras do DNA, chamadas de elementos responsivos a xenobióticos (XRE). A ligação do complexo AhR-ligante-Arnt às XRE induz a transcrição dos genes regulados pelo AhR. Apesar de bastante estudada, essa via ainda não é completamente compreendida. Por exemplo, não se sabe ao certo como ocorre a translocação do receptor Ah para o núcleo (Hankinson, 2005). Na região promotora do CYP1A, além dos XRE, existem outras regiões fundamentais para sua expressão (Whitlock, 1999). Essa via também sofre regulação negativa através do repressor do receptor Ah (AhRR) e por interações (*cross-talks*) com outras vias de sinalização, mas esses processos ainda não foram bem elucidados (Schmidt e Bradfield, 1996; Oshima *et al.*, 2007). Da mesma forma que os receptores CAR e PXR, a via de indução mediada por AhR e Arnt teve origem cedo durante a evolução dos vertebrados e está ilustrada na figura 1.5 (Hahn *et al.*, 1998). Evidências mais recentes sugerem a presença dessa via em invertebrados (Goldstone *et al.*, 2007).

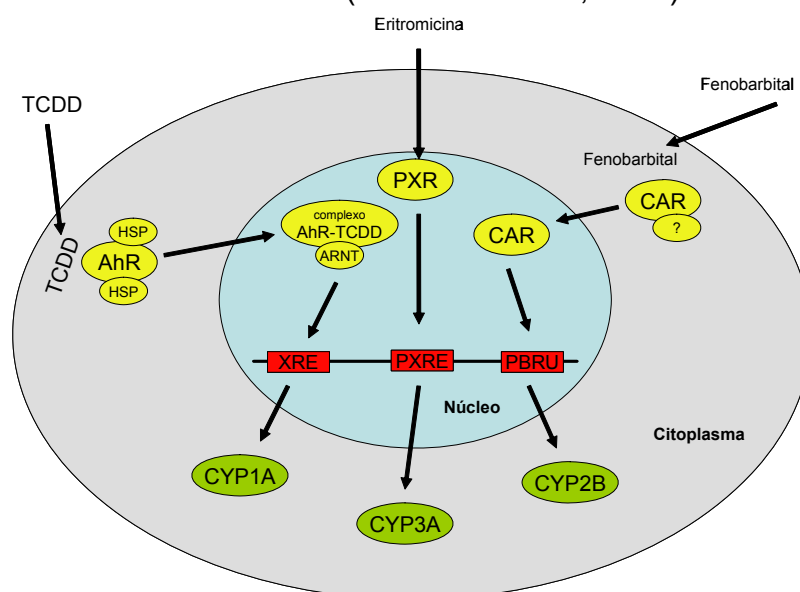


Figura 1.5) Esquema do mecanismo de indução de CYP via os receptores AhR, PXR e CAR.

Formas de detecção dos citocromos P450

O primeiro método para a detecção dos CYP foi o que levou à sua descoberta e descrição inicial. Esse método se baseia na característica única dos CYP que, no seu estado reduzido, absorvem com eficiência máxima a luz no comprimento de onda de 450 nm (Omura e Sato, 1962). Essa característica é decorrente da ligação incomum entre o átomo de ferro do grupo heme e o grupo tiolato de uma cisteína (o quinto ligante do ferro). Além do pico em 450 nm, outro pico ocorre em 420 nm devido à absorção da luz por CYP degradados. Esse método ficou conhecido como método de Omura e Sato. No entanto, o método de Omura e Sato só é capaz de quantificar o conteúdo de CYP total em uma determinada fração, não permitindo determinar quais CYP estão expressos e a concentração de cada um. Esse método tem mostrado ser de difícil padronização e apresenta alta variabilidade entre réplicas. Foi necessário, então, desenvolver formas que fossem capazes de discriminar entre várias isoformas de CYP e que fossem também mais simples e replicáveis.

A utilização de substratos específicos para a determinação da atividade enzimática de CYP é tradicionalmente a alternativa mais utilizada para o estudo de CYP específicos. Uma grande diversidade de substratos está atualmente disponível para avaliação da atividade de diferentes CYP. Entre os substratos usados há mais tempo para a determinação da atividade de CYP está uma série de ésteres da resorufina caracterizada por Burke e colaboradores (figura 3.5) (Burke et al., 1994; Weaver et al., 1994). Em seus trabalhos, Burke e colaboradores demonstram que, apesar da hidrólise de determinado éster ser catalisada predominantemente por uma dada enzima, outras isoformas CYP também são capazes de mediar a reação sendo, portanto, relativa a especificidade de cada isoforma por cada éster de resorufina. O autor mostra que no fígado de ratos controles (não induzidos), cada isoforma de CYP participa percentualmente de forma similar no metabolismo dos quatro ésteres estudados: metoxi-, etoxi-, pentoxi-, e benziloxi-resorufina. No entanto, quando os animais são tratados com indutores preferenciais de uma das diferentes isoformas, as isoformas induzidas passam a ser as principais responsáveis pelo metabolismo de um substrato específico. Por exemplo, a hidrólise da etoxiresorufina (avaliado através da atividade da etoxiresorufina-O-desetilase - EROD) é catalisada por diversas isoformas em animais não tratados. Em animais tratados com indutores de CYP1A (e.g. BNF, DMBA), entretanto, a participação de CYP1A na catálise de EROD passa a ser proporcionalmente muito maior do que a de

outras isoformas. Dessa forma, pode-se afirmar que, em animais tratados com indutores de CYP1A, a atividade de EROD é uma marcadora específica da atividade catalítica dessa isoforma. Da mesma forma, o metabolismo da pentoxiresorufina (avaliado através da atividade da pentoxiresorufina-O-despentilase - PROD) é catalisado por diversas isoformas em animais não tratados. Todavia, em animais tratados com indutores de CYP2B (e.g. fenobarbital), pode-se dizer que a despentilação da pentoxiresorufina é mediada predominantemente pela CYP2B. A especificidade da atividade de uma reação enzimática como marcador da atividade catalítica de determinada isoforma de CYP, pode variar entre diferentes espécies e linhagens de animais, entre tecidos de uma mesma espécie, e entre indivíduos expostos e indivíduos não expostos a indutores. O fato da especificidade de determinada reação como marcadora da atividade catalítica de uma isoforma CYP não ser absoluta, aliado a falta de estudos sobre a especificidade da reação e sobre a indução de isoformas do CYP em espécies não convencionais estão entre as principais dificuldades para interpretação dos dados de atividade enzimática obtidos nessas espécies.

Técnicas baseadas no uso de anticorpos específicos contra determinadas isoformas de CYP também têm sido bastante usados. Entre essas, os ensaios de ELISA e *immunoblotting* são os mais usados nos estudos de CYP. Embora possam ser muito específicas e sensíveis, essas mesmas características podem levar a resultados do tipo falso-positivos pela reação cruzada com epítomos de outras proteínas. Um exemplo clássico de resultado falso-positivo baseado em resultados de *immunoblotting* foi a descrição inicial de uma proteína similar à CYP1A em moluscos (Canova et al., 1998; Peters et al., 1998; Shaw et al., 2000; Shaw et al., 2004). Anos mais tarde, descobriu-se que aquela banda imunorreativa não era composta por uma proteína similar à CYP1A, mas por actina (Grøsvik et al., 2006; Jonsson et al., 2006). Outro fator limitante para o uso dessas técnicas para o estudo de CYP é a falta de disponibilidade de anticorpos. Essa carência é ainda maior quando se trata de organismos não convencionais, como é o caso da maioria das espécies de peixes. Nesses casos, a maioria dos anticorpos existentes foi produzida a partir de proteínas de algumas poucas espécies (em geral de peixes de regiões temperadas) e não são disponíveis comercialmente, o que dificulta o acesso a esta ferramenta.

Métodos de amplificação de segmentos de RNA mensageiro (mRNA) pela reação em cadeia da polimerase (PCR) são amplamente usados para a avaliação da expressão de CYP. Assim como os métodos baseados em anticorpos, esses também são altamente

específicos e sensíveis, com a vantagem que se pode sequenciar o trecho amplificado para a confirmação da especificidade dos iniciadores utilizados. O desenho de iniciadores para genes que não foram seqüenciados é um fator limitante, mas pode ser superado pelo uso de iniciadores degenerados ou para regiões conservadas. O alto grau de identidade na seqüência nucleotídica entre isoformas de uma mesma subfamília de CYP pode dificultar a análise de isoformas individuais.

Mais recentemente, tecnologias proteômicas têm sido usadas para estudar a composição de CYP em algumas espécies. Por vezes, esses estudos são chamados de P450ômica (P-quatrocenos e cinqüentômica). Todavia, por serem proteínas de membrana altamente apolares, a solubilização dos CYP não é trivial. Três estratégias básicas têm sido adotadas para o estudo proteômico de CYP. Todas as três têm como ponto de partida a fração microsomal. A estratégia considerada mais simples separa as proteínas microsomais pela massa molecular em géis de SDS-PAGE, corta as bandas na faixa entre 45-66 kDa, digere as proteínas com tripsina e identifica os peptídeos por MALDI-TOF ou MALDI-TOF/TOF. Nessa abordagem, todas as proteínas são solubilizadas devido aos fortes agentes desnaturantes e detergentes usados no gel SDS-PAGE. Entretanto, como as bandas do gel 1-D são formadas por uma mistura de proteínas, apenas as proteínas mais abundantes são identificadas. Outra abordagem é a separação das proteínas microsomais em géis de poliácridamida bidimensionais (2-D), a excisão das manchas (*spots*) na faixa de 45-66 kDa, digestão tríptica e a identificação dos peptídeos por MALDI-TOF/TOF. Contudo, os detergentes compatíveis com a etapa de focalização isoeletrica (primeira dimensão) normalmente não são muito eficazes para a solubilização de proteínas de membrana como os CYP. Trabalhos que usaram essa abordagem obtiveram uma cobertura pequena do conteúdo total esperado de CYP. A terceira abordagem é a separação das proteínas da fração microsomal em géis SDS-PAGE, excisão das bandas na mesma faixa de massa molecular, digestão tríptica, seguida da separação dos peptídeos em coluna de cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas (geralmente ESI-MS/MS). Diversos trabalhos sugerem que essa é a abordagem que gera maior número de identificações de CYP (Wang et al., 2006).

1.2.5 Citocromo P4501A (CYP1A)

A subfamília CYP1A é uma das mais estudadas em virtude do seu importante papel na biotransformação de xenobióticos de origem natural, de poluentes ambientais e em processos de ativação metabólica de pré-carcinógenos como alguns PAH (e.g. 7-12 dimetilbenzo-antraceno, DMBA). O interesse por esta subfamília se deve também à sua ampla distribuição entre os vertebrados e à falta de informações sobre seu papel no metabolismo endógeno. Apenas alguns dos possíveis ligantes endógenos para a CYP1A já foram investigados em estudos com roedores (Raner *et al.*, 1996; Nebert e Dalton, 2006). Na maioria dos casos, os ligantes de CYP1A são moléculas planares e altamente hidrofóbicas devido às características estereo-químicas dos canais de acesso dos substratos (figura 1.2 f, g).

A história evolutiva do citocromo P4501A (CYP1A) foi recentemente reavaliada em duas revisões (Goldstone e Stegeman, 2006; Goldstone *et al.*, 2007). A origem do CYP1A ainda é questão em aberto. Goldstone e colaboradores (2007) sugerem a existência de genes similares ao *CYP1A* em equinodermas e ascídias, o que implicaria no aparecimento do *CYP1A* antes da separação entre protostomados e deuterostomados (Goldstone *et al.*, 2006; Goldstone *et al.*, 2007). No entanto, a ocorrência de genes do *CYP1A* a partir da linhagem dos peixes mandibulados (Gnastostomados) é amplamente aceita (Stegeman, 1989; Hahn *et al.*, 1998; Goldstone e Stegeman, 2006; Goldstone *et al.*, 2006). Também é amplamente aceito que peixes mandibulados possuem um único gene de *CYP1A* – exceto pelas famílias de enguias e salmonídeos, que possuem dois genes de *CYP1A* (Goldstone e Stegeman, 2006). Esse gene de *CYP1A* encontrado em peixes teria sofrido uma duplicação em algum ancestral exclusivo de aves e mamíferos, dando origem aos dois pares ortólogos de *CYP1A*: *CYP1A1/CYP1A4* e *CYP1A2/CYP1A5*, encontrados nesses grupos (Goldstone e Stegeman, 2006). A indução do *CYP1A* via receptor AhR, por PAH e pHAH, é bem caracterizada em todos os grupos de vertebrados mandibulados (Hahn, 1998).

1.3 Citocromos P450 em peixes

1.3.1 CYP1A - o mais estudado

Em peixes, a CYP1A é a subfamília mais estudada entre os CYP. O grande interesse por essa subfamília deve-se, em parte, à ampla aplicação da indução de CYP1A em peixes como biomarcador de exposição a poluentes em ambientes de água doce e marinhos (Cajaraville *et al.*, 2000; Shailaja e D'silva, 2003; Kirby *et al.*, 2004; Parente *et al.*, 2004; Parente *et al.*, 2008). Em decorrência desta aplicação, diversas espécies de peixes já foram testadas quanto à sua capacidade de responder à exposição a diversos xenobióticos com a indução do CYP1A. A ortologia e a elevada similaridade entre as seqüências de aminoácidos de CYP1A de peixes e mamíferos é outro fator que estimula o uso de peixes como ferramenta para o estudo de processos relacionados a CYP1A, tais como a carcinogênese química, e a regulação da enzima. Por outro lado, o estudo da CYP1A em peixes tem contribuído para a elucidação da história evolutiva dessa subfamília e pode ser crucial para a descoberta de suas funções endógenas (ancestrais) (Hahn *et al.*, 1998; Stegeman e Livingstone, 1998; Goldstone e Stegeman, 2006; Goldstone *et al.*, 2007). Para essas finalidades, a enorme diversidade de espécies, de hábitos ecológicos e de ambientes colonizados pelos peixes é uma característica vantajosa do grupo que tem sido pouco aproveitada (Stegeman *et al.*, 1997). A maioria dos estudos visando caracterizar os CYP, sua regulação e o sistema de biotransformação de peixes é feita em um número restrito de espécies que, em geral, são provenientes de regiões de clima temperado (*Anguilla anguilla*, *Gadus morhua*, *Ictalurus punctatus*, *Oncorhynchus mykiss*, *Salmo salar*, *Stenotomus chrysops*) ou são organismos modelo (*Danio rerio*, *Fundulus heteroclitus*, *Oryzias latipes*, *Takifugu rubripes*, *Tetraodon nigroviridis*). Os estudos com peixes tropicais objetivam basicamente a caracterização da indução da CYP1A para a aplicação dessas espécies em programas de biomonitoramento.

Apesar da CYP1A ser a subfamília mais estudada em peixes, todas as 18 famílias de CYP encontradas em mamíferos já foram descritas em espécies de peixes (Burnett *et al.*, 2007). Os resultados obtidos com os seqüenciamentos de genomas de peixes sugerem que cada espécie deve possuir de 60 a 80 genes de CYP em seu genoma (Nelson, 2003; Burnett *et al.*, 2007). Com o uso cada vez maior de peixes como organismos modelo em

diversas áreas (e.g. biomedicina, biotecnologia, genética, evolução, ecotoxicologia) e o seqüenciamento do genoma dessas espécies, outros CYP de peixe tem sido bem caracterizados (Alestrom et al., 2006; Burnett et al., 2007).

1.3.2 Indução de CYP em peixes

Devido à homologia entre os CYP de peixes e os de mamíferos e, principalmente, pela falta de estudos mais profundos sobre os mecanismos de indução de diversos CYP em peixes, acredita-se que as vias de indução dos CYP em peixes sigam os mesmos padrões descritos em mamíferos. Neste cenário, a indução da CYP1A, que é usada em biomonitoramento, destaca-se por ser bem conhecida. No entanto, a indução da CYP1A em peixes parece ser essencialmente igual à encontrada em outros vertebrados. Assim, a subfamília CYP1A em peixes, tal como em mamíferos, é induzida principalmente por xenobióticos, como os PAH e pHAH, via o receptor AhR que, após uma seqüência de eventos, se liga às regiões promotoras XRE. Entretanto, a diversidade de genes de AhR em peixes é maior do que a encontrada em mamíferos, que possuem apenas um gene (Hahn et al., 2006). Múltiplos genes do AhR já foram descritos em peixes e a diversidade alélica (polimorfismos) nos loci do AhR também parece ser maior em peixes do que em mamíferos (Burnett *et al.*, 2007). De fato, já foi demonstrado que pequenas alterações na seqüência nucleotídica dos receptores AhR são responsáveis pelas diferenças existentes na susceptibilidade aos efeitos tóxicos de pHAH e PAH, tanto entre espécies, como entre populações (Wirgin e Waldman, 2004; Karchner *et al.*, 2006; Burnett *et al.*, 2007).

1.3.3 Resistência adquirida à indução de CYP1A

Apesar da indução da CYP1A via AhR ser um processo altamente conservado ao longo da evolução dos vertebrados, existem grandes diferenças no grau de indução entre espécies e algumas exceções. Um dos casos mais estudados é o da adaptação de populações de espécies do gênero *Fundulus* a ambientes cronicamente contaminados por pHAH e PAH (Burnett *et al.*, 2007). Essas populações adquiriram resistência aos efeitos tóxicos desses poluentes através da alteração de várias vias metabólicas, inclusive a do receptor AhR (Fisher e Oleksiak, 2007). Peixes que habitam essas regiões estão expostos a doses maiores que a dose letal para peixes da mesma espécie de regiões controle. A

dose letal de PCB para peixes de populações resistentes é algumas ordens de magnitude maior do que a dose letal para os peixes de populações controle (Burnett *et al.*, 2007). Em *New Bedford Harbor*, por exemplo, a concentração de PCB no sedimento é de 190000 mg PCB/kg sedimento (19% p/p) e no tecido muscular dos peixes é de 272 ppm. Por outro lado, na região controle de *Scorton Creek*, a concentração de PCB no tecido muscular dos peixes é de 0,177 ppm. As bases moleculares dessa adaptação ainda não estão bem estabelecidas, mas sabe-se que os genes do receptor AhR são altamente polimórficos e que a frequência alélica é diferente entre as regiões contaminadas e controle (Hahn *et al.*, 2006; Burnett *et al.*, 2007). Como consequência, peixes das populações resistentes são muito menos susceptíveis a indução da CYP1A do que peixes das populações controles. Mesmo expostos naturalmente às elevadas concentrações de PCB e PAH, os peixes das populações resistentes não apresentam indução dos níveis de CYP1A em relação aos de regiões controles (Wirgin e Waldman, 2004). Todavia, quando expostos em laboratório aos indutores de CYP1A, os peixes de populações resistentes apresentam ligeira indução quando comparado aos de populações controle (Bello *et al.*, 2001). Em experimentos com cultura primária de hepatócitos, células provenientes de peixes de uma população resistente tiveram que ser expostas a concentrações 100 vezes maior do que células provenientes de peixes da região controle para atingirem níveis similares de indução da CYP1A (Bello *et al.*, 2001). Esses resultados mostram que apesar da indução de CYP1A em peixes controles ser mais eficiente do que em peixes resistentes, esses últimos possuem CYP1A funcional e continuam sendo capazes de induzi-la via AhR. No entanto, alguns estudos mostram que os peixes primitivos não são capazes de induzir a CYP1A ou mesmo não possuem essa isoforma.

1.3.4 Resistência natural à indução do CYP1A

Alguns estudos relatam que peixes agnatos são incapazes de induzir a CYP1A após a exposição a xenobióticos do tipo PAH e HAH (Ronis *et al.*, 1989; Goksøyr *et al.*, 1991; Hahn *et al.*, 1998). O invertebrado craniado, *Myxine glutinosa*, foi usado nesses três estudos e um vertebrado basal, a lampreia (*Petromyzon marinus*), foi usada apenas no estudo mais recente. Coletivamente, esses trabalhos mostram que em *M. glutinosa* a atividade de EROD (marcadora de CYP1A em vertebrados) não é induzida pelo tratamento com PAH e HAH. Em experimentos de *immunoblotting*, Hahn e colaboradores

(1998) confirmam os resultados de Goksøyr e colaboradores (1991) mostrando a presença de uma banda imunoreativa a um anticorpo policlonal anti-CYP1A em indivíduos de *M. glutinosa* controles e tratados com β -naftoflavona (BNF, um PAH) e com a 3,3'-4,4' bifenila tetraclorada – TCB (um HAH). Hahn e colaboradores mostraram ainda a mesma banda imunoreativa usando dois outros anticorpos policlonais. Esses autores, todavia, não acharam bandas imunoreativas nessa espécie quando usaram um anticorpo monoclonal anti-CYP1A. Dessa forma, esses trabalhos sugerem a presença de uma proteína homóloga a CYP1A em *M. glutinosa*. Entretanto, em todos os casos, não foram encontradas diferenças densitométricas entre as bandas imunoreativas de *M. glutinosa* controles e tratados. É esperado, portanto, que *M. glutinosa* possua uma proteína similar a CYP1A, mas essa espécie parece não ser capaz de induzir sua expressão e atividade por clássicos indutores de CYP1A de vertebrados via receptor AhR. Hahn e colaboradores foram os únicos a estudar a via de regulação da CYP1A em lampreias – um dos vertebrados mais primitivos. Em seus estudos, esses autores mostram que a atividade de EROD não é detectada, tanto em indivíduos controles como em tratados com TCB, na espécie *Petromyzon marinus*. No mesmo trabalho, mostraram ainda que essa espécie não possui nenhuma proteína na fração microssomal que reaja com um anticorpo monoclonal e um anticorpo policlonal anti-CYP1A. No entanto, após a reação com dois anticorpos policlonais anti-CYP1A, uma fraca banda imunoreativa foi encontrada na região entre 50 e 55 kDa. Da mesma forma que em *Myxine glutinosa*, não houve diferença na densidade da banda de indivíduos de *Petromyzon marinus* controles e tratados com TCB. Esses resultados sugerem que *P. marinus* deve possuir uma proteína homóloga a CYP1A. Essa proteína, entretanto, possui características imunoreativas, catalíticas e regulatórias diferentes das encontrada na CYP1A dos outros vertebrados. Hahn e colaboradores sugerem, então, que essas duas espécies possam ser modelos interessantes para o estudo de funções ancestrais, não relacionada à indução da CYP1A, do receptor AhR e para a investigação das funções fisiológicas da CYP1A. No mesmo trabalho, os autores mostraram também a indução de EROD e CYP1A por BNF em um peixe cartilaginoso (*Raja erinacea*), sugerindo que a via de sinalização mediada pelo receptor AhR, e seu envolvimento na regulação da CYP1A, é um bem conservada entre os vertebrados mandibulados. Essa conservação, de acordo com aqueles autores, sugeriria a presença de uma forte pressão seletiva para a manutenção dessa via de sinalização-indução.

1.4 Classificação dos peixes

O termo “peixes” é usado para designar um grupo parafilético composto por vertebrados basais e não tetrápodos (Hyperoartia (agnatas), Chondrichthyes, Actinopterygii, peixes pulmonados e celacantos). A classe dos Actinopterygii é considerada uma das mais derivadas entre os peixes, tendo aparecido no final do Siluriano, há cerca de 400 milhões de anos (Chen et al., 2004). Tradicionalmente, essa classe é dividida em três infraclasses: Chondrostei, Holostei e Teleostei; tendo, esta última, mais de 23000 espécies válidas. De fato, existem mais espécies de peixes teleósteos do que a soma de espécies de todos os outros grupos de vertebrados (Peng, He *et al.*, 2006). Os teleósteos são divididos em 11 superordens. A relação filogenética entre as superordens de Teleostei pode ser vista na figura 1.6. Das superordens de Teleostei, destacamos duas: Acanthomorpha, em que as tilápias estão incluídas, e Ostariophysii, superordem a que os cascudos pertencem.

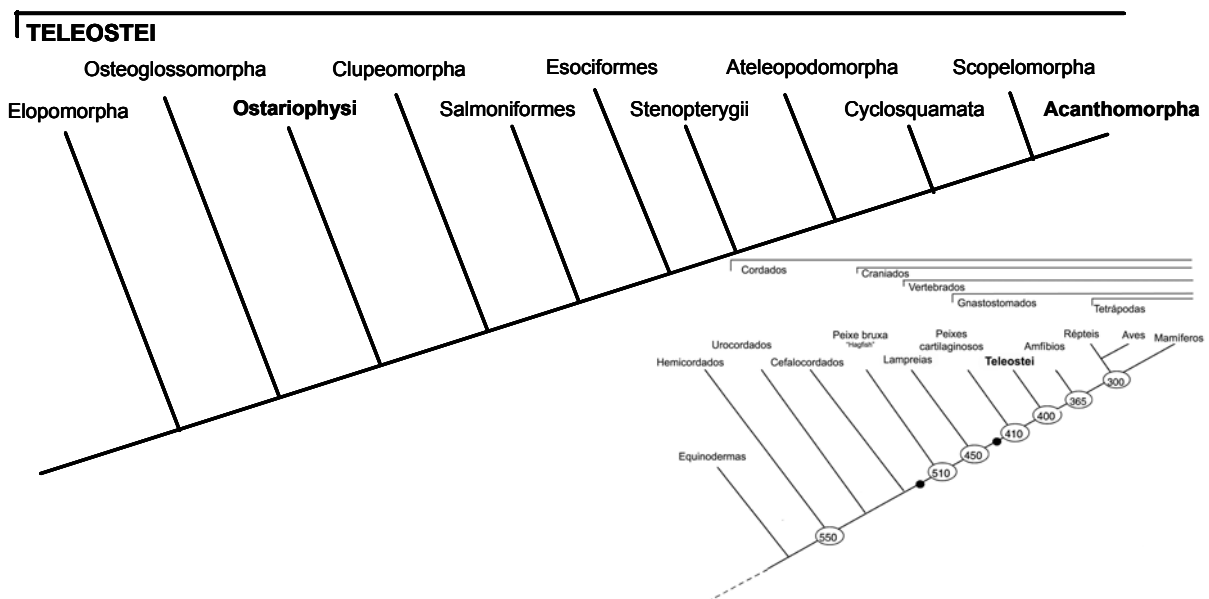


Figura 1.6) Cladograma da evolução dos teleósteos segundo o projeto *Tree of life* (<http://tolweb.org/tree/phylogeny.html>). Inciso: Cladograma da evolução dos cordados adaptado de (Hahn, 1998).

1.4.1 Os Acanthomorpha

A superordem Acanthomorpha é a maior superordem dos peixes, possuindo cerca de 16000 espécies em mais de 300 famílias. A maioria dessas famílias é de peixes marinhos, como o bacalhau, o atum e os linguados. Alguns peixes amplamente usados em pesquisas biológicas também são classificados nessa superordem. Como exemplo, podemos citar o baiacu (*Takifugu rubripes*, ordem Tetraodontiformes), o medaka (*Oryzias latipes*, ordem Beloniformes) e o barrigudinho (*Fundulus heteroclitus*, ordem Cyprinodontiformes) (Nelson, 2003; Chen *et al.*, 2004; Burnett *et al.*, 2007). Na superordem Acanthomorpha também é encontrada a ordem Perciformes, que compreende aproximadamente 40% das espécies de peixes ósseos e é a mais diversificada entre as ordens dos vertebrados. A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é uma espécie da ordem Perciformes, classificada na família Cichlidae. Com mais de 1300 espécies descritas, os Cichlidae (ciclídeos) formam a maior família da ordem Perciformes. Os ciclídeos são encontrados em ambientes de água doce na África, Ásia, América do Sul e Central. Tilápias, no entanto, são encontradas praticamente em todo o mundo devido ao seu uso na aquacultura.

1.4.2 Os Ostariophysi

A superordem Ostariophysi é a segunda maior superordem dos peixes, com cerca de 8000 espécies. Ao contrário dos Acanthomorpha, os Ostariophysi são peixes predominantemente de água doce e são encontrados em todos os continentes (exceto na Antártica). Estima-se que 68% dos peixes de água doce pertençam a essa superordem (Peng, Wang *et al.*, 2006). Como exemplo de espécies da superordem dos Ostariophysi, pode-se citar alguns peixes amplamente usados como modelo experimentais: o peixe-dourado (*Carassius auratus*, ordem Cypriniformes), o peixe-zebra ou paulistinha (*Danio rerio*, ordem Cypriniformes), carpa (*Cyprinus carpio*, ordem Cypriniformes) e o bagre americano (*Ictalurus punctatus*, ordem Siluriforme) (James *et al.*, 2005; Alestrom *et al.*, 2006). As ordens Cypriniformes e Siluriformes são as mais diversas entre os Ostariophysi. A ordem Siluriforme, entretanto, é pouco estudada em comparação com a Cypriniformes. A ordem Siluriformes é composta por peixes conhecidos popularmente como bagres e cascudos. A sistemática dessa ordem é complexa e ainda é alvo de intenso debate.

Contudo, uma subdivisão amplamente aceita é a que existe entre os grupos Siluroidei e Loricarioidei. Sullivan e colaboradores classificaram esses grupos como subordem (Sullivan et al., 2006). Outra característica dessa ordem que é amplamente aceita é sua distribuição geográfica. Enquanto espécies da subordem Siluroidei são encontradas nas Américas, na África, na Europa e na Ásia, as espécies da subordem Loricarioidei são endêmicas da América do Sul (Sullivan et al., 2006). Os cascudos (*Hypostomus luetkeni* e *H. affinis*) são classificados na família Loricariidae, da subordem Loricarioidei. A família Loricariidae é a maior família da ordem Siluriformes, com cerca de 700 espécies válidas.

2. OBJETIVOS

Em estudo de monitoramento ambiental realizado pelo nosso laboratório ao longo da bacia do rio Paraíba do Sul e do rio Guandu, usando uma atividade enzimática marcadora de CYP1A, a etoxiresorufina-O-desetilase (EROD), observamos que duas espécies de cascudos da família Loricariidae não apresentavam atividade detectável de EROD no fígado. A ausência de atividade foi constatada inclusive em cascudos coletados em locais contaminados, onde indivíduos de outras espécies (e.g.: acará, *Geophagus brasiliensis* e tilápia, *Oreochromis niloticus*) exibiam clara indução de EROD hepático (Santos, 2004). Por outro lado, estudos não publicados do Museu Nacional do Rio de Janeiro sugerem que os cascudos são as espécies mais afetadas por malformações e lesões cutâneas em uma região cronicamente contaminada por benzo[a]pireno, um pré mutágeno ativado por CYP1A (Dr. Gustavo Nunan, comunicação pessoal). Coletivamente, esses achados indicam que os Loricarídeos possuem um sistema de biotransformação funcional capaz de ativar o benzo[a]pireno, mas que de alguma forma é diferente do encontrado nas demais espécies de peixes. Situado nesse contexto, o objetivo geral deste trabalho foi investigar os processos da biotransformação de xenobióticos, especialmente os relacionados aos citocromos P450 da subfamília 1A (CYP1A), em cascudos da família Loricariidae. Como existem poucos dados sobre CYPs e sobre a biotransformação de xenobióticos em cascudos, procuramos realizar um estudo comparativo com peixes melhor estudados da família Cichlidae (tilápia) e com mamíferos (camundongos).

2.1 Objetivos específicos

1 - Avaliar a genotoxicidade do DMBA, um pré mutágeno ativado predominantemente por CYP1A, através da análise da frequência de eritrócitos micronucleados em sangue periférico de cascudos e tilápias

2 - Verificar o efeito de tratamentos com indutores de CYP1A (BNF e DMBA) sobre as reações catalisadas por isoformas de P450 em fígado de cascudos, tilápias e camundongo.

2.1 - investigar a participação de CYP1A na catálise das reações mais relevantes (EROD, ECOD) através de ensaios de inibição *in vitro*;

2.2- determinar o K_m e a $V_{máx.}$ dessas enzimas em relação a esses substratos.

3 - Avaliar a expressão de proteínas do CYP hepático (CYP1A e CYP3A) nas espécies estudadas

4 - Identificar as proteínas do CYP expressas no fígado de cascudos e tilápias

5 - Determinar as atividades enzimáticas catalisadas por diferentes isoformas de CYP em brânquias, intestino e coração de cascudos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta dos peixes

Cascudos (*Hypostomus luetkeni*, Fig. 3.1b, e *Hypostomus affinis*, Fig. 3.1c) de ambos os sexos foram coletados com o auxílio da equipe do Laboratório de Ictiologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (licença IBAMA n: 02022.003326/2003 - 17) e de pescadores locais. Para o primeiro experimento, os cascudos (*H. luetkeni*) foram capturados por rede de espera e por tarrafa, principalmente durante a noite. A coleta foi realizada no rio Preto, no trecho localizado no distrito de Afonso Arinos, município de Rio das Flores, estado do Rio de Janeiro, Brasil (Lat.: 22° 00' 38.44"S; Long.: 43° 21' 52.5"O). Após a captura, os peixes foram transportados para a estação de piscicultura da EMATER-RJ em Rio das Flores, onde foram mantidos em tanques de depuração (aprox. 1000L, Figura 3.2a), com circulação contínua de água (vazão aprox.: 80 L/min) por, no mínimo, duas semanas antes dos tratamentos. Para o segundo experimento, cascudos (*H. affinis*) foram coletados apenas por meio de tarrafas e durante o dia. A coleta foi realizada no rio Jacutinga, afluente do rio Preto, município de Santa Rita do Jacutinga, estado de Minas Gerais, Brasil (Lat.: 22° 9' 5.87"S; Long.: 44° 5' 33.65"O). Após a captura, os peixes foram transportados para o sítio Pouso de Minas, no mesmo município da coleta, onde foram mantidos em tanques de água com circulação contínua por uma semana antes do tratamento (capacidade: 500L, 5 peixes por tanque, vazão aprox.: 60 L/min, Figura 3.2b).

Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*, Fig. 3.1a) de ambos os sexos foram gentilmente doadas pela estação de piscicultura da EMATER-RJ. As Tilápias foram transferidas dos lagos de criação da EMATER para tanques de depuração (Fig. 3.2a) e mantidas com circulação contínua de água, nos mesmos tanques dos cascudos, por no mínimo duas semanas antes dos tratamentos. Em todos os casos os peixes foram mantidos em condições naturais de iluminação mas sob proteção da incidência direta da luz solar. A água utilizada para o abastecimento dos tanques foi proveniente de fontes naturais, da região onde os peixes foram capturados, não tendo nenhuma interferência humana evidente (contaminação/tratamento).

a)



b)



c)



Ana Cardoso

Figura 3.1) Peixes coletados para estudo: a) Tilápia, *Oreochromis niloticus*; b) Cascudo, *Hypostomus luetkeni*; e c) Cascudo, *Hypostomus affinis*.

a)



b)



Figura 3.2: Tanques de depuração, a) da estação de piscicultura da EMATER em Rio das Flores, onde cascudos e tilápias foram mantidos durante o primeiro experimento e b) no sítio Pouso de Minas, onde cascudos foram mantidos durante o segundo experimento.

3.2 Exposição aos xenobióticos

Os espécimes de tilápias e cascudos foram expostos, por injeção intraperitoneal (i.p.), à β -naftoflavona (BNF) ou ao 7, 12-dimetil-dibenzoantraceno (DMBA), ambos administrados em dose única de 50mg/kg, diluídos em óleo de milho (Fig. 3.3). Imediatamente antes do tratamento, cada peixe era retirado do tanque, pesado e colocado em um pequeno recipiente com água enquanto a seringa era avolumada com solução de 50 μ g/ μ L de BNF ou DMBA. Com a seringa avolumada, o peixe era retirado da água, imobilizado e inoculado com 1 μ L/g da solução de BNF ou DMBA. Os animais eram colocados em tanques de acordo com o indutor recebido, sendo mortos um, três ou sete dias após o tratamento (dias 1, 3 ou 7). O grupo controle foi formado por tilápias e cascudos não tratados, mantidos em tanque separado, mortos no dia que os demais peixes foram tratados (dia 0).

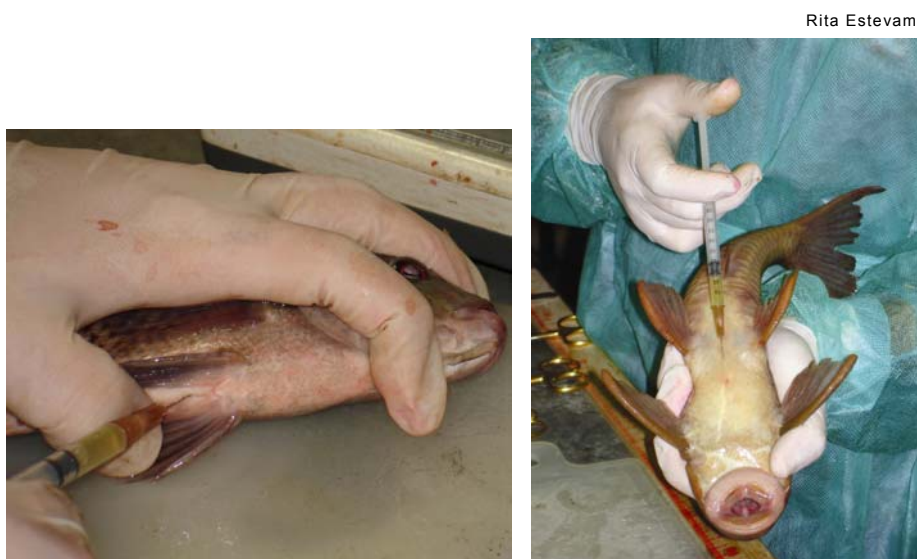


Figura 3.3) Tratamento via intraperitoneal de tilápias e cascudos com BNF ou DMBA.

As duas substâncias administradas foram escolhidas pelas razões que se seguem:

- BNF (Fig. 3.4a), por ser um conhecido ligante do receptor Ah e por ser amplamente utilizada para a indução de isoformas da subfamília CYP1A em diversas espécies (Troxel *et al.*, 1997; Hahn *et al.*, 1998; Bastos *et al.*, 2004; Parente *et al.*, 2008). Além do CYP1A, a BNF também interfere com a expressão de outras proteínas como: CYP2B, CYP2C, CYP3A, GST, UDPGT, ABC, AhR, AhRR, ARNT, CAT (The Comparative Toxicogenomics Database, 2008). A BNF usada neste trabalho foi comprada da SIGMA (número de catálogo: N-3633, número do lote: 69H1176).

- o DMBA (Fig. 3.4b), por ser um hidrocarboneto aromático policíclico (PAH) e um potente pré-mutágeno. O DMBA induz CYP1A em diversas espécies e é ativado por isoformas desta subfamília (Weimer *et al.*, 2000; Weber e Janz, 2001). O DMBA usado nesse trabalho foi comprado da SIGMA (número de catálogo: D-3254, número do lote: 64H0011). O tratamento com dose única de 50 mg/kg, tanto de BNF como de DMBA, tem se mostrado eficaz para a indução de CYP1A em diversas espécies e, no caso do DMBA, também para aumentar a frequência de micronúcleos (Hahn *et al.*, 1998; Bastos *et al.*, 2004; Poca *et al.*, 2008).

a)

b)

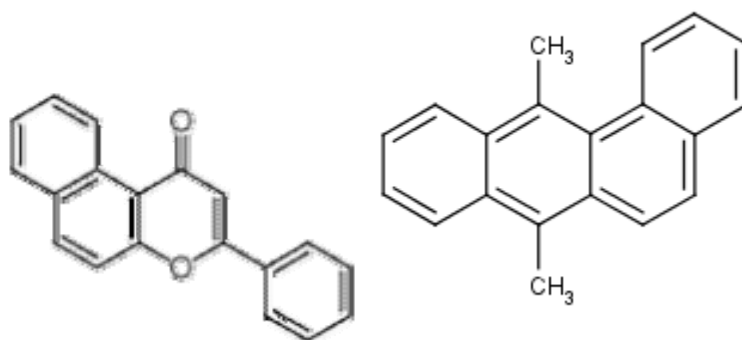


Figura 3.4) Estruras químicas da a) β -naftoflavona (BNF) e b) do 7-12 dimetilbenzoantraceno (DMBA)

3.3 Eutanásia e dissecação

Todos os peixes foram mortos em campo por secção cervical, seguida de decapitação, segundo as recomendações sobre cuidados e usos de peixes em pesquisa, ensino e testes, de 2005, do Conselho Canadense de Cuidados com Animais (Ccac, 2005). Após a morte, o sangue periférico dos peixes dos grupos controle e tratado com DMBA foi colhido em lâmina de vidro para a preparação de distensões sangüíneas. O peso total e o comprimento da ponta da cabeça à nadadeira caudal (comprimento furca: CF) foram anotados. No primeiro experimento, tilápias e cascudos, controles e tratados com BNF ou DMBA, foram mortos um, três ou sete dias após o tratamento e dissecados para a remoção do fígado. O segundo experimento foi realizado apenas com cascudos (*H. affinis*). Neste caso, controles e tratados com BNF foram mortos três dias após a injeção e imediatamente dissecados para a remoção do fígado, do coração, das brânquias e de parte do intestino. Todo o procedimento de dissecação foi realizado em gelo e durou menos do que 10 minutos. Imediatamente após a remoção, os órgãos foram pesados, embalados, identificados, congelados e armazenados em nitrogênio líquido até o preparo da fração microsomal.

3.4 Camundongos Suíços

Camundongos suíços machos livres de patógenos específicos (spf) foram fornecidos pelo CECAL-FIOCRUZ e mantidos no biotério do Laboratório de Toxicologia Ambiental. Com aproximadamente 10 semanas, os camundongos foram tratados por via intraperitoneal com 50 mg/kg de BNF e mortos um, três ou sete dias após o tratamento. Os animais foram mortos por deslocamento cervical. Os camundongos foram então dissecados para a remoção do fígado, que foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido até o preparo da fração microsomal.

3.5 Avaliação da genotoxicidade do DMBA em cascudos e tilápias

A genotoxicidade do DMBA em cascudos e tilápias foi avaliada pela determinação da frequência de eritrócitos com micronúcleos no sangue periféricos dos peixes. As lâminas com as distensões sangüíneas foram fixadas em etanol e coradas com Giemsa por 10 minutos. Para determinar a frequência de eritrócitos com micronúcleos, examinamos 3000 eritrócitos por animal (em 3 contagens independentes, em campos distintos, de 1000 eritrócitos cada). Foram considerados micronúcleos corpos corados de até dois terços do tamanho do núcleo principal, fisicamente separados deste e não refringentes segundo os critérios estabelecidos por da Silva Souza 2006 (Da Silva Souza e Fontanetti, 2006). A contagem dos micronúcleos em eritrócitos foi realizada em microscópio de luz convencional (Olympus BX45) em aumento total de 1000x.

3.6 Preparo da fração microssomal

No laboratório todas as etapas foram realizadas em banho de gelo ou em temperaturas de até 4°C. Cada órgão foi descongelado e homogeneizado individualmente, com homogeneizador do tipo Potter-Elvehjen, em tampão Tris-HCl (Tris 100 mM, KCl 150mM, pH 7,4), em volume correspondente a 4 vezes o peso do órgão ou no máximo 7 mL. Esse homogeneizado foi centrifugado à 9000 g por 30 minutos em centrífuga Eppendorf 5804R. O sobrenadante dessa centrifugação foi transferido para tubos de ultracentrífuga e centrifugado à 100.000 g por 1 hora em ultracentrífuga Hitachi CP70MX. O sobrenadante da primeira ultracentrifugação foi desprezado e o depósito ("*pellet*", microssomos) ressuspenso em tampão Tris-HCl e novamente centrifugado a 100.000 g por 1 hora para melhor remoção de hemoglobina contaminante. O precipitado (microssomo) da segunda ultracentrifugação foi ressuspenso em 2 mL de tampão fosfato de potássio (K₂HPO₄ 100 mM, EDTA 1 mM, 20% glicerol pH 7,4), aliquotado em criotubos e armazenado em congelador (-70 C).

3.7 Dosagem de proteínas totais

A concentração de proteínas totais na fração microsomal foi medida pelo método de Bradford (Bradford, 1976) adaptado para microplaca. Em resumo, as frações microsomais de cada indivíduo foram diluídas 30x em tampão KH_2PO_4 50 mM, NaCl 150mM pH 7,2. Cinco microlitros de cada amostra diluída foi adicionada em um poço da placa de 96 poços. A curva padrão foi construída com diluições seriadas de albumina sérica bovina – BSA (Sigma P5619). A leitura em espectrofotômetro (Spectramax plus 384, Molecular Devices®) foi realizada a 595nm com sensibilidade normal, 30 minutos após a adição do reagente de Bradford. Todas as determinações foram realizadas em triplicata.

3.8 Determinação das atividades enzimáticas

3.8.1 Alcoxiresorufina-O-desaquilases

A desalquilação de uma série de ésteres de resorufina tem como produto final a resorufina – um composto fluorescente - e é usada para a avaliação *in vitro* da atividade enzimática de algumas isoformas do citocromo P450 (Fig.: 3.5). Em mamíferos, especialmente em roedores, a desalquilação de cada éster de resorufina é catalisada predominantemente por determinada isoforma de CYP. Dessa forma, em roedores, a atividade de etoxiresorufina-O-desetilase (EROD) é considerada um marcador específico para o CYP1A1; a atividade de metoxiresorufina-O-desmetilase (MROD) é um marcador para o CYP1A2; enquanto as atividades de pentoxiresorufina-O-despentilase (PROD) e benziloxiresorufina-O-desbenzilase (BROD) são marcadores para as isoformas da subfamília CYP2B (2B1/2B2 em ratos e 2B9/2B10 em camundongos) (Burke et al., 1994). Em peixes, as atividades de EROD e MROD são considerados marcadores de CYP1A (Sen e Arinc, 2000; Smeets *et al.*, 2002; Parente *et al.*, 2004; Torre *et al.*, 2006; Parente *et al.*, 2008). Não é bem conhecido que isoforma catalisa PROD e BROD em fígado de peixes, mas em geral acredita-se que essas atividades também sejam mediadas por isoformas da subfamília CYP2B (Ruus *et al.*, 2002; Mortensen e Arukwe, 2007; Matsuo *et al.*, 2008). As reações de desalquilação de

ésteres de resorufina (EROD, MROD, PROD e BROD) são coletivamente representadas pela sigla “XROD”.

O acúmulo de resorufina foi medido à 30°C na fração microsomal de peixes e à 37°C para camundongos em espectrofluorímetro Shimadzu RF530IPC (parâmetros: Ex.: 550nm, Em.: 582nm, abertura das fendas: 5,0 e sensibilidade alta) essencialmente como descrito por Burke e colaboradores (1994) (Burke et al., 1994), exceto pela substituição do NADPH por um sistema regenerador de NADPH. Em resumo, a reação (volume final: 2 mL) foi realizada pela incubação de substrato (5 µM etoxi-, metoxi-, pentoxi-, ou benziloxiresorufina), fração microsomal (200 µg de proteína microsomal) em tampão K₂HPO₄ 100mM pH 7,8, em cubetas de quartzo até alcançarem a temperatura do ensaio. A reação foi iniciada pela adição de 50 µL sistema regenerador de elétrons (Glicose-6-fosfato 500 mM, Glicose-6-fosfato desidrogenase 0,5 U/mL, β-NADP 25 mM e MgCl₂ 1 M). O acúmulo de resorufina foi acompanhado por um minuto e trinta segundos. Em todos os casos, as reações se mantiveram em velocidade inicial por, pelo menos, dez minutos. As atividades específicas de XROD foram calculadas a partir da variação da intensidade de fluorescência durante o tempo da reação e das curvas padrão de resorufina; sendo expressas em picomoles de resorufina por minuto por miligrama de proteína total na fração microsomal. As curvas padrão foram construídas pela determinação da intensidade de fluorescência de soluções de resorufina (Aldrich 23,015-4 lot.: HS08509HR) em diferentes concentrações (0, 10, 20, 50, 100 e 200 pmoles de resorufina). Todas as determinações foram realizadas em triplicata.

3.8.2 Etoxicumarina-O-desetilase (ECOD)

Em roedores, a atividade de ECOD é compartilhada por várias isoformas de CYP, não sendo considerada, portanto, um marcador específico de determinada isoforma (Fig. 3.5). As principais isoformas de CYP que participam da hidrólise da etoxicumarina são: CYP1A1, 1A2, 2A2, 2B1, 2C11, 2C13, 2E1, 3A2 (Funae e Imaoka, 1993). Em peixes, não se sabe ao certo quais são as isoformas de CYP envolvidas na catálise da reação de ECOD (Stegeman *et al.*, 1997; Hugla e Thome, 1999; Klinger *et al.*, 2001).

A atividade de ECOD foi determinada de acordo com o método descrito por Funae & Imaoka (Funae e Imaoka, 1993). Em resumo, dez microlitros dos microsossomos diluídos (2,5 mg ptn/mL) e o substrato, etoxicumarina (300 µM), foram incubados em tampão (Tris 70 mM pH 7,4) a 30° C por 10 minutos antes da adição do sistema regenerador de NADPH que deu início à reação. A reação durou 10 minutos e foi interrompida pela adição de 50 µL de ácido acético 2N e incubação em gelo. O produto da reação, a umbeliferona, foi extraído com clorofórmio e glicina 1,6 M pH 10,4 e quantificado em espectrofluorímetro Shimadzu RF530IPC (parâmetros: Ex.: 355, Em.: 460, abertura das fendas 5,0 e sensibilidade alta). A atividade específica de ECOD foi calculada a partir da intensidade de fluorescência do produto final (umbeliferona) produzido durante o tempo da reação, e das curvas padrão de umbeliferona, sendo expressas em picomoles de umbeliferona por minuto por miligrama de proteína total na fração microsossomal. As curvas padrão foram construídas pela determinação da intensidade de fluorescência de soluções de umbeliferona (Sigma U-7626 lot.: 76H3402) em diferentes concentrações (0, 0,025, 0,05, 0,075, 0,1, 0,15 e 0,2 ηmoles de umbeliferona).

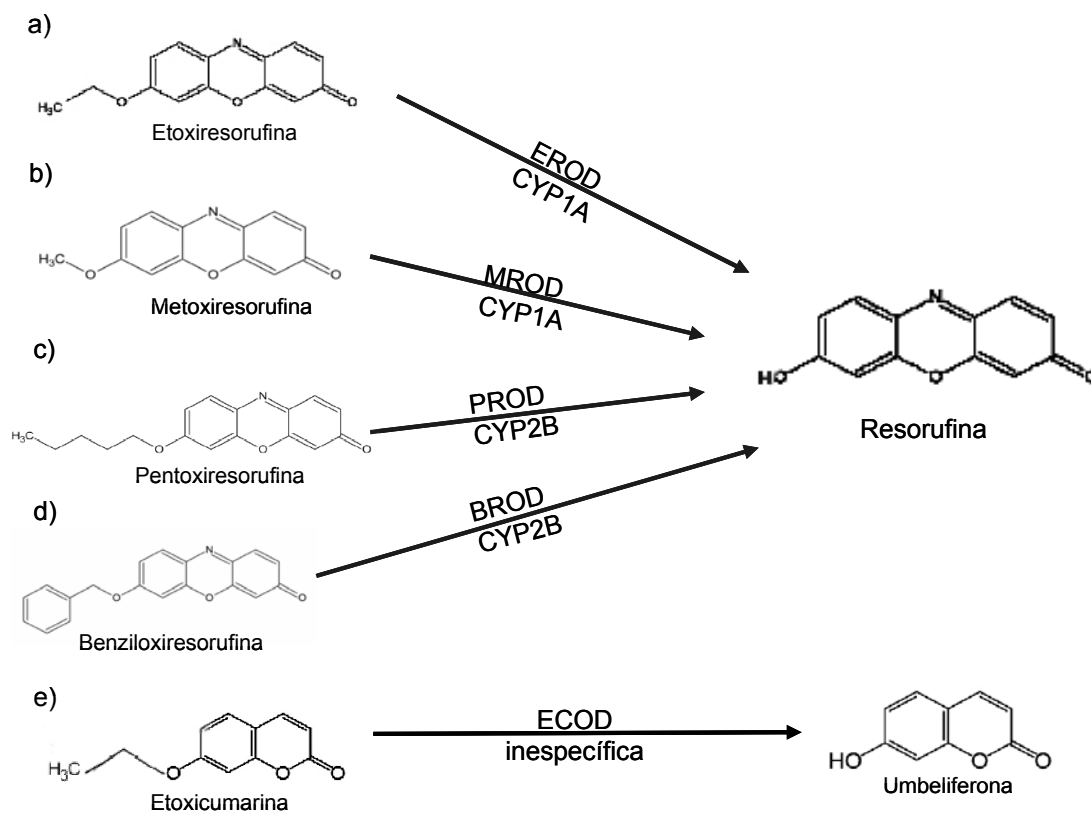


Figura 3.5) Esquema das atividades enzimáticas avaliadas neste trabalho.

3.8.3 Determinação da velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$), constante de Michaelis-Menten (K_m) e inibição enzimática

Todas as medidas de atividade empregadas para o cálculo de $V_{m\acute{a}x}$ e K_m foram realizadas em triplicata. Para essas determinações foram usados apenas microsossomos provenientes de peixes não tratados ($n=5$). A $V_{m\acute{a}x}$ e a K_m de EROD foram determinadas empregando as seguintes concentrações de etoxiresorufina: 0,025; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 5,0 e 7,5 μ M. A $V_{m\acute{a}x}$ e a K_m de ECOD foram determinadas usando as seguintes concentrações de etoxicumarina: 1; 10; 50; 100; 200; 300; 600; 1500; 3000; 5000 μ M. Os experimentos de inibição da atividade enzimática foram realizados pela incubação de 0,1 e 1,0 nM de α -naftoflavona, um conhecido inibidor de CYP1A, com a mistura de proteínas microsossomais e diferentes concentrações dos substratos antes do início das reações pela adição de um sistema regenerador de elétrons (Stegeman e Woodin, 1980; Bastos *et al.*, 2004). Nas determinações de EROD, a pré-incubação com a α -naftoflavona durou 1 minuto e nas reações de ECOD, esta pré-incubação durou 10 minutos.

3.8.4 Fixação do pH, temperatura, concentração de proteínas e tempo de reação

As atividades de XROD em diferentes condições de pH, temperatura, concentração de proteínas e tempo de reação foram determinados por método adaptado para microplaca. Neste caso, a resorufina produzida após o término da reação foi quantificada em espectrofluorímetro para microplaca (Spectramax Gemini XS, Molecular Devices®). Em resumo, tampão K_2HPO_4 100mM (pH 6,5; 7,8 ou 8,5) com o substrato e as proteínas microsossomais (25, 50 ou 100 μ g) foi pré-incubado até alcançar a temperatura desejada (20, 30 ou 37°C), quando a reação foi então iniciada pela adição de sistema regenerador de NADPH. A reação durou um, dois, cinco, dez ou quinze minutos e foi interrompida pela adição de 100 μ L de acetonitrila pura.

3.9 Eletroforese unidimensional

As proteínas da fração microssomal foram separadas em gel de 10% poliacrilamida, segundo o método de Laemmli (Laemmli, 1970). Brevemente, as proteínas foram desnaturadas pela adição de tampão 0.5M Tris-HCl pH 6.8 contendo 10% β -mercaptoetanol, 20% glicerol, 10% SDS e 0,05% azul de bromofenol e pelo aquecimento a 95°C, por cinco minutos. As proteínas desnaturadas foram aplicadas nos géis e separadas com corrente constante de 20mA por gel, durante o gel de empilhamento, e 40mA por gel, no gel de separação, à temperatura ambiente, usando o sistema Hoefer miniVE e fonte EPS301, ambos da GE Healthcare®.

3.10 *Western-blotting* e imunorrevelação

As proteínas separadas foram eletrotransferidas do gel para membranas de nitrocelulose (Hybond ECL, GE Healthcare®), usando o sistema Hoefer miniVE semi-úmido da GE Healthcare®, por 2 horas, a 400mA. A eficácia da transferência foi verificada pela coloração das membranas transferidas com 0,1% Ponceau S.

Os sítios inespecíficos da membrana foram bloqueados em solução a 5% de leite em pó desnatado, à 4°C, durante a noite. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas por 1 hora à temperatura ambiente com solução de anticorpo primário, segundo a recomendação dos fornecedores. O anticorpo monoclonal anti-CYP1A de peixe (MAb1-12-3) foi doado pelo Dr. John Stegeman, do Instituto Oceanográfico de Woods Hole, nos Estados Unidos (Stegeman, 1989); o anticorpo policlonal anti-CYP3A de peixe foi doado pela Dra. Malin Celander, da Universidade de Gotenberg, na Suécia (Celander, 1996; Celander et al., 2000) e o anticorpo policlonal anti-CYP1A de peixe foi comprado dos Laboratórios Biosense®, Bergen, Noruega. As bandas imunoreativas foram detectadas por quimioluminescência usando o kit ECL “*western blotting*” (RPN2109) da GE Healthcare® em filme autoradiográfico (Hyperfilm ECL, GE Healthcare®).

3.11 Excisão das bandas e digestão enzimática para identificação das proteínas por espectrometria de massas

As bandas de gel unidimensional foram excisadas com o auxílio de bisturi, armazenadas em tubos de 500 µL e cortadas em pequenos pedaços. As proteínas foram reduzidas em 100 µL de solução 65 mM DTT, por 30 minutos, à 56°C e alquiladas com 100 µL de solução de 200 mM iodoacetamida, por 30 minutos, à temperatura ambiente, no escuro. Os pedaços de gel foram lavados com 200 µL de 100 mM bicarbonato de amônio por 10 minutos. As bandas foram desidratadas por duas vezes com 200 µL de 100% acetonitrila, por cinco minutos, e reidratadas em 200 µL de 100 mM bicarbonato de amônio, por 10 minutos. As amostras foram secas em *Speed Vac* por 15 minutos. Ao pedaço de gel desidratado foi adicionada solução de tripsina diluída (20 µg de tripsina em 100 µL de 50 mM ácido acético, diluída 10 vezes com 50 mM bicarbonato de amônio). Os géis foram mantidos em gelo por 10 minutos para a penetração da tripsina, sem que houvesse digestão. O excesso de tripsina foi removido e os pedaços de géis foram incubados em 20 µL de 50 mM bicarbonato de amônio, durante a noite, à 37°C.

Os peptídeos foram extraídos do gel por sonicação com banho de ultra-som por 10 minutos e pela agitação vigorosa dos tubos (vortex) por 20 segundos. O bicarbonato de amônio com os peptídeos foi armazenado em tubo 500 µL. Ao gel restante foram adicionados 30 µL de solução 5% ácido fórmico, 50% acetonitrila. As amostras foram levadas ao ultrassom por mais 2 minutos e ao vortex por mais 20 segundos. A solução com os peptídeos foi removida e adicionada aos 20 µL anteriores, em tubo de 500 µL. Essa etapa da extração foi repetida mais uma vez. As amostras foram concentradas em *Speed Vac* até 10 µL. Os peptídeos extraídos foram dessalinizados em colunas de C18 (ZipTip, Millipore) e eluídos em 1,5 µL de acetonitrila pura para posterior análise por espectrometria de massas.

3.12 MALDI-TOF/TOF e identificação das proteínas

Os peptídeos extraídos e dessalinizados foram analisados por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF/TOF no modo *reflectron* (ABI 4700 Proteomics Analyser, Applied Biosystems, EUA). As amostras foram misturadas com matriz

(10 mg/mL ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico em 50% acetonitrila e 0,3% ácido trifluoacético) na proporção de 1:1 (v/v). As misturas foram aplicadas individualmente na placa de MALDI e secas à temperatura ambiente. A placa de MALDI foi calibrada com uma mistura dos seguintes peptídeos: arg-bradicinina (m/z 904,46), angiotensina I (m/z 1.296,68), glu1-fribriopeptídeo B (m/z 1.570,67), ACTH-(1-17) (m/z 2.093,08), ACTH-(18-39) (m/z 2.465,19). No modo MS, a relação massa/carga (m/z) dos íons observados corresponde às massas dos peptídeos obtidos pela digestão triptica das proteínas e foram detectados pelo espectrômetro (mapa peptídico). No modo MS/MS, os dez íons mais abundantes foram selecionados (“*timed ion selector*”) e fragmentados, preferencialmente nas ligações peptídicas, por colisão com nitrogênio (CID, *Collision Induced Dissociation*). As massas dos fragmentos gerados no modo MS/MS foram submetidas à busca contra o banco de dados não redundante do NCBI, com o auxílio do programa MASCOT (Matrix Science, Inglaterra). Os parâmetros usados na busca foram: duas clivagens de tripsina perdidas, $\pm 0,8$ Da de erro no modo MS, $\pm 0,6$ Da de erro no modo MS/MS e as seguintes modificações: carbamidometilação (Cys), oxidação (Met), fosforilação (Thr, Ser, Tyr) e pyro-Glu (N-terminal Glu). A especificação do instrumento para a busca de dados através do programa MASCOT foi “MALDI-TOF/TOF”. Quando necessário, os dados foram conferidos manualmente.

3.13 Estatística

Para o tratamento dos dados, foram utilizados os programas Microsoft® Office Excel® e GraphPad Prism versão 4.00 para Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com.

Como o número amostral foi relativamente baixo para uma análise de normalidade, empregamos testes não paramétricos para a análise estatística dos dados de atividade enzimática. Os testes de Kruskal-Wallis, seguido do teste *a posteriori* de Dunn’s foram usados para a análise desses resultados. O teste do qui-quadrado foi usado para a análise dos resultados de micronúcleo. O valor crítico de p usado para todas as análises estatísticas deste estudo foi de 0,05. A $V_{m\acute{a}x}$ e a K_m aparentes foram estimadas através dos métodos gráficos de

Lineweaver-Burk, Hanes-Woolf e Eade-Hofstee. Os valores obtidos nas três análises foram muito próximos e os que estão apresentados foram os obtidos pelo gráfico de Lineweaver-Burk.

4. RESULTADOS

Os seguintes animais foram empregados nos experimentos: 33 tilápias (*O. niloticus*) e 33 cascudos (*H. luetkeni*) coletados em Afonso Arinos, R.J.; 23 camundongos suíços (machos, com 10 semanas); e 15 cascudos (*H. affinis*) coletados em Santa Rita do Jacutinga, M.G.. Os dados relativos ao tamanho e peso do fígado e ao número (n) de animais em cada grupo estão apresentados nas tabelas 4.1 e 4.2.

4.1 Efeito clastogênico do DMBA em tilápias e cascudos

Os dados apresentados na tabela 4.3 mostram que a freqüência de eritrócitos com micronúcleos no sangue periférico de tilápias (*O. niloticus*) e de cascudos (*H. luetkeni*) tratados com DMBA (50 mg/kg ip) foi maior do que a verificada nos respectivos controles não tratados. Nas tilápias, a elevação da freqüência de eritrócitos com micronúcleos somente foi evidenciada estatisticamente nos peixes mortos três dias após o tratamento. Nos cascudos, o aumento da freqüência de eritrócitos com micronúcleos foi detectado estatisticamente em todos os intervalos de tempo pós-exposição ao DMBA (50 mg/kg ip) analisados. De fato, a freqüência máxima de eritrócitos com micronúcleos em cascudos (0,267%) foi superior à incidência máxima encontrada nas tilápias (0,167%). No entanto, enquanto nos cascudos a elevação máxima da incidência de eritrócitos com micronúcleos foi observada no primeiro dia após o tratamento, nas tilápias o aumento máximo ocorreu três dias após a injeção do DMBA. Como, no grupo de tilápias mortas um dia após o tratamento, só foi possível determinar a freqüência de micronúcleos em lâminas de um indivíduo, não é possível afirmar que haja diferenças entre as duas espécies quanto ao curso temporal do efeito clastogênico do DMBA. Os resultados demonstram claramente que o DMBA (50 mg/kg ip) foi genotóxico para as duas espécies de peixe. Como o DMBA é um clastógeno indireto, que necessita de ativação metabólica, os resultados sugerem ainda que as duas espécies possuem enzimas que catalisam a conversão deste pró-mutágeno em seu(s) metabólito(s) intermediário(s) eletrofilico(s). Como comentado na Introdução deste trabalho, o primeiro passo da via de ativação do DMBA é catalisado por citocromos P450 da família 1 (CYP1) (Shimada e Fujii-Kuriyama, 2004; Shimada, 2006).

TABELA 4.1: COMPRIMENTO (cm), PESO CORPORAL (g) E PESO DO FÍGADO (g), DOS PEIXES E CAMUNDONGOS UTILIZADOS (MÉDIA ± DP).

GRUPOS:		CONTROLE			BNF (50 mg/kg ip)		DMBA (50 mg/kg ip)		
TEMPO APÓS O TRATAMENTO (DIAS):		0	1	3	7	1	3	7	
TILÁPIA	COMPRIMENTO (cm)	21,20±1,9	21,00±2,9	21,00±2,9	20,60±2,3	22,20±1,1	21,00±1,0	19,00±0,8	
	PESO CORPORAL (g)	181,92±70,9	162,55±75,0	167,04±67,3	153,08±44,7	196,70±33,9	162,72±30,7	110,95±13,3	
<i>O. niloticus</i>	PESO FÍGADO (g)	2,14±1,2	1,83±1,5	1,99±0,7	2,13±0,8	3,13±1,2	1,73±0,7	1,19±0,1	
	(n)	5	4	5	5	5	5	4	
CASCUDO	COMPRIMENTO (cm)	27,00±2,4	27,00±1,9	28,80±2,2	26,50±7,8	26,20±2,6	27,80±2,0	26,33±2,4	
	PESO CORPORAL (g)	200,28±32,4	241,76±35,2	252,98±51,1	240,25±205,7	238,24±76,1	206,64±39,5	195,40±46,1	
<i>H.luetkeni</i>	PESO FÍGADO (g)	1,72±0,3	2,66±0,7	1,90±0,1	1,90±1,3	2,31±1,2	1,70±0,2	1,64±±0,2	
	(n)	5	5	5	2	5	5	6	
CAMUNDONGO	PESO FÍGADO (g)	1,96±0,4	1,91±0,3	2,25±0,3	2,42±0,5	-	-	-	
	(n)	9	5	5	4	-	-	-	

TABELA 4.2: COMPRIMENTO (cm) E PESOS (g) DO CORPO, DO FÍGADO, DO INTESTINO, DO CORAÇÃO E DAS BRÂNQUIAS DOS CASCUDOS (*H. affinis*) UTILIZADOS (MÉDIA ± DP).

	TAMANHO (cm)	PESO (g)				
		CORPORAL	FÍGADO	INTESTINO	CORAÇÃO	BRÂNQUIA
CONTROLE (n=5)	33,0±2,0	307,31±41,5	1,94±0,78	3,65±1,04	0,17±0,03	1,50±0,25
TRATADO (n=10)	27,0±2,5	170,76±30,0	1,55±0,33	1,75±0,22	0,08±0,04	1,41±0,5

TABELA 4.3: FREQUÊNCIA DE ERITRÓCITOS COM MICRÔNÚCLEOS NO SANGUE PERIFÉRICO DE TILÁPIAS (*O. niloticus*) E CASCUDOS (*H. luetkeni*) CONTROLES (0) E TRATADOS COM DMBA (50 mg/kg ip), 1, 3 E 7 DIAS APÓS O TRATAMENTO

FREQUÊNCIA DE ERITRÓCITOS MICRÔNUCLEADOS (%)				
DIAS APÓS O TRATAMENTO	0	1	3	7
TILÁPIA	0,026	0,100	0,167**	0,071
(n)	(5)	(1)	(3)	(4)
CASCUDO	0,019	0,267***	0,191***	0,199***
(n)	(5)	(5)	(5)	(5)

TESTE DO QUI-QUADRADO. AS DIFERENÇAS EM RELAÇÃO AO GRUPO CONTROLE SÃO ASSINALADAS POR ASTERISCO: **: $P < 0,001$; ***: $P < 0,0001$. (n) = NÚMERO DE INDIVÍDUOS ANALISADOS.

4.2 Atividade de monooxigenases hepáticas em tilápias e cascudos

4.2.1 Etoxiressorufina-O-desetilase (EROD)

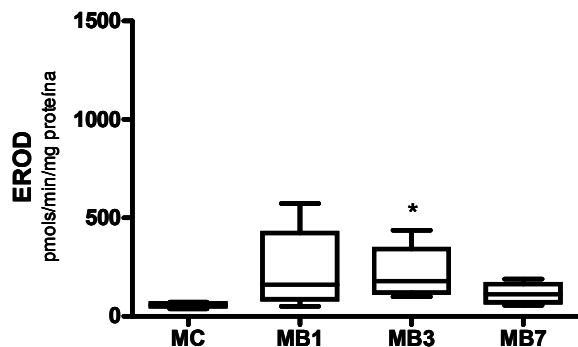
A BNF é um conhecido indutor das enzimas da subfamília CYP1A (Schlezinger e Stegeman, 2000) e, como esperado, o tratamento de camundongos com BNF (50 mg/kg ip) aumentou a atividade de EROD hepática. A atividade específica média de EROD nos camundongos controle foi $57,15 \pm 10,0$ pmols de resorufina por minuto por miligrama de proteína microsomal. Nos camundongos mortos 24 horas após o tratamento com BNF (MB1), a atividade de EROD foi 4,13 vezes maior do que a registrada nos controles. No grupo morto três dias após o tratamento (MB3), esse aumento foi de 3,86 vezes e, no grupo morto sete dias após a injeção de BNF (MB7), o aumento foi de 2,05 vezes. Apenas a indução observada no grupo MB3, no entanto, se mostrou estatisticamente diferente do controle (figura 4.1a).

De forma semelhante ao observado com os camundongos, o tratamento com BNF (50 mg/kg ip) aumentou a atividade de EROD em microsomas hepáticos de tilápias (*O. niloticus*). A atividade específica média de EROD nas tilápias controle foi $43,44 \pm 19,1$ pmols de resorufina por minuto por miligrama de proteína microsomal. Vinte e quatro horas após o tratamento das tilápias com BNF (50 mg/kg ip), a atividade de EROD no fígado foi 6,49 vezes maior do que a registrada nos respectivos controles não tratados.

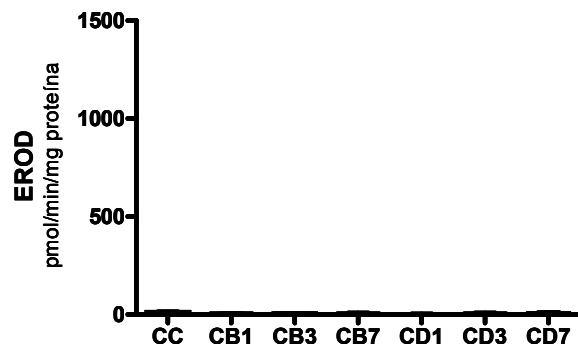
Três dias após o tratamento, o aumento foi de 12,43 vezes e, sete dias depois da administração de BNF (50 mg/kg ip), a elevação da EROD em relação à atividade dos controles, foi de 5,18 vezes. Entretanto, apenas a atividade registrada três dias após o tratamento diferiu estatisticamente da atividade encontrada nos controles não tratados. A indução da EROD causada por este tratamento com uma única dose de BNF (50 mg/kg ip) foi maior em tilápias do que em camundongos. Nas tilápias tratadas com DMBA (50 mg/kg ip), a atividade de EROD hepática 24 horas após o tratamento foi 11,07 vezes maior do que a atividade encontrada nos controles. Três dias após o tratamento a indução da EROD foi de 19,63 vezes e, sete dias depois da administração de DMBA (50 mg/kg ip), o aumento foi de 8,74 vezes em relação à atividade nos controles. Os aumentos da EROD hepática observados um e três dias após o tratamento foram detectados estatisticamente. Portanto, nas tilápias (*O. niloticus*), o DMBA (50 mg/kg ip) e a BNF (50 mg/kg ip) induziram a atividade de EROD no fígado (Figura 4.1c).

Nos cascudos (*H. luetkeni*) não tratados (controles) não detectamos a atividade de EROD na fração microsomal hepática. Como pode ser visto na figura 4.1b, a atividade de EROD hepática permaneceu sem ser detectada após os tratamentos com BNF (50 mg/kg ip) e DMBA (50 mg/kg ip), que são conhecidos indutores das enzimas da subfamília CYP1A (Schlezingler e Stegeman, 2000; Verbrugge *et al.*, 2001; Weber e Janz, 2001).

a - Camundongo



b - Cascudo



c - Tilápia

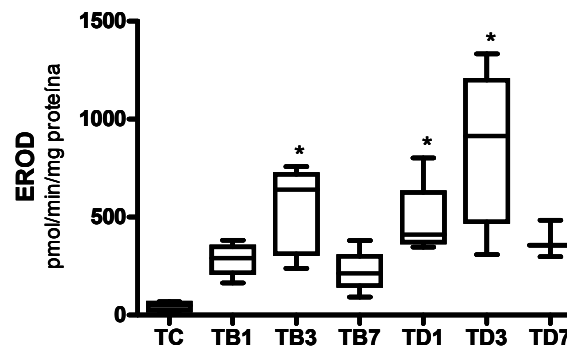


Figura 4.1) Efeito da β -naftoflavona (BNF, 50 mg/kg ip) e do 7,12-dimetilbenzoantraceno (DMBA, 50 mg/kg ip) sobre a atividade da etoxiresorufina-O-desetilase (EROD) em microsomos hepáticos de camundongos (*Swiss Webster*), cascudos (*H.luetkeni*) e tilápias (*O. niloticus*). a) Camundongos: controles (MC) e tratados, 1 (MB1), 3 (MB3) e 7 (MB7) dias após a injeção de BNF; b) Cascudos: controles (CC) e tratados, 1 (CB1, CD1), 3 (CB3, CD3) e 7 (CB7, CD7) dias após a injeção de BNF (B) ou DMBA (D); c) Tilápias: controles (TC) e tratadas, 1 (TB1, TD1), 3 (TB3, TD3) e 7 (TB7, TD7) dias após a injeção de BNF (B) ou, DMBA (D). Os dados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do teste *a posteriori* de Dunn's. As diferenças em relação ao respectivo grupo controle foram assinaladas por asterisco (*: $p < 0.05$).

4.2.2 Metoxiresorufina-O-desmetilase (MROD)

Nos camundongos, como esperado, o tratamento com BNF (50 mg/kg ip) aumentou a atividade de MROD na fração microsossomal hepática. A atividade específica média de MROD no fígado de camundongos controle foi $178,44 \pm 67,8$ pmols de resorufina por minuto por miligrama de proteína microsossomal. Vinte e quatro horas após a injeção de BNF (50 mg/kg ip), a atividade de MROD nos camundongos tratados foi 2,17 vezes maior do que a atividade registrada nos controles não tratados. Três dias após o tratamento, o aumento foi de 3,28 vezes e sete dias depois da injeção de BNF (50 mg/kg ip) o aumento foi de 2,26 vezes. Apenas o aumento de MROD hepática observado três dias após o tratamento se mostrou estatisticamente significativo (Figura 4.2a).

A administração de uma única dose de BNF (50 mg/kg ip) também aumentou a atividade de MROD no fígado das tilápias. A atividade específica da MROD hepática nas tilápias controles foi $20,59 \pm 12,2$ pmols de resorufina por minuto por miligrama de proteína microsossomal. Vinte e quatro horas após a injeção de BNF (50 mg/kg ip), a atividade de MROD nas tilápias tratadas foi 9,06 vezes maior do que a atividade encontrada nos controles. Três dias após a administração de BNF (50 mg/kg ip), o aumento foi de 19,38 vezes e, sete dias depois, o aumento foi de 6,12 vezes. Apenas o aumento da MROD hepática encontrado três dias após o tratamento das tilápias se mostrou estatisticamente significativo. Como ocorreu em relação a EROD, a indução de MROD produzida pelo tratamento das tilápias com BNF (50 mg/kg ip) foi maior do que a indução notada pós-tratamento análogo de camundongos. Nas tilápias tratadas com DMBA (50 mg/kg ip), a atividade de MROD vinte e quatro horas após o tratamento foi 14,91 vezes maior do que a verificada nos controles. Três dias depois da injeção de DMBA (50 mg/kg ip) a indução foi de 26,79 vezes e, sete dias depois do tratamento o aumento foi de 10,07 vezes. Assim como ocorreu com o BNF, apenas o aumento de MROD verificado três dias após a administração de DMBA (50 mg/kg ip) foi estatisticamente significativo (Figura 4.2c).

Nos cascudos (*H.luetkeni*) controle, não detectamos a atividade de MROD na fração microsossomal hepática. Como pode ser visto na figura 4.1b, a atividade de MROD permaneceu sem ser detectada após os tratamentos com BNF (50 mg/kg ip) e DMBA (50 mg/kg ip), dois conhecidos indutores de CYP1A (Schlezingner e Stegeman, 2000; Verbrugge *et al.*, 2001; Weber e Janz, 2001).

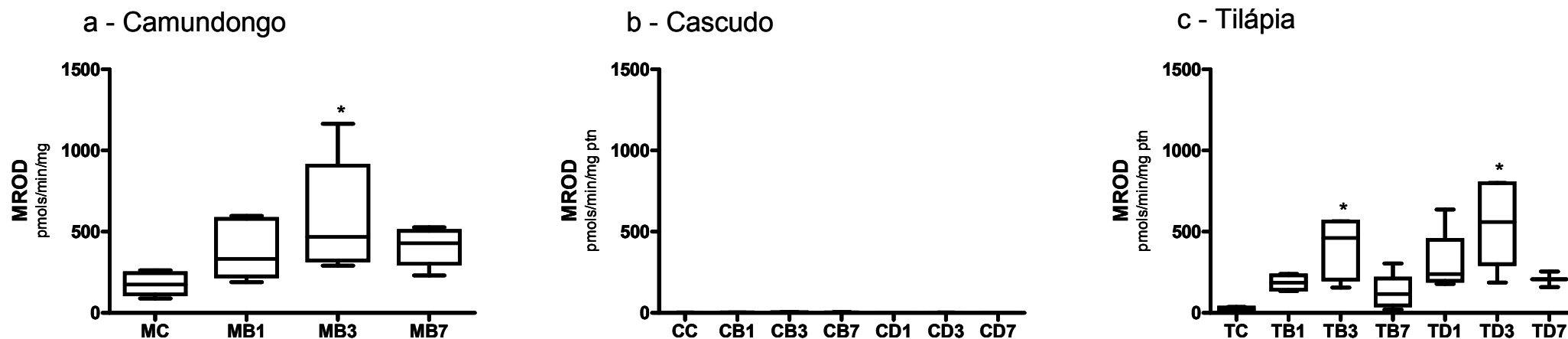


Figura 4.2) Efeito da β -naftoflavona (BNF, 50 mg/kg ip) e do 7,12-dimetilbenzoantraceno (DMBA, 50 mg/kg ip) sobre a atividade da metoxiresorufina-O-desetilase (MROD) em microsossomos hepáticos de camundongos (*Swiss Webster*), cascudos (*H.luetkeni*) e tilápias (*O. niloticus*). a) Camundongos: controles (MC) e tratados, 1 (MB1), 3 (MB3) e 7 (MB7) dias após a injeção de BNF; b) Cascudos: controles (CC) e tratados, 1 (CB1, CD1), 3 (CB3, CD3) e 7 (CB7, CD7) dias após a injeção de BNF (B) ou DMBA (D); c) Tilápias: controles (TC) e tratadas, 1 (TB1, TD1), 3 (TB3, TD3) e 7 (TB7, TD7) dias após a injeção de BNF (B) ou, DMBA (D). Os dados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do teste *a posteriori* de Dunn`s. As diferenças em relação ao respectivo grupo controle estão assinaladas por asterisco (*: $p < 0.05$).

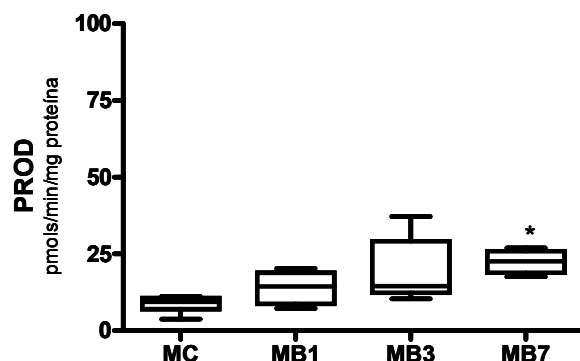
4.2.3 Pentoxiresorufina-O-despentilase (PROD)

O tratamento de camundongos com dose única de BNF (50 mg/kg ip) causou um discreto aumento da atividade de PROD no fígado. A atividade específica média de PROD em microssomas hepáticos de camundongos controle foi $8,76 \pm 2,5$ pmols de resorufina por minuto por miligrama de proteína microssomal. Vinte e quatro horas após o tratamento com BNF, a atividade de PROD foi 1,58 vez maior do que a atividade registrada nos camundongos controle. Três dias depois da administração de BNF (50 mg/kg ip), o aumento foi de 2,22 vezes e, sete dias depois, o aumento foi de 2,56 vezes. Entretanto, apenas a atividade de PROD medida sete dias após o tratamento com BNF diferiu estatisticamente da atividade encontrada nos controles não tratados (Figura 4.3a).

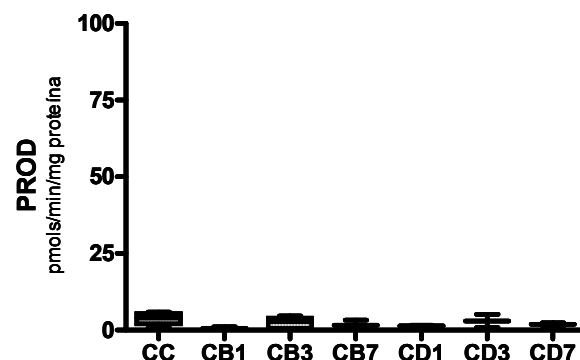
A BNF (50 mg/kg ip) também aumentou a atividade de PROD no fígado de tilápias (*O. niloticus*). A atividade específica de PROD nas tilápias controle foi $4,55 \pm 1,0$ pmols de resorufina por minuto por miligrama de proteína microssomal. Vinte e quatro horas após a injeção de BNF, a atividade de PROD foi 2,35 vezes maior do que a atividade nos controles. Três dias depois, o aumento foi de 5,86 vezes e sete dias depois a indução foi de 1,49 vez. Apenas o aumento da PROD hepática observado três dias após o tratamento se mostrou estatisticamente significativo. Nas tilápias tratadas com DMBA (50 mg/kg ip) também houve aumento da PROD no fígado. Essa indução foi de magnitude similar àquela observada nas tilápias tratadas com BNF (50 mg/kg ip). Nas tilápias tratadas com DMBA, a indução de PROD foi de aproximadamente 2,49 vezes, 4,50 vezes e 2,30 vezes, um, três e sete dias depois do tratamento, respectivamente. Assim como ocorreu com a BNF (50 mg/kg ip), apenas o aumento encontrado três dias após a administração de DMBA (50 mg/kg ip) foi estatisticamente significativo (Figura 4.3c).

Nos cascudos (*H. luetkeni*) controle, a atividade de PROD hepática foi baixa e os níveis foram semelhantes aos encontrados nas tilápias. Nos cascudos, no entanto, o tratamento com BNF (50 mg/kg ip) ou DMBA (50 mg/kg ip) não induziu essa atividade (Figura 4.3b).

a - Camundongo



b - Cascudo



c - Tilápia

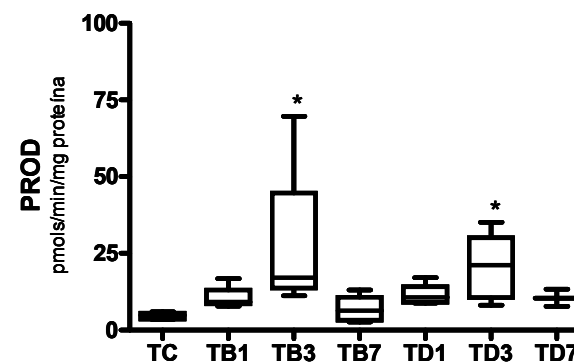


Figura 4.3) Efeito da β -naftoflavona (BNF, 50 mg/kg ip) e do 7,12-dimetilbenzoantraceno (DMBA, 50 mg/kg ip) sobre a atividade da pentoxiresorufina-O-desetilase (PROD) em microsomas hepáticos de camundongos (*Swiss Webster*), cascudos (*H.luetkeni*) e tilápias (*O. niloticus*). a) Camundongos: controles (MC) e tratados, 1 (MB1), 3 (MB3) e 7 (MB7) dias após a injeção de BNF; b) Cascudos: controles (CC) e tratados, 1 (CB1, CD1), 3 (CB3, CD3) e 7 (CB7, CD7) dias após a injeção de BNF (B) ou DMBA (D); c) Tilápias: controles (TC) e tratadas, 1 (TB1, TD1), 3 (TB3, TD3) e 7 (TB7, TD7) dias após a injeção de BNF (B) ou, DMBA (D). Os dados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do teste *a posteriori* de Dunn's. As diferenças em relação ao respectivo grupo controle estão assinaladas por asterisco (*: $p < 0.05$).

4.2.4 Benziloxiresorufina-O-desbenzilase (BROD)

Nos camundongos, a BNF (50 mg/kg ip) aumentou a atividade de BROD hepática. A atividade específica de BROD no fígado dos camundongos controle foi $19,29 \pm 8,5$ pmols de resorufina por minuto por miligrama de proteína microsomal. Vinte e quatro horas após a injeção de BNF (50 mg/kg ip), a atividade de BROD foi 2,61 vezes maior do que a registrada nos controles. Três dias depois da administração da BNF, o aumento foi de 5,12 vezes e sete dias depois a indução foi de 2,85 vezes. Apenas o aumento observado três dias após o tratamento foi estatisticamente significativo (Figura 4.4a).

A BNF (50 mg/kg ip) também induziu a atividade de BROD no fígado de tilápias. A atividade específica da BROD hepática nas tilápias controle foi $7,00 \pm 4,0$ pmols de resorufina por minuto por miligrama de proteína microsomal. Vinte e quatro horas após a injeção da BNF (50 mg/kg ip), a atividade da BROD foi 8,46 vezes maior do que a registrada nos controles não tratados. Três dias depois da administração, o aumento foi de 7,65 vezes e, sete dias depois, a indução foi de 3,24 vezes. Apesar desses fatores de indução (razão entre a atividade média nos tratados e a atividade média nos controles) a atividade de BROD não diferiu estatisticamente entre os grupos, possivelmente em decorrência da ampla dispersão dos valores individuais em torno das médias. Nas tilápias tratadas com DMBA (50 mg/kg ip), a atividade de BROD vinte e quatro horas após o tratamento foi 7,50 vezes maior do que a registrada nos controles. Três dias após a injeção de DMBA (50 mg/kg ip) a indução foi de 16,98 vezes e, sete dias depois, o aumento foi de 3,78 vezes. Apenas o aumento encontrado três dias após o tratamento com DMBA foi detectado estatisticamente (Figura 4.4c).

A atividade de BROD no fígado dos cascudos (*H. luetkeni*) controle foi menor do que a atividade dessa monooxigenase nas tilápias (*O. niloticus*) controle. Os tratamentos, quer com a BNF (50 mg/kg ip), quer com o DMBA (50 mg/kg ip), não aumentaram a atividade de BROD no fígado dos cascudos (Figura 4.3b).

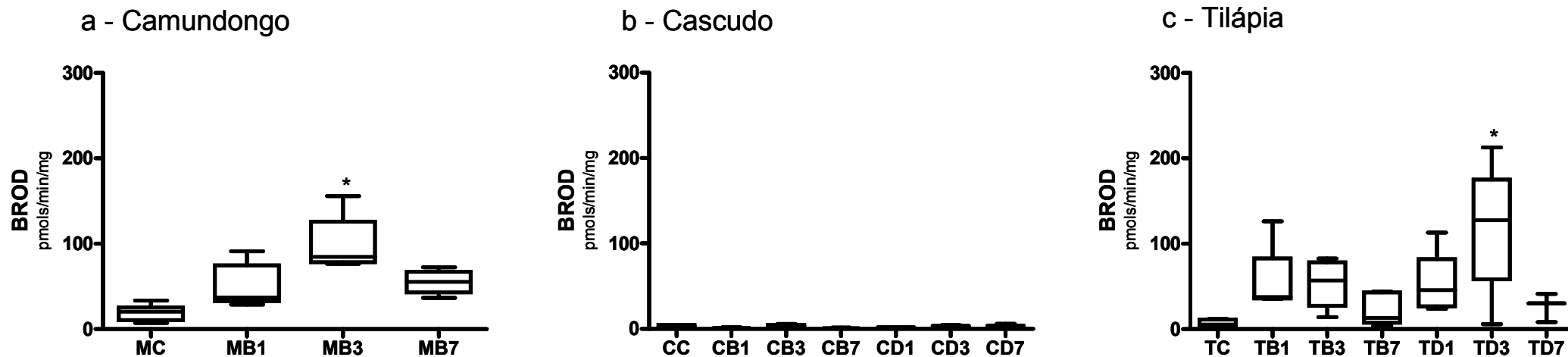


Figura 4.4) Efeito da β -naftoflavona (BNF, 50 mg/kg ip) e do 7,12-dimetilbenzoantraceno (DMBA, 50 mg/kg ip) sobre a atividade da benziloxiresorufina-O-desetilase (BROD) em microsossomos hepáticos de camundongos (*Swiss Webster*), cascudos (*H. luetkeni*) e tilápias (*O. niloticus*). a) Camundongos: controles (MC) e tratados, 1 (MB1), 3 (MB3) e 7 (MB7) dias após a injeção de BNF; b) Cascudos: controles (CC) e tratados, 1 (CB1, CD1), 3 (CB3, CD3) e 7 (CB7, CD7) dias após a injeção de BNF (B) ou DMBA (D); c) Tilápias: controles (TC) e tratadas, 1 (TB1, TD1), 3 (TB3, TD3) e 7 (TB7, TD7) dias após a injeção de BNF (B) ou, DMBA (D). Os dados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do teste *a posteriori* de Dunn`s. As diferenças em relação ao respectivo grupo controle estão assinaladas por asterisco (*: $p < 0.05$).

4.2.5 Etoxicumarina-O-desetilase (ECOD)

A atividade de ECOD no fígado dos camundongos tratados com BNF (50 mg/kg ip) foi maior do que a atividade registrada no grupo controle (não tratado). No grupo controle, a atividade específica média de ECOD hepática foi $429,58 \pm 169,2$ pmols de umbeliferona por minuto por miligrama de proteína microsomal. Vinte e quatro horas após a injeção de BNF (50 mg/kg ip), a atividade de ECOD foi 2,04 vezes maior do que a registrada nos controles. Três dias após a administração da BNF (50 mg/kg ip), ECOD foi 1,86 vez maior que a atividade média registrada no grupo controle não tratado e, sete dias depois da injeção de BNF, esse aumento foi de 2,40 vezes. Apesar da aparente indução, esses aumentos de ECOD após o tratamento com BNF não se mostraram estatisticamente significativos (Figura 4.5a).

A atividade de ECOD no fígado das tilápias (*O. niloticus*) foi cerca de 10 vezes menor do que a atividade registrada em camundongos. Nas tilápias controle a atividade específica da ECOD em foi $81,25 \pm 16,8$ pmols de umbeliferona por minuto por miligrama de proteína microsomal. Vinte e quatro horas após o tratamento com BNF, a atividade de ECOD foi 0,81 vez a atividade registrada nos controles. Três dias depois da injeção de BNF, essa razão foi 0,69 e, sete dias depois, de 0,38. A diminuição da atividade de ECOD encontrada sete dias após o tratamento foi estatisticamente significativa ($p < 0,01$). Nas tilápias tratadas com DMBA (50 mg/kg ip), a atividade de ECOD foi menor do que a verificada nos controles. Nessas tilápias, a atividade de ECOD vinte e quatro horas após a injeção foi 0,63 vez a atividade registrada nos controles. Três dias depois a razão tratado/controle foi 0,58 e sete dias depois foi de 0,26. Como havia sido notado com a BNF, apenas a redução da atividade de ECOD encontrada sete dias após o tratamento com DMBA (50 mg/kg ip) se mostrou estatisticamente significativa ($p < 0,01$) (Figura 4.5c).

A atividade de ECOD no fígado dos cascudos (*H. luetkeni*) controle foi semelhante à verificada nos camundongos e cerca de 10 vezes maior do que a atividade registrada nas tilápias. Os resultados mostraram que nenhum dos dois tratamentos foi capaz de induzir ECOD nos microsomas hepáticos dos cascudos. A atividade de nenhum dos grupos foi estatisticamente diferente da atividade do grupo controle ($p > 0,05$, em todos os casos). Nos cascudos controle, a atividade de ECOD foi em média $494,63 \pm 294,0$ pmols de umbeliferona por minuto por miligrama de proteína microsomal. No grupo de cascudos tratados com BNF (50 mg/kg ip), vinte e quatro horas após o tratamento, a

atividade de ECOD foi 0,59 vez a atividade notada nos controles. Três dias após a injeção, a razão tratado/controle foi 0,66 e sete depois foi 0,91. Nos cascudos tratados com DMBA (50 mg/kg ip), vinte e quatro horas após a administração, a atividade de ECOD hepática foi 1,54 vez a atividade registrada nos controles. Três dias depois, a razão tratado/controle foi 0,59 e, sete dias depois, foi 0,66 (Figura 4.5b). Entre as monooxigenases avaliadas, a ECOD foi a única em que as atividades registradas no fígado de cascudos foram comparáveis às encontradas nos camundongos. A atividade de ECOD no tecido hepático de cascudos (*H. luetkeni*) foi também cerca de 10 vezes a atividade registrada nas tilápias (*O. niloticus*). Nas duas espécies de peixes os tratamentos, quer com BNF quer com DMBA (50 mg/kg ip), não foram capazes de induzir a atividade de ECOD.

A ausência de indução da ECOD nos peixes tratados quer com BNF, quer com DMBA, dois conhecidos indutores de atividades mediadas por CYP1A (e.g. EROD) via ligação ao receptor Ah, sugere que isoformas da subfamília CYP1A não contribuem de forma expressiva para a catálise da reação de desetilização da etoxicumarina em cascudos e tilápias.

O fato da atividade constitutiva de ECOD ter sido elevada nos microsomas hepáticos dos cascudos mostra que esses loricarídeos possuem CYP funcionais e que a não detecção da atividade de outras monooxigenases (e.g. EROD) nessa mesma preparação não se deveu a degradação do citocromo, nem a peculiaridades do sistema de transferência de elétrons não contempladas nas condições de realização do ensaio, ou a falhas inadvertidas de conservação do tecido ou preparo dos microsomas.

Um resumo dos efeitos dos tratamentos com BNF e DMBA sobre as atividade de XROD e ECOD de camundongos, cascudos e tilápias está mostrado na tabela 4.4.

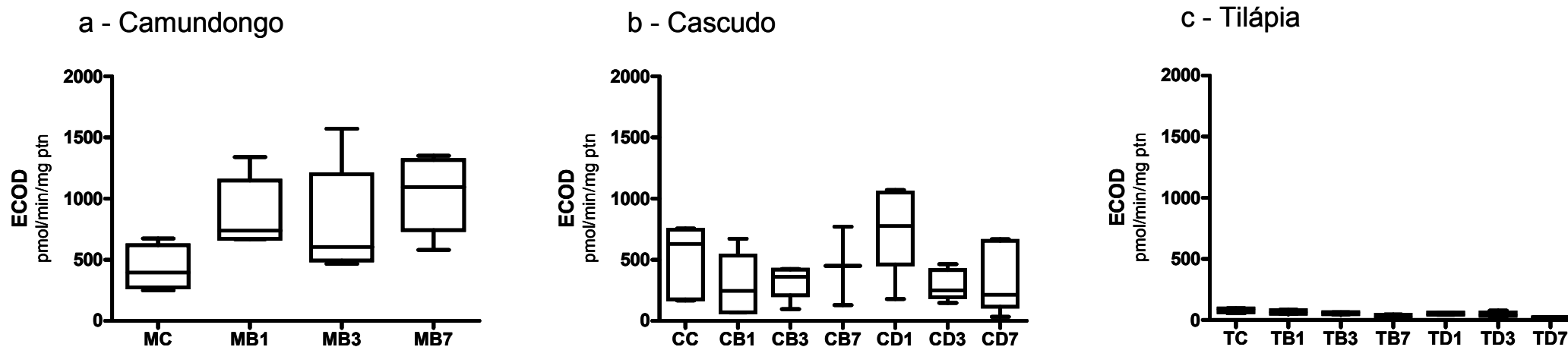


Figura 4.5) Efeito da β -naftoflavona (BNF, 50 mg/kg ip) e do 7,12-dimetilbenzoantraceno (DMBA, 50 mg/kg ip) sobre a atividade da etoxicumarina-*O*-desetilase (ECOD) em microsossomos hepáticos de camundongos (*Swiss Webster*), cascudos (*H. luetkeni*) e tilápias (*O. niloticus*). a) Camundongos: controles (MC) e tratados, 1 (MB1), 3 (MB3) e 7 (MB7) dias após a injeção de BNF; b) Cascudos: controles (CC) e tratados, 1 (CB1, CD1), 3 (CB3, CD3) e 7 (CB7, CD7) dias após a injeção de BNF (B) ou DMBA (D); c) Tilápias: controles (TC) e tratadas, 1 (TB1, TD1), 3 (TB3, TD3) e 7 (TB7, TD7) dias após a injeção de BNF (B) ou, DMBA (D). Os dados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do teste *a posteriori* de Dunn`s. As diferenças em relação ao respectivo grupo controle estão assinaladas por asterisco (*: $p < 0.05$).

Tabela 4.4) Efeitos da β -naftoflavona (BNF 50 mg/kg ip) e do 7,12-dimetilbenzoantraceno (DMBA 50 mg/kg ip) sobre as atividades (médias \pm D.P.) de EROD, MROD, PROD, BROD e ECOD em microsomas hepáticos de camundongos Suíços (BNF apenas), cascudos (*H.luetkeni*) e tilápias (*O. niloticus*), 1, 3 e 7 dias após o tratamento. Os fatores de indução (FI = atividade média do tratado / atividade média do controle) são mostrados entre parênteses.

TRATAMENTOS:		CONTROLE (μ mol/min/mg ptn)	INDUÇÃO CAUSADA PELOS TRATAMENTOS (EM VEZES A ATIVIDADE DO CONTROLE)					
			BNF			DMBA		
			1 DIA	3 DIAS	7 DIAS	1 DIA	3 DIAS	7 DIAS
CAMUNDONGO	EROD	57,15 \pm 10,0 (1)	236,03 \pm 204,6 (4,13)	220,79 \pm 131,6 (3,86)	117,33 \pm 58,4 (2,05)	-	-	-
	MROD	178,44 \pm 67,8 (1)	387,91 \pm 182,5 (2,17)	585,99 \pm 350,9 (3,28)	403,86 \pm 131,7 (2,26)	-	-	-
	PROD	8,76 \pm 2,5 (1)	13,85 \pm 5,3 (1,58)	19,48 \pm 10,6 (2,22)	22,39 \pm 4,3 (2,56)	-	-	-
	BROD	19,29 \pm 8,5 (1)	50,33 \pm 25,3 (2,61)	98,65 \pm 32,8 (5,12)	54,94 \pm 15,5 (2,85)	-	-	-
	ECOD	429,58 \pm 169,2 (1)	875,91 \pm 284,9 (2,04)	798,34 \pm 453,5 (1,86)	1029,59 \pm 357,1 (2,40)			
TILÁPIA	EROD	43,44 \pm 19,1 (1)	281,85 \pm 91,4 (6,49)	539,93 \pm 218,1 (12,43)	224,83 \pm 118,6 (5,18)	480,88 \pm 183,1 (11,07)	852,87 \pm 393,1 (19,63)	379,86 \pm 95,6 (8,74)
	MROD	20,59 \pm 12,2 (1)	186,44 \pm 51,6 (9,06)	398,93 \pm 185,1 (19,38)	126,02 \pm 107,7 (6,12)	306,92 \pm 186,9 (14,91)	551,48 \pm 261,5 (26,79)	207,26 \pm 47,5 (10,07)
	PROD	4,55 \pm 1,0 (1)	10,70 \pm 4,1 (2,35)	26,69 \pm 24,2 (5,86)	6,79 \pm 4,1 (1,49)	11,32 \pm 3,3 (2,49)	20,47 \pm 10,5 (4,50)	10,48 \pm 2,8 (2,30)
	BROD	7,00 \pm 4,0 (1)	59,23 \pm 44,8 (8,46)	53,52 \pm 27,4 (7,65)	22,70 \pm 18,8 (3,24)	52,52 \pm 35,7 (7,50)	118,86 \pm 74,5 (16,98)	26,47 \pm 16,7 (3,78)
	ECOD	81,25 \pm 16,8 (1)	65,96 \pm 17,2 (0,81)	56,47 \pm 8,6 (0,69)	31,25 \pm 12,9 (0,38)	51,26 \pm 8,9 (0,63)	47,27 \pm 18,3 (0,58)	21,48 \pm 2,0 (0,26)
CASCUDO	EROD	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	MROD	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	PROD	3,76 \pm 2,0 (1)	0,59 \pm 0,7 (0,16)	2,34 \pm 1,8 (0,62)	1,66 \pm 2,3 (0,44)	1,36 \pm 0,3 (0,36)	2,95 \pm 3,1 (0,78)	1,91 \pm 0,7 (0,51)
	BROD	2,67 \pm 2,2 (1)	0,92 \pm 1,3 (0,34)	3,40 \pm 1,5 (1,27)	0,67 \pm 0,9 (0,25)	1,92 \pm 0,3 (0,72)	3,49 \pm 1,1 (1,31)	3,91 \pm 2,8 (1,46)
	ECOD	494,63 \pm 294,0 (1)	291,30 \pm 252,1 (0,59)	324,40 \pm 133,5 (0,66)	450,79 \pm 453,7 (0,91)	760,29 \pm 356,2 (1,54)	293,91 \pm 123,2 (0,59)	328,53 \pm 284,3 (0,66)

N.D. = não detectado

4.3 Atividade das alcoxi-resorufina-O-desalquilases (EROD, MROD, PROD e BROD) em microsomas hepáticos de cascudos e tilápias: Influência do pH, da temperatura e da quantidade de proteína

Para verificar se a ausência de atividade das alcoxi-resorufina-O-desalquilases (XROD) nos cascudos (ou atividades extremamente baixas, quando comparadas com camundongos e tilápias) seria devido a eventuais diferenças entre as espécies quanto às condições ótimas para a reação, variamos alguns parâmetros críticos para a eficiência da atividade catalítica, tais como: pH, temperatura da reação, quantidade da proteína e concentração do substrato. Nesses testes, usamos a fração microsomal hepática de cascudos (*H. luetkeni*) e tilápias (*O. niloticus*). Exceto nos casos de determinação do K_m e V_{max} aparentes, todos os ensaios foram realizadas empregando o método adaptado para espectrofluorímetro de placa (*i.e.*, ensaio em placas de 96 poços). A principal diferença entre os métodos com espectrofluorímetro de cubeta e com espectrofluorímetro de placa é que, no primeiro, a reação ocorre na cubeta e é acompanhada em tempo real, enquanto no segundo, a reação ocorre nos poços da placa e é interrompida depois de um determinado tempo para quantificação do acúmulo de resorufina (produto da reação).

4.3.1 Influência do pH

As atividades de EROD, MROD, PROD e BROD (XROD) foram determinadas em tampões com valores de pH ajustados para 6,5, 7,8 ou 8,5. Nesses experimentos, usamos frações microsomais provenientes de tilápias (*O. niloticus*) e cascudos (*H. luetkeni*) mortos três dias após a administração da DMBA 50 mg/kg ip (n=5).

No intervalo testado, o pH não alterou as atividades de XROD em microsomas hepáticos de cascudos, que permaneceram consistentemente muito baixas. Nos microsomas de tilápias, as atividades de XROD foram de um modo geral menores no pH mais ácido (6,5), mas não variaram entre 7,8 e 8,5 (Figura 4.6).

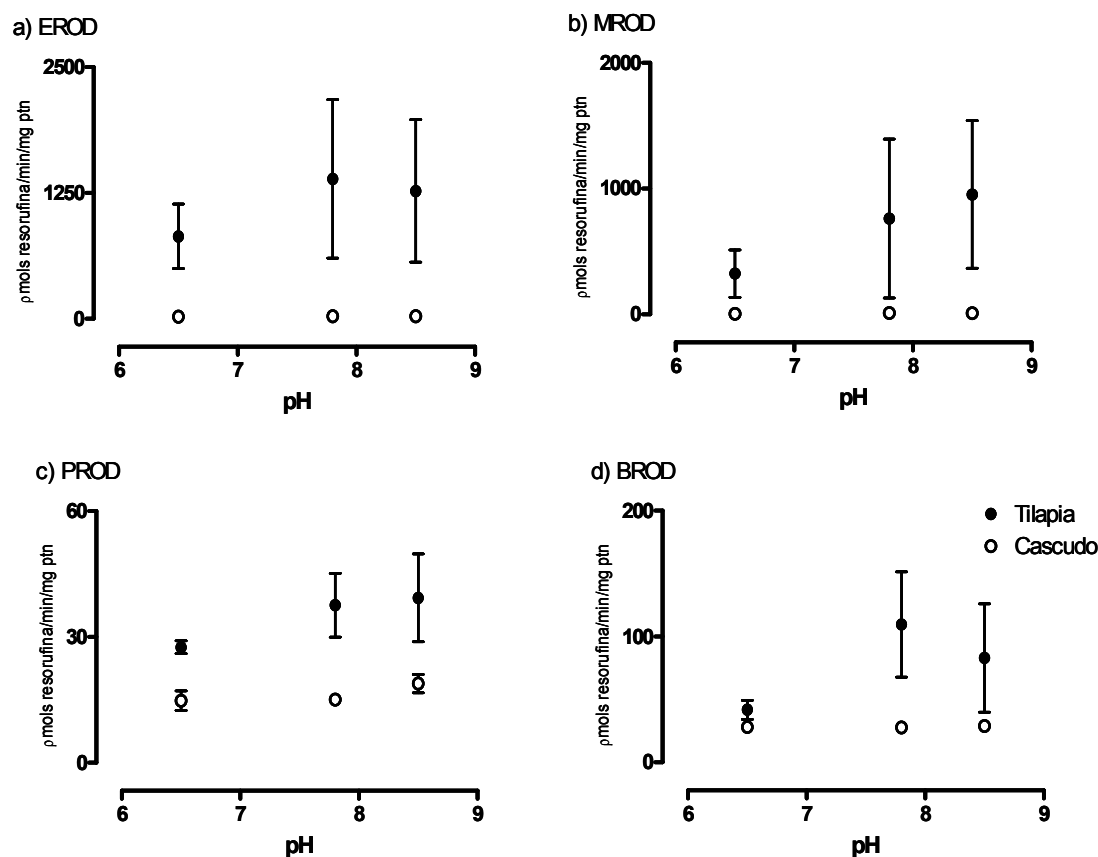


Figura 4.6) Influência do pH (6,5; 7,8; 8,5) sobre as atividades de EROD (a), MROD (b), PROD (c) e BROD (d) em microsomas hepáticos de tilápias (*O. niloticus*) (●) e cascudos (*H. luetkeni*) (○) mortos 3 dias após a administração de DMBA 50 mg/kg ip (n=5). Temperatura: 30°C; Quantidade de proteína por poço: 25 µg. Tempo de reação: 10 minutos, Concentração de substrato = 5 µM.

4.3.2 Influência da temperatura

A influência da temperatura sobre as atividades de EROD, MROD, PROD e BROD em microsomas hepáticos de tilápias (*O. niloticus*) e cascudos (*H. luetkeni*) foi determinada no intervalo de 20 a 37 °C (i.e., 20, 30 e 37°C). Nesses experimentos, foram usadas frações microsossomais de tilápias mortas sete dias após a injeção de BNF 50 mg/kg ip (n=5) e cascudos mortos um dia após o tratamento com BNF 50 mg/kg ip (n=5).

Nos cascudos, a temperatura da reação, no intervalo testado, não modificou as atividades de XROD que permaneceram consistentemente baixas, quase não detectadas. Nas tilápias, entretanto, as atividades de EROD e MROD medidas a

20°C foram menores do que as atividades registradas a 30°C e 37°C. A elevação da temperatura de 30°C para 37°C parece não ter alterado as atividades de EROD e MROD no fígado das tilápias. Em relação à PROD e BROD parece ter havido um pequeno aumento das atividades com a elevação da temperatura do ensaio (Figura 4.7).

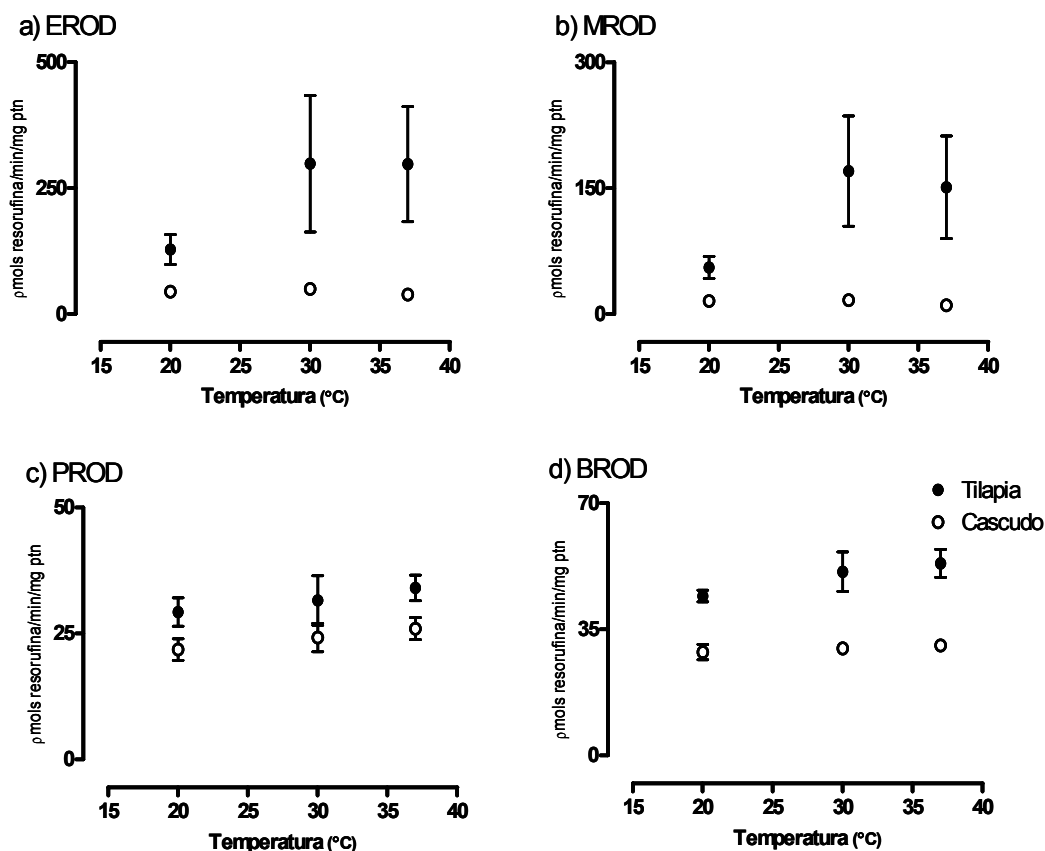


Figura 4.7) Influência da temperatura (20, 30, 37°C) sobre as atividades de EROD (a), MROD (b), PROD (c) e BROD (d) na fração microsomal hepática de tilápias (*O. niloticus*) (●) mortas 7 dias após o tratamento com BNF e cascudos (*H. luetkeni*) (○) mortos 1 dias após a administração de BNF 50 mg/kg ip (n=5). pH: 7,8; Quantidade de proteína por poço: 25 µg. Concentração de substrato = 5 µM; tempo de reação: 10 minutos.

4.3.3 Linearidade da reação: acúmulo do produto (resorufina) versus tempo de reação

A linearidade da reação ao longo do tempo foi determinada apenas para a atividade de EROD. A quantidade de resorufina produzida foi determinada em reações que duraram 1, 2, 5, 10 e 15 minutos. Nesses experimentos, foram usadas

frações microssomais de tilápias (*O. niloticus*) mortas vinte e quatro horas após a injeção de DMBA 50 mg/kg ip (n=5) e cascudos (*H.luetkeni*) mortos um ou sete dias após o tratamento com DMBA 50 mg/kg ip (n=5).

Como pode ser observado na Figura 4.8, a quantidade de resorufina - produzida pela desetilação da etoxiresorufina (EROD) nos microssomas hepáticos de tilápias – foi uma função linear da duração da reação no intervalo de tempo testado (1-15 minutos). Nos cascudos, entretanto, não houve aumento discernível da quantidade de resorufina originária da desetilação da etoxiresorufina (EROD) neste intervalo de tempo. Ou seja, a quantidade de resorufina registrada em um minuto de reação foi a mesma quantidade determinada após 15 minutos. Esses resultados sugerem que, nas condições do ensaio, os microssomas hepáticos de cascudo não catalisam a hidrólise da etoxiresorufina (EROD).

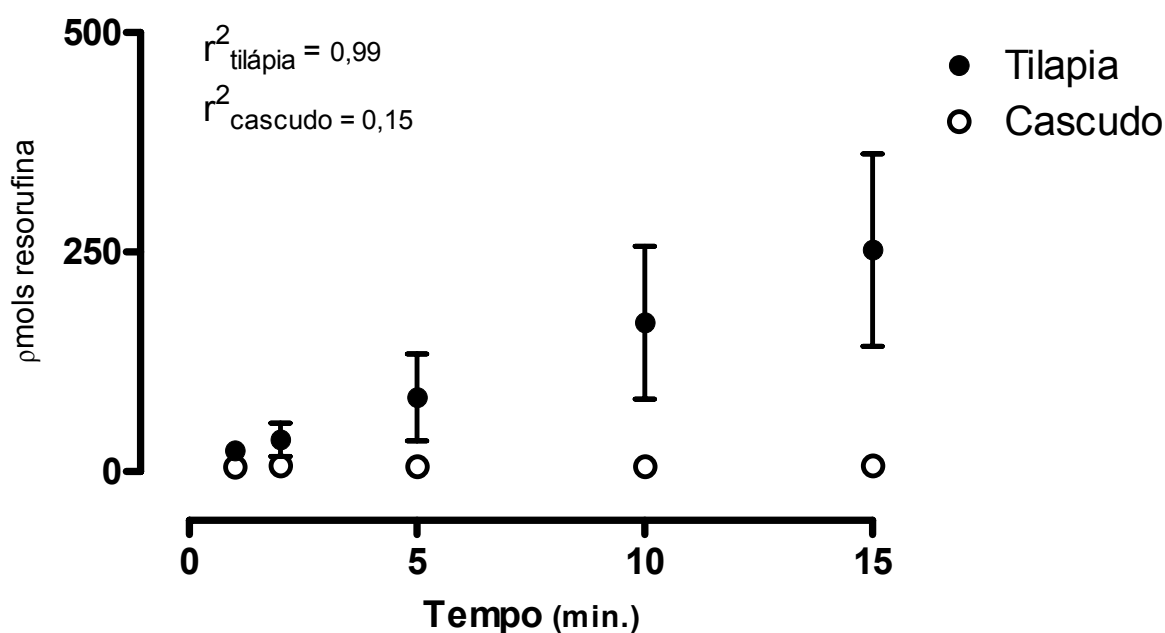


Figura 4.8) Acúmulo de resorufina produzida a partir da etoxiresorufina (EROD) com o prolongamento do tempo de reação (1, 2, 5, 10 e 15 minutos) em microssomas hepáticos de tilápias (*O. niloticus*) (●) e cascudos (*H. luetkeni*) (○) n=5. pH = 7,8; Temperatura: 30°C; Quantidade de proteína por micro-poço: 25 µg, Concentração de substrato = 5 µM.

4.3.4 Influência da quantidade de proteínas

A relação entre o acúmulo de resorufina durante o período de incubação (10 minutos) e a quantidade de proteína por micro-poço foi analisada apenas para o substrato etoxiresorufina (EROD). A quantidade de resorufina produzida pela desetilação da etoxiresorufina em ensaios realizados com a adição de 25, 50 e 100 microgramas de proteína microsomal por poço foi determinada. Nesses ensaios, foram usados microsomas hepáticos de tilápias (*O. niloticus*) mortas vinte e quatro horas após a administração de DMBA 50 mg/kg ip (n=5) e cascudos (*H. luetkeni*) mortos um e sete dias após o tratamento com DMBA 50 mg/kg ip (n=5).

Nas tilápias, a quantidade de resorufina produzida aumentou de acordo com a quantidade de proteína usada no ensaio. O aumento da resorufina acumulada, entretanto, não foi proporcional à quantidade de proteína adicionada em todo o intervalo analisado. Enquanto a quantidade de resorufina aproximadamente dobrou com o aumento da quantidade de proteína de 25 para 50 µg / poço, o incremento da quantidade de resorufina gerada foi menor quando a quantidade de proteínas aumentou de 50 para 100 µg / poço. Assim, nas condições desse ensaio, houve linearidade do acúmulo do produto da reação (resorufina) entre 25 e 50 µg proteína / poço e, portanto, a atividade de EROD não variou com a quantidade de proteína neste intervalo, mas o aumento da atividade de EROD foi menor com a adição de 100 µg / poço. Este menor aumento da atividade com a adição de maior quantidade de proteína possivelmente se deveu a um esgotamento de cofatores ou do substrato diminuindo a velocidade da reação durante parte (terminal) do período de incubação (Figura 4.9).

Nos cascudos (*H.luetkeni*), apesar do aumento da quantidade de proteína microsomal nos poços, não foi possível discernir qualquer aumento da quantidade de resorufina acumulada durante o ensaio. Em que pese a elevação da quantidade de proteína, a atividade de EROD permaneceu quase não detectada no fígado desses loricarídeos.

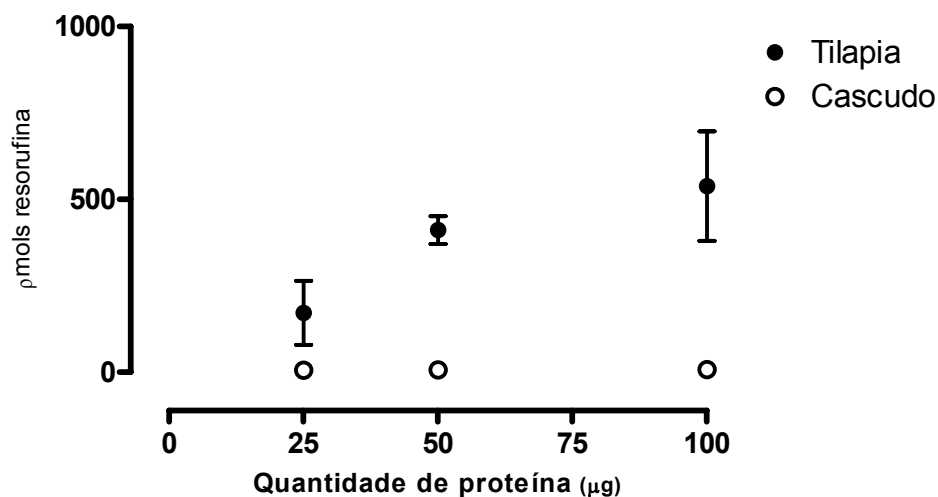


Figura 4.9) Relação entre o acúmulo da resorufina produzida a partir da etoxiresorufina (EROD) e a quantidade de proteína microssomal hepática adicionada (25, 50, 100 µg de proteína) aos poços. Foram usados microssomos hepáticos de tilápias (*O. niloticus*) (●) e cascudos (*H. luetkeni*) n=5 (○). Tempo de incubação = 10 minutos, pH = 7,8; Temperatura: 30°C; Concentração de substrato = 5 µM.

4.3.5 Determinação do K_m e V_{max} da etoxiresorufina-O-desetilase (EROD) e etoxicumarina-O-desetilase (ECOD) em microssomos hepáticos de tilápias (*O. niloticus*) e cascudos (*H. luetkeni*)

As constantes de Michaelis-Menten (K_m) e as velocidades máximas (V_{max}) na fração microssomal hepática foram estimadas para as atividades de EROD em tilápias (*O. niloticus*) e de ECOD em cascudos (*H. luetkeni*) e tilápias. Para determinação desses parâmetros, os ensaios foram realizados com as seguintes concentrações de substrato: etoxiresorufina (EROD); 0,025, 0,050, 0,1, 0,25, 0,5, 1,0, 2,0, 5,0 e 7,5 µM; etoxicumarina (ECOD); 1, 10, 50, 100, 200, 300, 600, 1500, 3000 e 5000 µM.

Nesses experimentos, empregamos microssomas de um único indivíduo (não tratado) de cada espécie. Todas as determinações foram realizadas em triplicata e usando, no caso da EROD, o método envolvendo o registro em tempo real do acúmulo de resorufina (reação ocorrendo na cubeta do espectrofluorímetro).

Nos cascudos (*H. luetkeni*), a atividade de EROD permaneceu sem ser detectada em todo o intervalo de concentrações do substrato (etoxiresorufina, 0,025 – 7,5 μM) analisado neste estudo (não mostrado). Nas tilápias (*O. niloticus*), no entanto, a atividade de EROD aumentou progressivamente com a elevação da concentração de etoxiresorufina até atingir um nível máximo (platô) a partir da concentração de 0,5 μM . O K_m e a V_{max} , estimados pelo método gráfico de Lineweaver-Burk, foram 0,92 μM (K_m) e 41,29 μmol de resorufina por minuto por miligrama de proteína microsomal (V_{max}) (Figura 4.10).

Atividade de ECOD hepática em cascudos, como havíamos visto anteriormente, é aproximadamente 10 vezes maior do que a atividade dessa monooxigenase em tilápias. Em microsomas hepáticos de cascudos (*H. luetkeni*), os K_m e V_{max} para ECOD foram estimados em 32,45 μM (K_m) e 287,9 μmol de umbeliferona por minuto por miligrama de proteína microsomal (V_{max}). Na fração microsomal hepática de tilápias (*O. niloticus*), esses parâmetros cinéticos foram 218,96 μM (K_m) e 24,52 μmol de umbeliferona por minuto por miligrama de proteína microsomal (V_{max}) (Figura 4.11).

4.4 Efeito da α -naftoflavona sobre as atividades de EROD em microsomas hepáticos de tilápias (*O. niloticus*) e de ECOD em microsomas hepáticos de cascudos (*H. luetkeni*) e tilápias

A α -naftoflavona (α -NF) é um conhecido inibidor *in vitro* de atividades mediadas pelo CYP1A (Stegeman e Woodin, 1980). Ao passo que a atividade de EROD é amplamente usada como marcador da atividade catalítica do CYP1A em peixes, não se sabe ao certo quais isoformas de CYP são responsáveis pela atividade de ECOD no fígado desses vertebrados. Nos experimentos relatados a seguir procuramos verificar se a α -NF era capaz de inibir a atividade de ECOD em cascudos e tilápias. A eventual inibição da ECOD pela α -NF poderia ser considerada como uma indicação de que esta reação é catalisada por CYP1A nessas espécies. Como é conhecido que EROD no fígado de peixes é mediada por CYP1A, comparamos o efeito da α -NF (0,1 e 1 nM) sobre ECOD de cascudos e tilápias com o efeito das mesmas concentrações deste inibidor sobre EROD de tilápias.

Como mostrado na figura 4.10, as duas concentrações de α -NF testadas foram capazes de inibir fortemente a atividade de EROD em microsossomos hepáticos de tilápias. De fato, nas concentrações mais baixas de substrato (etoxiresorufina) EROD foi completamente inibida até mesmo na presença da menor concentração de α -NF (0,1nM). Na maior concentração de substrato (7,5 μ M), a atividade na presença da menor concentração de α -NF (0,1 nM) correspondeu a 52% e, na presença da maior concentração de α -NF (1 nM), caiu a 20% da atividade na ausência do inibidor (= 100%). Como a α -NF é considerada um inibidor relativamente específico de CYP1A, esses resultados são consistentes com a hipótese amplamente aceita de que a atividade de EROD em fígado de peixes é um marcador para a atividade catalítica de CYP1A.

Investigamos também se as mesmas concentrações de α -NF que inibem EROD seriam capazes de inibir a atividade de ECOD em tilápias (*O. niloticus*) e em cascudos (*H.luetkeni*). Nas duas espécies de peixe, a menor concentração de α -NF (0,1 nM) não inibiu ECOD. A maior concentração de α -NF (1 nM), entretanto, causou uma discreta inibição de ECOD hepático nas duas espécies. Na maior concentração de substrato testada (3000 μ M), a maior concentração de α -NF (1 nM) reduziu, em cascudos e em tilápias, a atividade de ECOD a 83% da atividade dos controles (= 100%).

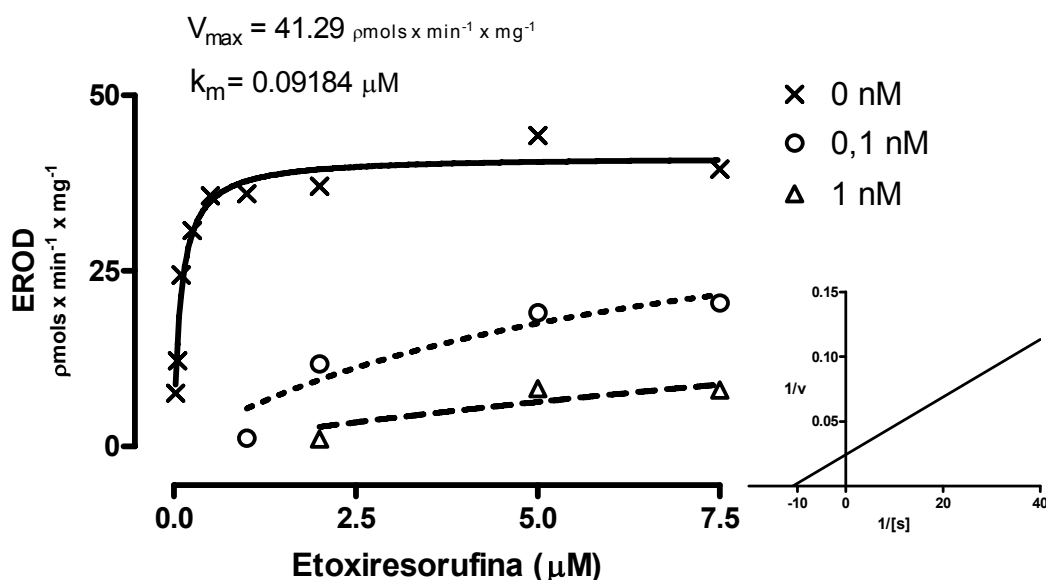


Figura 4.10) Gráfico de Michaelis-Menten da atividade da etoxiresorufina-O-desetilase (EROD) em microsossomos hepáticos de tilápia (*O. niloticus*) controle na ausência e na presença de α -NF (0,1 e 1 nM). Inserção: Gráfico de Lineweaver-Burk para a transformação linear da curva de Michaelis-Menten e cálculo de K_m e $V_{m\acute{a}x}$.

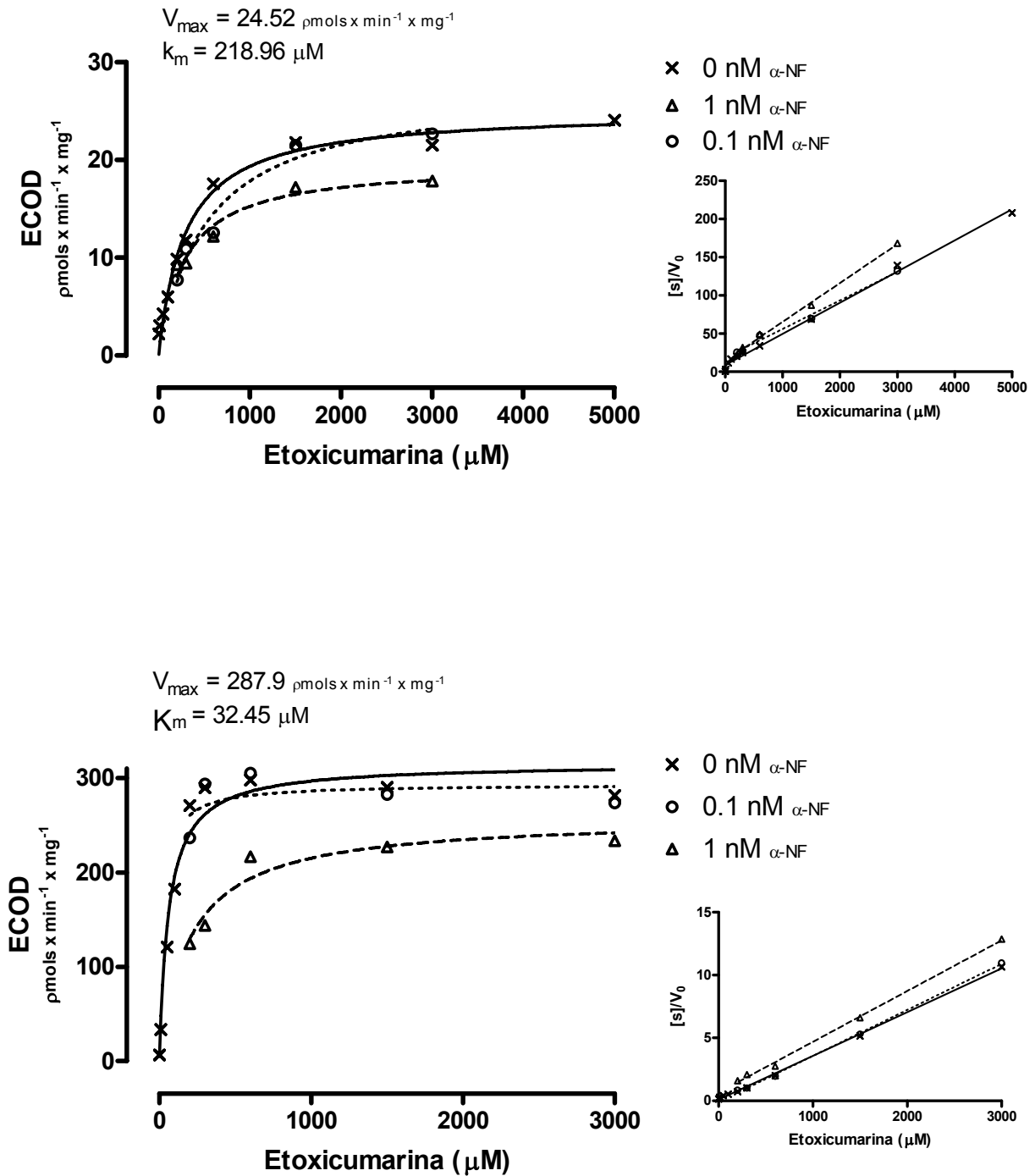


Figura 4.11) Gráfico de Michaelis-Menten da atividade da etoxicumarina-O-desetilase (ECOD) em microsossomos hepáticos de a) tilápia (*O. niloticus*) e b) cascudo (*H.luetkeni*) controles na ausência e na presença de α -NF (0,1 e 1 nM). Inserção: Gráfico de Hanes-Woolf para a transformação linear da curva de Michaelis-Menten e cálculo de K_m e $V_{m\acute{a}x}$.

4.5 Investigação da variação circadiana das atividades de monooxigenases em microsossomos hepáticos de cascudo (*H. affinis*)

Os cascudos possuem hábitos predominantemente vespertinos e noturnos. A maioria dos peixes usados nesse trabalho, no entanto, foi morta durante o dia. Para verificar se as atividades das monooxigenases hepáticas dos cascudos exibem flutuação circadiana, cinco (n=5) cascudos (*H. affinis*) foram mortos durante a noite, três dias após o tratamento com BNF (50 mg/kg ip). Os cascudos foram mortos entre 22:00 horas e 0 hora e 30 minutos do dia seguinte. As atividades dos cascudos mortos à noite foram comparadas com as atividades de cascudos submetidos ao mesmo tratamento (BNF, 50 mg/kg ip) e mortos durante o período diurno.

As atividades de XROD não foram detectadas nos microsossomos hepáticos tanto dos cascudos (*H. affinis*) mortos durante a noite quanto daqueles mortos durante o dia. A atividade de ECOD na fração microsossomal hepática não diferiu entre cascudos mortos durante a noite e cascudos mortos durante o dia. Nos peixes mortos à noite, entretanto, a dispersão das medidas individuais de ECOD em torno da média do grupo foi aparentemente menor (Figura 4.12).

Nesses experimentos usamos uma outra espécie de cascudo, o *Hypostomus affinis*. Os resultados com *H. affinis*, contudo, foram semelhantes aos obtidos com o *H. luetkeni*: em microsossomos hepáticos notamos ausência de atividade constitutiva e de indução das XROD, e alta atividade constitutiva de ECOD que não foi induzida pelo tratamento com BNF (50 mg/kg ip).

4.6 Atividade de alcoxi-resorufina-O-desalquilases (XROD) e da etoxicumarina-O-desetilase (ECOD) em tecidos extra-hepáticos de cascudo (*H. affinis*)

Nenhuma atividade das monooxigenases investigadas (XROD e ECOD) foi detectada em microsossomos de intestino, brânquia e coração de cascudos (*H. affinis*).

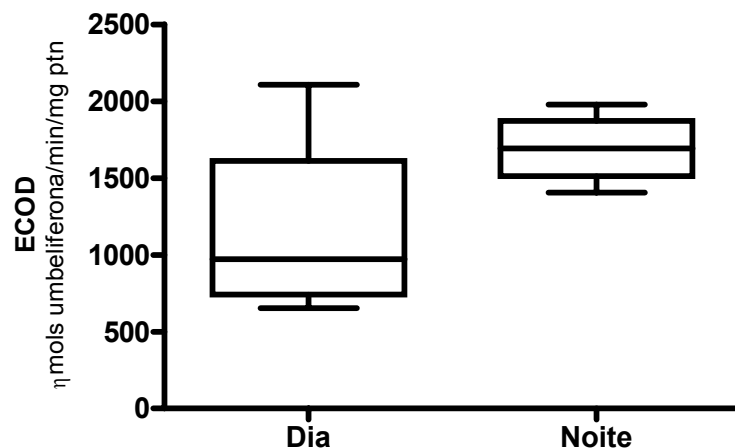


Figura 4.12) Atividade da etoxicumarina-O-desetilase (ECOD) em microossomos hepáticos de cascudos (*H. affinis*) tratados com BNF (50 mg/kg ip) e mortos durante o dia (n=5) ou durante a noite (n=4).

4.7 Immunoblotting

Após estudar as atividades de monooxigenases, procuramos identificar diretamente as proteínas do CYP1A na fração microsomal hepática de tilápias (*O. niloticus*) e cascudos (*H. luetkeni*) usando um anticorpo monoclonal e outro policlonal contra CYP1A de peixe. Nessa etapa, conseguimos também um anticorpo contra outro CYP de peixe, o CYP3A. Assim, procuramos identificar também o CYP3A nas espécies de peixes estudadas.

4.7.1 - Immunoblotting com anticorpo monoclonal anti-CYP1A (MAb 1-12-3)

O anticorpo monoclonal anti-CYP1A (MAb 1-12-3) foi produzido contra a proteína CYP1A de *Stenotomus chrysops*, um peixe marinho encontrado nos EUA. Esse anticorpo preparado pelo *Woods Hole Oceanographic Institution* foi gentilmente doado pelo Dr. John Stegeman. O MAb 1-12-3 tem sido amplamente utilizado para a detecção de CYP1A em diversas espécies de peixes e, também, em outros vertebrados. Entre os animais nos quais a proteína CYP1A foi detectada com auxílio deste anticorpo podemos citar o peixe cartilaginoso (*Squalus acanthias*), diversos peixes ósseos (*Anguilla anguilla*, *Cyprinus carpio*, *Gadus mordua*, *Oreochromis mossambicus*), a rã (*Rana catesbeiana*), répteis (*Alligator mississippiensis*), aves (*Gallus domesticus*) e mamíferos (*Delphinapterus leucas*, *Ursus maritimus*, *Mus musculus*, *Ratus ratus*, *Homo sapiens*) (Stegeman e Hahn, 1994). Por reagir com CYP1A de espécies evolutivamente tão distantes, acredita-se que esse anticorpo

reconheça uma região altamente conservada da proteína. Neste trabalho, usamos o anticorpo MAb 1-12-3 para a detecção de CYP1A em microsossomos hepáticos de camundongos, tilápias (*O. niloticus*) e cascudos (*H. luetkeni*). Além desses, usamos também uma amostra de microsossomo hepático de rato (Wistar, macho) não tratado e outra de rato da mesma linhagem e sexo tratado por três dias consecutivos com BNF (50 mg/kg/dia ip x 3).

Nas amostras de microsossomos hepáticos de camundongo e de rato Wistar, controles e tratados com BNF (50 mg/kg ip), detectamos claramente uma única banda imunoreativa (MAb 1-12-3, anti-CYP1A), com massa molecular de aproximadamente 50 kDa (Fig. 4.13). Na análise do *immunoblotting* desses microsossomos foi evidente a maior densidade das bandas imunoreativas correspondentes às amostras dos roedores tratados com BNF 50 mg/kg ip, o que é consistente com forte indução de CYP1A (Fig. 4.13).

Nos microsossomos hepáticos de tilápias tratadas com BNF (50 mg/kg ip) e com DMBA (50 mg/kg ip) também foi detectada uma forte banda imunoreativa (MAb 1-12-3, anti CYP1A) com massa molecular estimado em aproximadamente 50 kDa (Fig. 4.13, 4.17, 4.18, 4.19). Entretanto, nessas amostras de microsossomos hepáticos (principalmente das tilápias tratadas com DMBA), também foram detectadas bandas imunoreativas (MAb 1-12-3, anti-CYP1A) com outras massas moleculares (Fig. 4.13, 4.17). Em alguns ensaios, uma fraca banda imunoreativa de cerca de 50 kDa foi detectada nas amostras de tilápias controles (Fig. 4.14, 4.15). Em outros, no entanto, não foi detectada nenhuma banda imunoreativa com este anticorpo anti-CYP1A em microsossomos hepáticos de tilápias controles (Fig. 4.16). Esses resultados mostram que nas amostras de microsossomo hepático de tilápias existe pelo menos uma proteína de massa molecular estimado em 50 kDa que é reconhecida pelo anticorpo MAb 1-12-3. Além disso, é nítido que a densidade dessa banda é fortemente aumentada pelos tratamentos com BNF (50 mg/kg ip) e DMBA (50 mg/kg ip). Essas observações são consistentes com a forte indução de EROD e MROD em tilápias tratadas com os indutores de isoformas CYP1A, e sugerem a presença de CYP1A (induzível via ativação do receptor AhR) no fígado desse ciclídeo (*O. niloticus*).

Os resultados encontrados nas amostras de microsossomos hepáticos de cascudo (*H. luetkeni*) são de interpretação mais complexa.

Inicialmente, quando foi aplicado ao gel SDS-PAGE, quantidades idênticas de proteína microsossomal (20 µg) quer de cascudo, quer de tilápia, quer de camundongo, não detectamos nenhuma banda imunoreativa (MAb 1-12-3 anti

CYP1A) nas amostras do loricarídeo. Nas amostras das outras espécies (tilápia e camundongo), entretanto, apareceram bandas densamente marcadas pelo anticorpo (Fig. 4.17).

Porém, em duas outras membranas às quais foi adicionada a mesma quantidade de proteína microsomal (20 µg), foi possível identificar fracas bandas imunoreativas (anti CYP1A) com cerca de 50 kDa nos locais correspondentes à aplicação de microsomas de cascudo (Fig. 4.13, 4.14). Nessas últimas membranas, os microsomas tanto de cascudo quanto de tilápias tratadas com DMBA (Fig. 4.13, 4.14, 4.15) deram origem a bandas imunoreativas (antiCYP1A) adicionais correspondentes a proteínas de massa molecular mais baixo do que a massa esperada para o CYP1A.

Em experimentos subsequentes, aplicamos quantidades maiores de proteína microsomal hepática aos géis de SDS-PAGE. Nas membranas em que havíamos aplicado quantidade dez vezes maior de proteínas de cascudo (50 µg) do que de tilápias (5 µg), detectamos, no caso dos cascudos, apenas uma fraca banda imunoreativa (anti CYP1A) (Fig. 4.18, 4.19). Em algumas membranas com amostras de microsomas hepáticos de cascudo apareceu a mesma banda imunoreativa correspondente a proteínas com massa abaixo de 50 kDa (~42 kDa). Quando essa banda de ~42 kDa era detectada, ela era tão ou mais intensa do que a (fraca) banda de ~50 kDa. Como relação à banda imunoreativa (anti CYP1A) com ~50 kDa encontrada com a aplicação de microsomas hepáticos de cascudo, pode-se dizer que: i) a banda não apareceu de forma consistente em todas as membranas, ii) quando detectada, não o era em todas as amostras de cascudo presentes na mesma membrana, iii) quando a banda aparecia, ela era sempre muito fraca e iv) a intensidade dessa banda não aumentou nos microsomas de cascudos tratados com BNF e DMBA.

Tendo em vista essas inconsistências, torna-se difícil concluir que essa banda imunoreativa corresponda de fato a uma proteína similar ao CYP1A detectado nos microsomas hepáticos das outras espécies analisadas nesse trabalho. No entanto, também não se pode excluir a possibilidade de que haja quantidades constitutivas bem pequenas da proteína CYP1A em microsomas hepáticos de cascudo, níveis esses que não responderiam adequadamente à indução por ligantes do receptor Ah (DMBA e BNF). Em outras palavras, se essa marcação ocasional em microsomas de cascudo for de fato de uma proteína similar ao CYP1A: i) essa proteína similar ao CYP1A não é induzida pelos tratamentos com BNF e DMBA em fígado de cascudos,

ii) essa proteína é expressa em níveis constitutivos muito inferiores aos níveis que o CYP1A é expresso em ratos e camundongos (controles e tratados com ligantes do AhR) e tilápias tratadas e iii) existe uma outra proteína (ou um produto de proteólise) de massa molecular inferior, mas que é reconhecida por esse anticorpo anti-CYP1A.

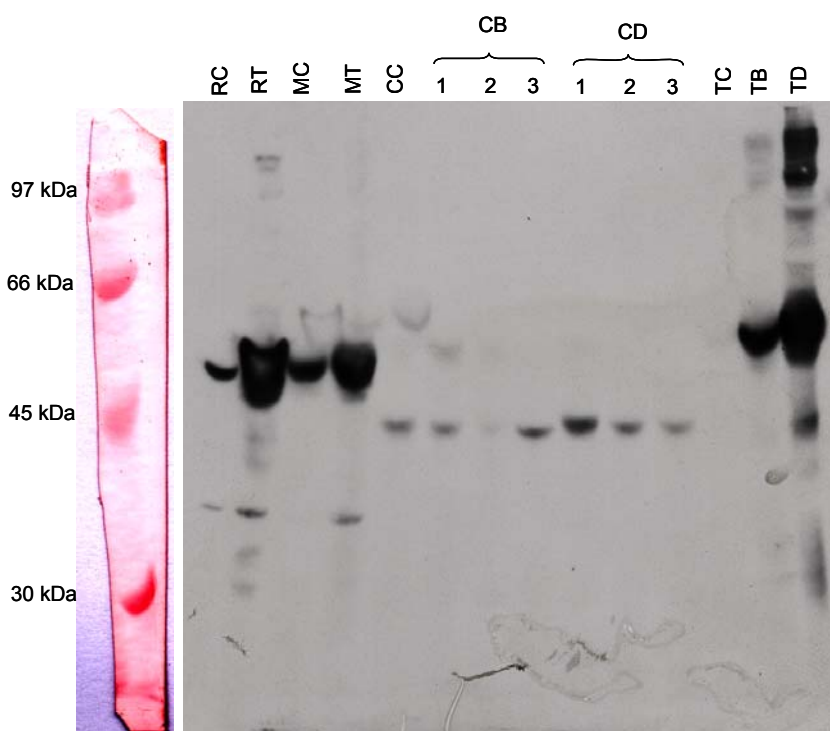


Figura 4.13) *Imunoblotting* de proteínas microsossomais de rato, camundongo, cascudo (*H. luetikenî*) e tilápia (*O. niloticus*) usando o anticorpo monoclonal (MAb 1-12-3) anti-CYP1A. Em todos os poços foram colocados 20 µg de proteína total. RC: rato controle; RT: rato tratado com BNF; MC: camundongo controle; MT: camundongo tratado com BNF; CC: *pool* dos cascudos do grupo controle; CB: *pool* dos cascudos do grupo tratado com BNF 50 mg/kg ip (mortos 1, 3 e 7 dias após o tratamento); CD: *pool* dos cascudos do grupo tratado com DMBA 50 mg/kg ip (mortos 1, 3 e 7 dias após o tratamento); TC: *pool* das tilápias do grupo controle; TB: *pool* das tilápias do grupo tratado com BNF 50 mg/kg ip (mortas 1, 3 e 7 dias após o tratamento); TD: *pool* das tilápias do grupo tratado com DMBA 50 mg/kg ip (mortas 1, 3 e 7 dias após o tratamento).

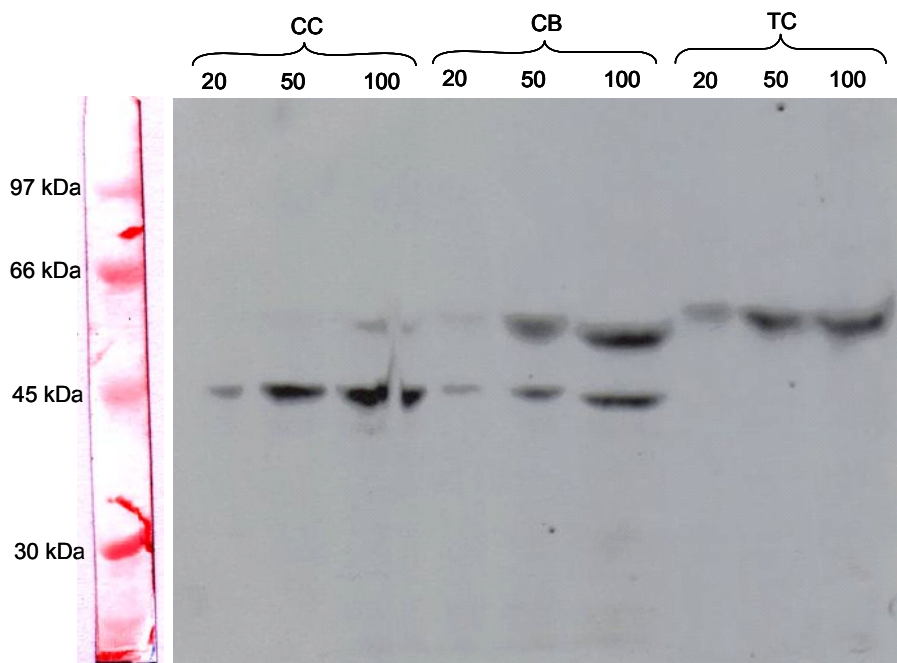


Figura 4.14) *Imunoblotting* de proteínas microsossomais de cascudo (*H. luetkeni*) e tilápia (*O. niloticus*) usando o anticorpo monoclonal (MAb 1-12-3) anti-CYP1A. CC: *pool* dos cascudos do grupo controle; CB: *pool* dos cascudos do grupo tratado com BNF 50 mg/kg ip (mortos três dias após a injeção); TC: *pool* das tilápias do grupo controle. Foram aplicadas ao gel três diferentes quantidades de proteína microsossomal (20, 50 ou 100 µg) para cada grupo como mostrado na figura.

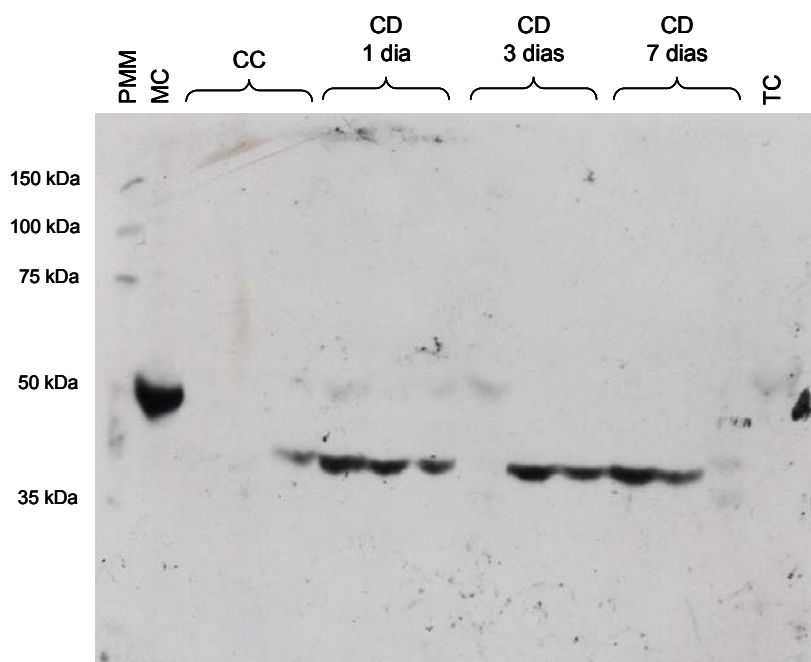


Figura 4.15) *Imunoblotting* de proteínas microsossomais de camundongo, cascudo (*H. luetkeni*) e tilápia (*O. niloticus*) usando o anticorpo monoclonal (MAb 1-12-3) anti-CYP1A. Em todos os poços foram colocados 40 µg de proteína. PMM: padrão de massa molecular; MC: camundongo controle; CC: cascudos do grupo controle; CD: cascudos do grupo tratado com DMBA 50 mg/kg ip (mortos 1, 3 e 7 dias após a injeção); TC: tilápia do grupo controle.

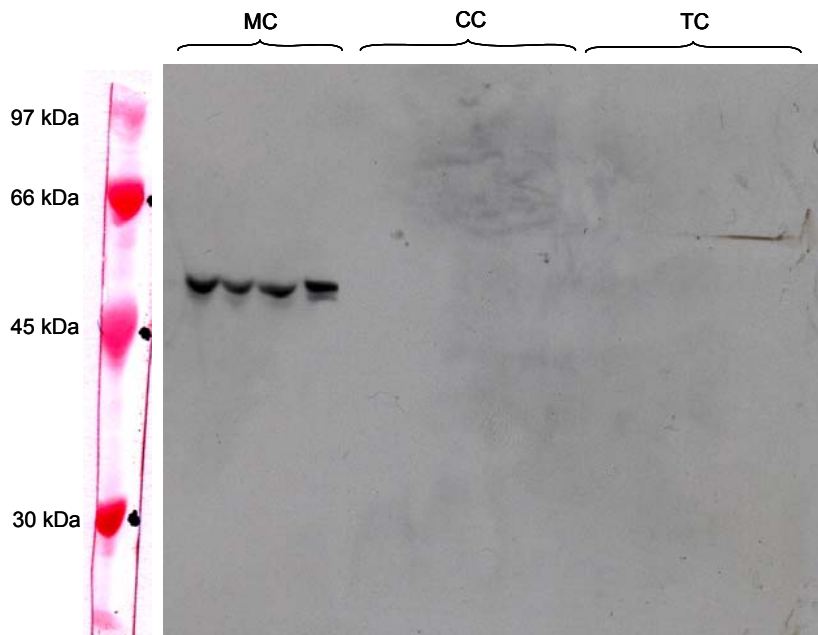


Figura 4.16) *Imunoblotting* de proteínas microsossomais de camundongo, cascudo (*H. luetkeni*) e tilápia (*O. niloticus*) controles usando o anticorpo monoclonal (MAb 1-12-3) anti-CYP1A. Em todos os poços foram colocados 50 μ g de proteína. MC: camundongo controle; CC: cascudos do grupo controle; TC: tilápia do grupo controle.

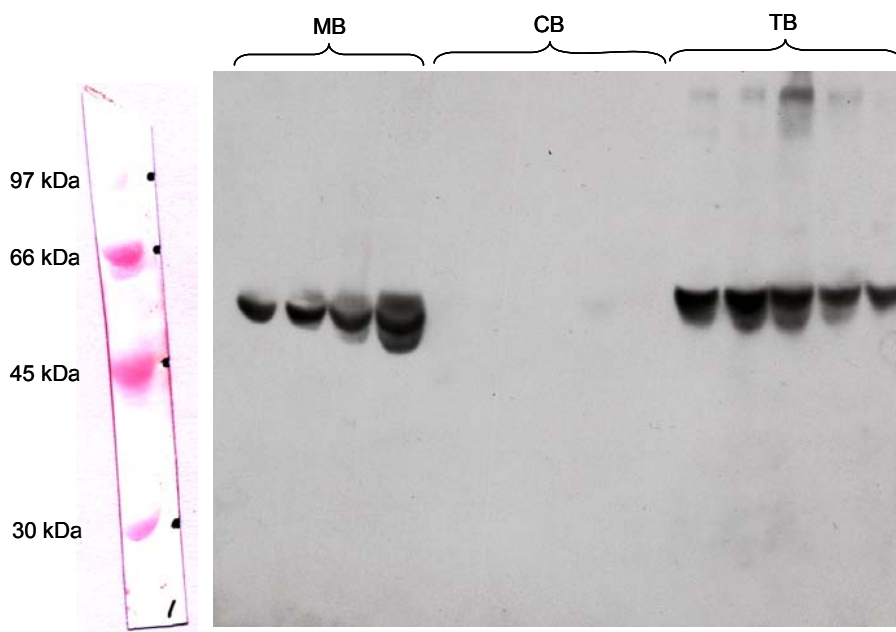


Figura 4.17) *Imunoblotting* de proteínas microsossomais de camundongo, cascudo (*H. luetkeni*) e tilápia (*O. niloticus*) controles usando o anticorpo monoclonal (MAb 1-12-3) anti-CYP1A. Em todos os poços foram colocados 20 μ g de proteína. MB: camundongo tratado com BNF (mortos 3 dias após a injeção); CB: cascudos do grupo tratado com BNF 50 mg/kg ip (mortos 3 dias após a injeção); TB: tilápias do grupo tratado com BNF 50 mg/kg ip (mortas 3 dias após a injeção).

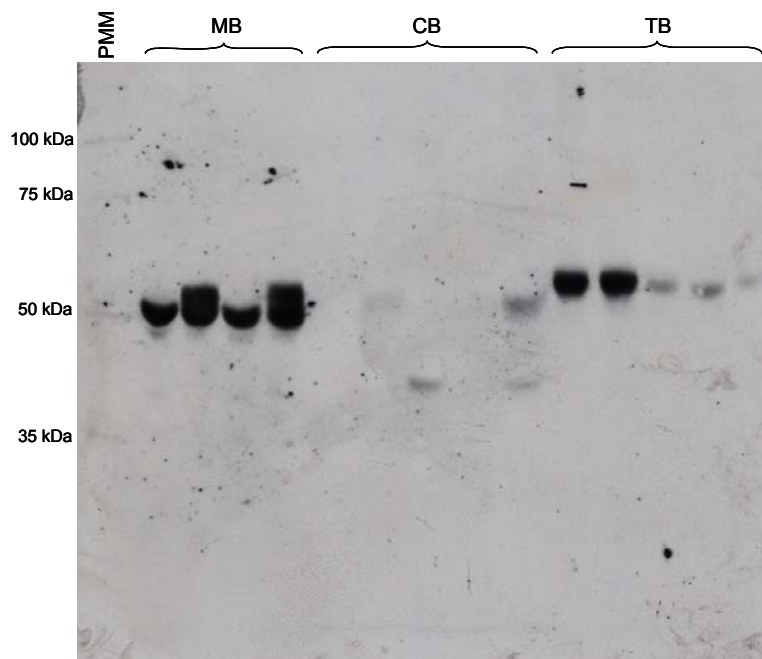


Figura 4.18) *Imunoblotting* de proteínas microssomais de camundongo, cascudo (*H. luetkeni*) e tilápia (*O. niloticus*) controles usando o anticorpo monoclonal (MAb 1-12-3) anti-CYP1A. MB: camundongo tratado com BNF 50 mg/kg ip (mortos 24 horas após a injeção); CB: cascudos do grupo tratado com BNF 50 mg/kg ip (mortos 24 horas após a injeção); TB: tilápias do grupo tratado com BNF 50 mg/kg ip (mortas 24 horas após a injeção). Foram aplicadas ao gel as seguintes quantidades de proteína microssomal: 10 μ g para as amostras de camundongo, 50 μ g para as amostras de cascudo e 5 μ g para as amostras de tilápias.

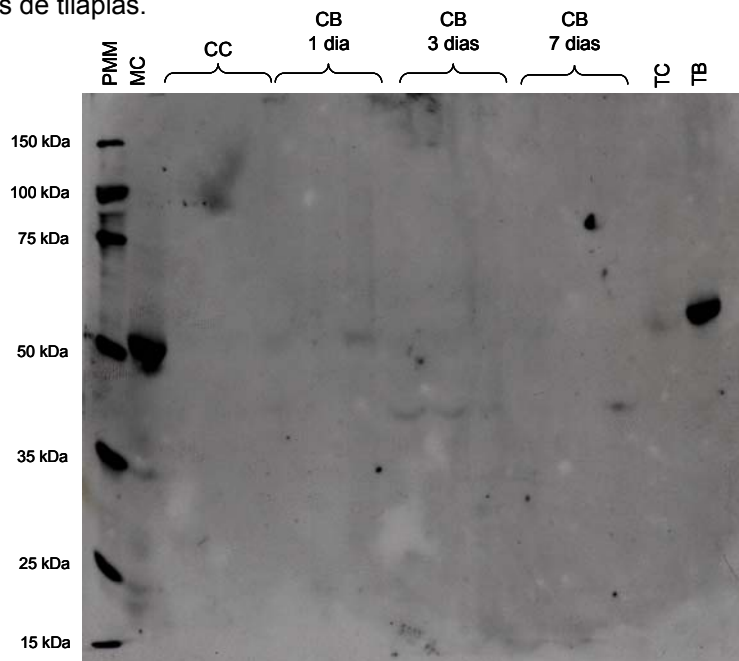


Figura 4.19) *Imunoblotting* de proteínas microssomais de camundongo, cascudo (*H. luetkeni*) e tilápia (*O. niloticus*) usando o anticorpo monoclonal (MAb 1-12-3) anti-CYP1A. Em todos os poços foram colocados 40 μ g de proteína (exceto TB = 10 μ g). PMM: padrão de massa molecular; MC: camundongo controle; CC: cascudos do grupo controle; CB: cascudos do grupo tratado com DMBA 50 mg/kg ip (mortos 1, 3 e 7 dias após a injeção); TC: tilápia do grupo controle; TB: tilápia do grupo tratado com BNF 50 mg/kg ip (morta 24 horas após a injeção).

4.7.2 - *Immunoblotting* com anticorpo policlonal anti-CYP1A (CP-226, Biosense®)

O anticorpo policlonal anti-CYP1A CP-226 (Biosense®) foi produzido contra os peptídeos 190-204 e 282-296 do CYP1A de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*). Esse anticorpo vem sendo bastante usado em pesquisas que envolvem a detecção de CYP1A em diversas espécies de peixes. De acordo com os fabricantes, esse anticorpo detecta o CYP1A nas seguintes espécies de peixes: *Oncorhynchus mykiss*, *Salmo salar*, *Gadus morhua*, *Cyprinus carpio*, *Platichthys flesus*, *Cyprinodon variegatus* e *Sparus aurata* (Fig. 4.20). No entanto, na maioria dessas espécies, o anticorpo CP-226 só é capaz de detectar o CYP1A após sua indução por BNF ou benzo-[a]-pireno (Fig. 4.20). Em algumas espécies, este anticorpo também detectou outras bandas imunoreativas (com massa moleculares diferentes) em microsomas hepáticos de animais tratados com indutores de CYP1A (Fig. 4.20).

Neste trabalho, o anticorpo policlonal anti-CYP1A CP-226 detectou uma única banda imunoreativa nas amostras de rato Wistar controle e tratado com BNF 50 mg/kg/dia ip por três dias (Fig. 4.21). A forte intensidade dessa banda é consistente com a indução de CYP1A causada pelo tratamento do rato com BNF (Fig. 4.21). Esse anticorpo não reagiu com nenhuma proteína microsomal de camundongos, quer nos controles não tratados, quer nos tratados com BNF 50 mg/kg ip (Fig. 4.21).

Com o anticorpo CP-226, não detectamos nenhuma banda imunoreativa em amostras de microsomas hepáticos de tilápias controles (Fig. 4.22). Todavia, o anticorpo CP-226 anti CYP1A reconheceu fortemente uma banda imunoreativa de aproximadamente 50 kDa nas amostras de microsomas hepáticos de tilápias tratadas com BNF (50 mg/kg ip) e DMBA (50 mg/kg ip) (Fig. 4.21). Nessas amostras, também foram detectadas bandas de proteínas com massas moleculares superiores a 50 kDa (Fig. 4.21). Em amostras de tilápia tratada com DMBA (50 mg/kg ip), o anticorpo CP-226 evidenciou também uma banda de ~40 kDa (Fig. 4.21).

Os resultados do *immunoblotting* com o anticorpo CP-226 anti CYP1A em amostras de microsomas hepáticos de cascudos também não são de fácil interpretação. Em uma membrana para qual foram transferidas amostras (20 µg proteína/poço) de cascudo controle (não tratado), cascudos tratados com BNF 50 mg/kg ip, camundongo controle, tilápia controle e tilápia tratada com BNF 50 mg/kg ip, apenas no caso da tilápia tratada com BNF foi detectada uma banda imunoreativa (~50 kDa) (Fig. 4.23). Em outra membrana, de gel em que foram aplicadas amostras de microsomas hepáticos de rato Wistar controle, rato Wistar tratado com BNF (50

mg/kg/dia ip x 3 dias), camundongo controle, camundongo tratado com BNF (50 mg/kg ip), cascudos controles, cascudos tratados com BNF (50 mg/kg ip), cascudos tratados com DMBA (50 mg/kg ip), tilápias controles e tilápias tratadas com BNF (50 mg/kg ip), tilápias tratadas com DMBA (50 mg/kg ip), fortes bandas imunoreativas com aproximadamente 50 kDa foram observadas nas amostras de rato e tilápias tratados com indutores de CYP1A, enquanto bandas menos intensas (~50 kDa) foram detectadas nas amostras de rato e cascudo controles e nas amostras de cascudos tratados com BNF e DMBA (nesse último caso apenas nos peixes mortos 24 horas após o tratamento) (Fig. 4.21). Ainda em relação a essa mesma membrana, nenhuma banda foi detectada nas amostras de tilápia controle e camundongos controle e tratado (Fig. 4.21). Em outra membrana, entretanto, fortes bandas foram detectadas nas amostras de cascudos controles e tratados com BNF 50 mg/kg ip, mas nenhuma banda foi detectada nas amostras de tilápias controles (Fig. 4.24). Em conjunto esses resultados sugerem que os cascudos possuem uma proteína similar a CYP1A capaz de se ligar ao anticorpo policlonal CP226. Contudo, a expressão dessa proteína parece não ser induzida pelos tratamentos com BNF e DMBA. O anticorpo CP-226 não reconheceu em microsossomos hepáticos de cascudos a banda de aproximadamente 42 kDa que havia sido detectada nessas mesmas preparações microsossomais hepáticas pelo anticorpo monoclonal.

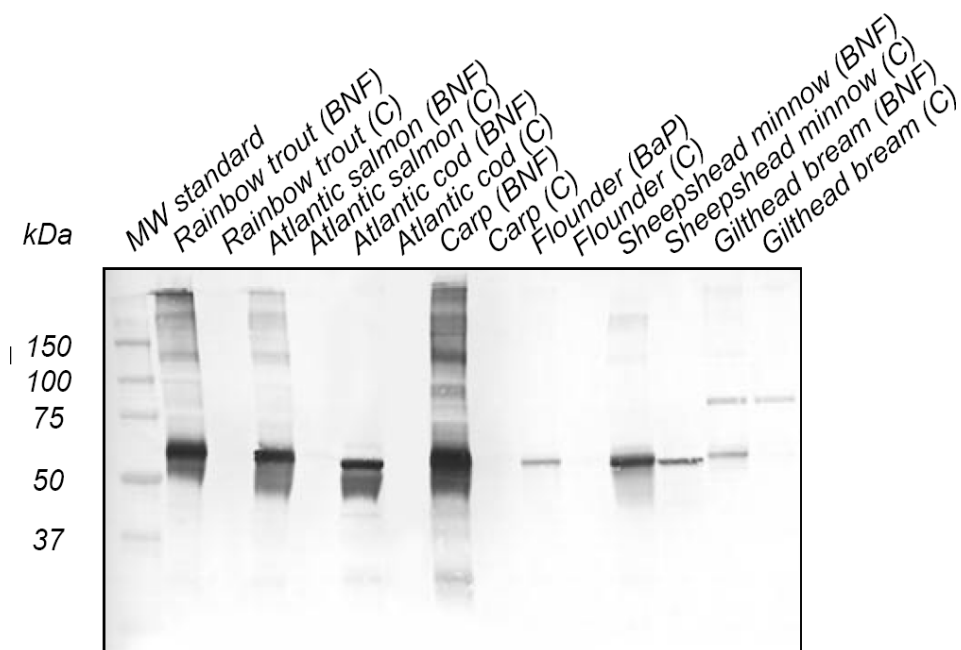


Figura 4.20) *Immunoblotting* usando o anticorpo policlonal anti-CYP1A (CP-226 Biosense®) mostrando algumas das espécies onde esse anticorpo foi usado para a detecção do CYP1A. Nota-se a presença de bandas inespecíficas e o não reconhecimento do CYP1A em peixes controles de diversas espécies. Fonte: Folha de informações sobre o produto (www.biosense.com).

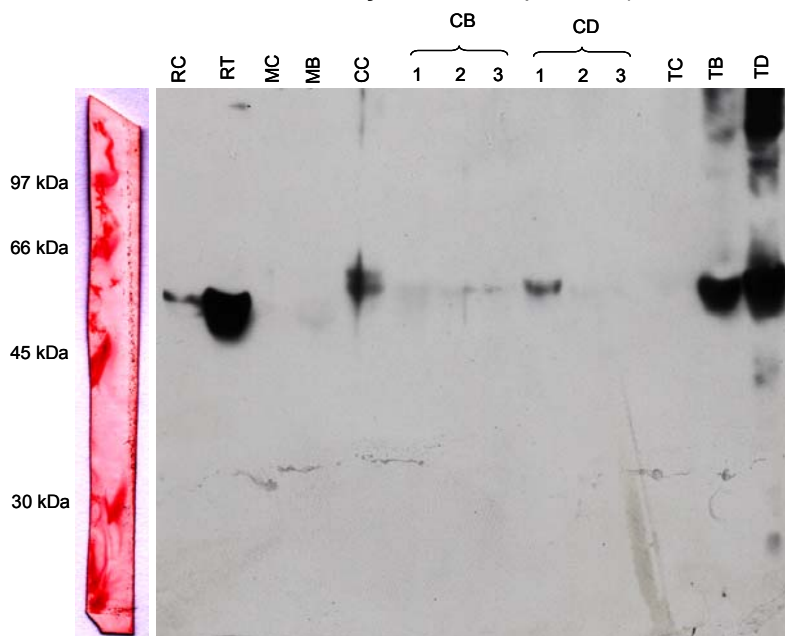


Figura 4.21) *Immunoblotting* de proteínas microsossomais de rato *Wistar*, camundongo, cascudo (*H. luetkeni*) e tilápia (*O. niloticus*) usando o anticorpo policlonal CP-226 anti-CYP1A. Em todos os poços foram colocados 20 μ g de proteína. RC: rato controle; RT: rato tratado com BNF (50 mg/kg/dia ip x 3 dias); MC: camundongo controle; MB: camundongo tratado com BNF (50 mg/kg ip); CC: *pool* dos cascudos do grupo controle; CB: *pool* dos cascudos do grupo tratado com BNF 50 mg/kg (mortos 1, 3 e 7 dias após a injeção); CD: *pool* dos cascudos do grupo tratado com DMBA 50 mg/kg ip (mortos 1, 3 e 7 dias após a injeção); TC: *pool* das tilápias do grupo controle; TB: *pool* das tilápias do grupo tratado com BNF 50 mg/kg ip (mortas 3 dias após a injeção); TD: *pool* das tilápias do grupo tratado com DMBA 50 mg/kg ip (mortas 3 dias após a injeção).

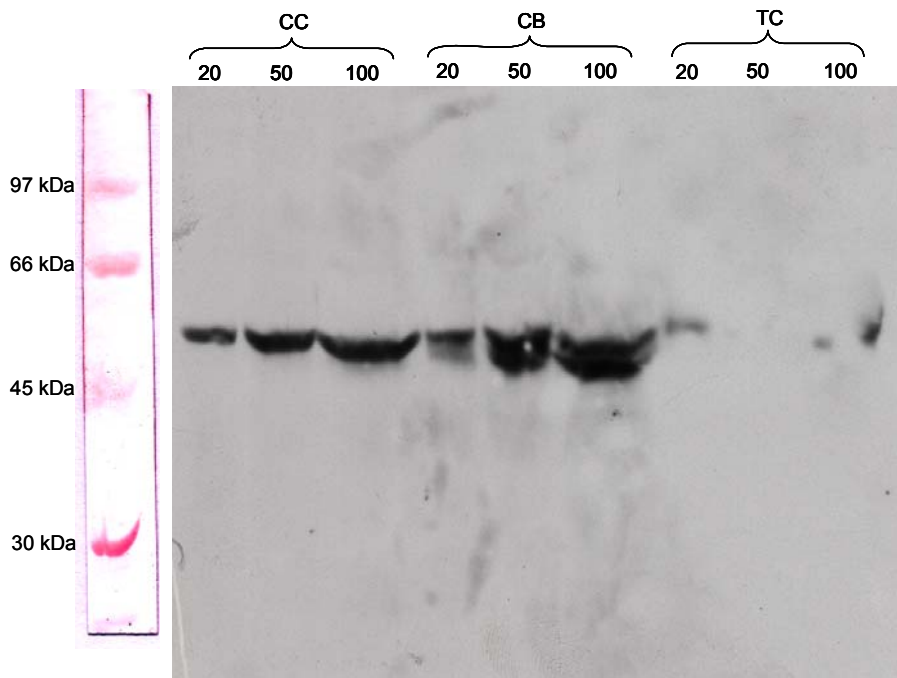


Figura 4.22) *Imunoblotting* de proteínas microssomais de cascudo (*H.luetkeni*) e tilápia (*O. niloticus*) usando o anticorpo policlonal CP-226 anti-CYP1A. CC: *pool* dos cascudos do grupo controle; CB: *pool* dos cascudos do grupo tratado com BNF 50 mg/kg ip (mortos três dias após a injeção); TC: *pool* das tilápias do grupo controle. Foram aplicadas ao gel três diferentes quantidades de proteína microssomal (20, 50 ou 100 µg) para cada grupo como mostrado na figura.

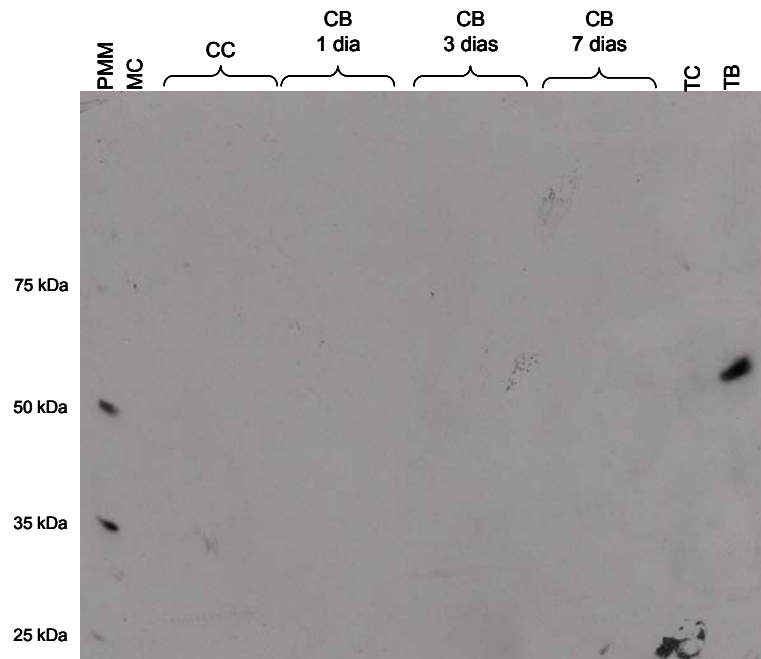


Figura 4.23) *Imunoblotting* de proteínas microssomais de camundongo *Swiss Webster*, cascudo (*H.luetkeni*) e tilápia (*O. niloticus*) usando o anticorpo policlonal CP-226 anti-CYP1A. Em todos os poços foram colocados 40 µg de proteína (exceto TB = 10 µg). PMM: padrão de massa molecular; MC: camundongo controle; CC: cascudos do grupo controle; CB: cascudos do grupo tratado com DMBA 50 mg/kg ip (mortos 1, 3 e 7 dias após a injeção); TC: tilápia do grupo controle; TB: tilápia do grupo tratado com BNF 50 mg/kg ip (morta 24 horas após a injeção).

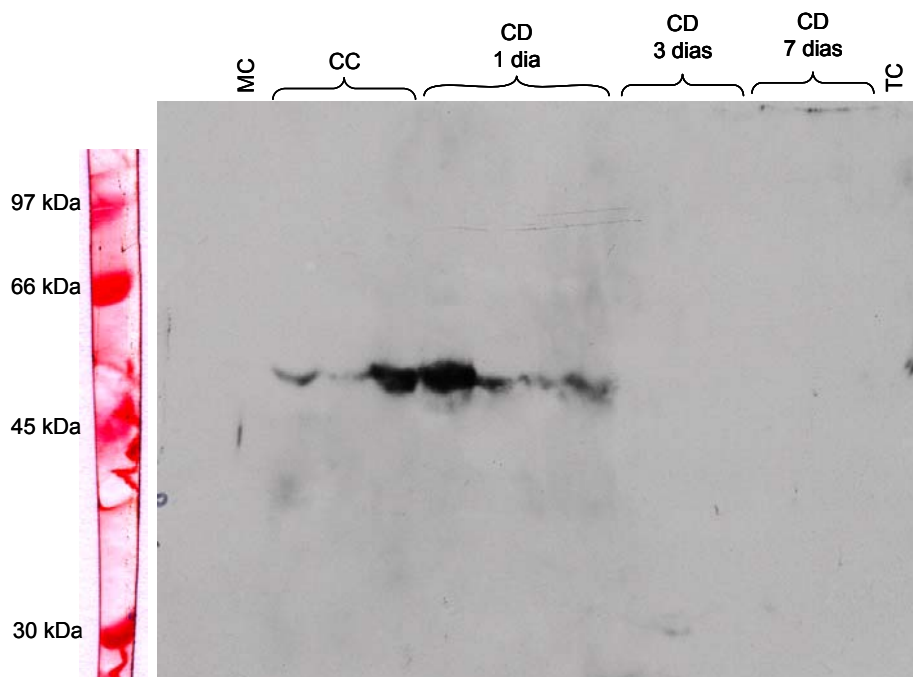


Figura 4.24) *Immunoblotting* de proteínas microsossomais de camundongo, cascudo (*H.luetkeni*) e tilápia (*O. niloticus*) usando o anticorpo policlonal CP-226 anti-CYP1A. Em todos os poços foram colocados 40 µg de proteína. MC: camundongo controle; CC: cascudos do grupo controle; CD: cascudos do grupo tratado com DMBA 50 mg/kg ip (mortos 1, 3 e 7 dias após a injeção); TC: tilápia do grupo controle.

4.7.3 - *Immunoblotting* com anticorpo policlonal anti-CYP3A

O anticorpo policlonal anti-CYP3A foi produzido contra a CYP3A da espécie *Oncorhynchus mykiss*. Esse anticorpo foi produzido e gentilmente doado pela Dra. Malin Celander da Universidade de Göteborg na Suécia. Segundo a Dra. Celander e a literatura, com esse anticorpo são evidenciadas duas bandas imunoreativas em microsossomo hepático de peixes (Celander, 1996; Celander et al., 2000; James et al., 2005).

Os resultados deste estudo mostram que esse anticorpo anti CYP3A também reconhece duas bandas imunoreativas na região da massa molecular esperada de CYPs (~50 kDa) em amostras de microsossomos hepáticos de ratos e camundongos controles (Fig. 4.25). A marcação encontrada na amostra de camundongo foi claramente mais forte do que a marcação na amostra de microsossoma hepático de rato Wistar.

O anticorpo anti-CYP3A também reconheceu duas bandas imunoreativas nas amostras de tilápia (*O. niloticus*) controle e tilápias tratadas com DMBA 50 mg/kg ip (Fig. 4.25, 4.26). Nos microsossomos hepáticos de cascudos, assim como nos microsossomos das outras espécies, foram detectadas duas bandas imunoreativas nas membranas reveladas com o anticorpo policlonal anti-CYP3A (Fig. 4.25, 4,26). As

bandas observadas em microsossomos de cascudos estão na mesma faixa de massa molecular das bandas detectadas nas outras espécies (~50 kDa). No contexto deste trabalho, a detecção de fortes bandas de aproximadamente 50 kDa com o anticorpo policlonal contra-CYP3A em cascudos indicou que as proteínas microsossomais desses peixes não sofreram processos proteolíticos significativos durante o preparo dos microsossomos.

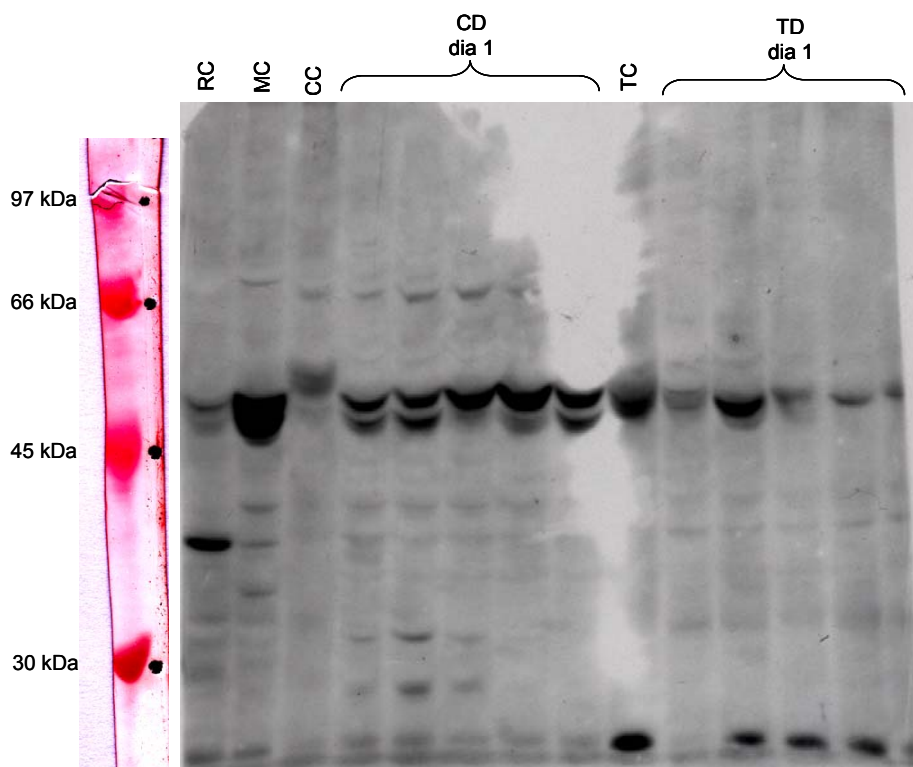


Figura 4.25) *Imunoblotting* de proteínas microsossomais de rato, camundongo, cascudo (*H. luetikeni*) e tilápia (*O. niloticus*) usando o anticorpo policlonal anti-CYP3A. Em todos os poços foram colocados 20 µg de proteína. RC: rato controle; MC: camundongo controle; CC: cascudos do grupo controle; CD: cascudos do grupo tratado com DMBA 50 mg/kg ip (mortas 24 horas após a injeção); TC: tilápia do grupo controle; TD: tilápias do grupo tratado com DMBA 50 mg/kg ip (mortas 24 horas após a injeção).

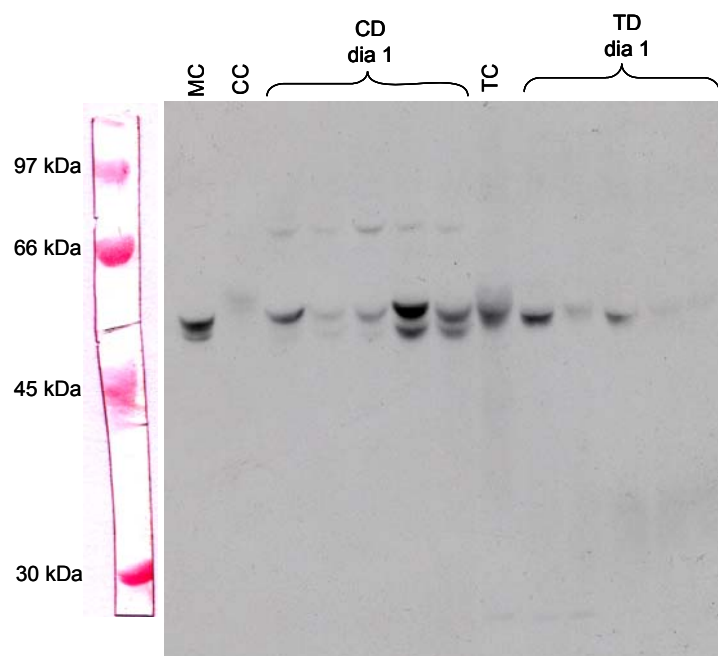


Figura 4.26) *Immunoblotting* de proteínas microsossomais de rato, camundongo, cascudo (*H. luetkeni*) e tilápia (*O. niloticus*) usando o anticorpo policlonal anti-CYP3A. Em todos os poços foram colocados 50 µg de proteína. MC: camundongo controle; CC: cascudos do grupo controle; CD: cascudos do grupo tratado com DMBA 50 mg/kg ip (mortos três dias depois da injeção); TC: tilápia do grupo controle; TD: tilápias do grupo tratado com DMBA 50 mg/kg ip (mortas três dias após a injeção).

4.8 Proteômica

Como os resultados de *immunoblotting* não forneceram resposta conclusiva quanto a presença ou ausência de níveis constitutivo de CYP1A em microsossomos hepáticos de cascudos, realizamos estudos com outros métodos (proteômica) com o objetivo de identificar proteínas CYP, especialmente da subfamília CYP1A, expressas no fígado de cascudos e tilápias. As proteínas microsossomais foram separadas de acordo com a massa molecular em géis SDS-PAGE convencionais e as bandas coradas com Coomassie foram cortadas e identificadas em espectrômetro de massa tipo MALDI-TOF/TOF. Com essa abordagem, não teríamos problemas no que se refere à solubilização dos CYP (proteínas de membrana), mas seria possível identificar apenas as proteínas mais abundantes de cada banda (é esperado que em uma banda haja várias proteínas).

A figura 4.27, mostra o gel SDS-PAGE corado com Coomassie R-250 de onde as bandas na faixa de 45 a 66 kDa foram retiradas para digestão trípica e identificação por MALDI-TOF/TOF. Na figura 4.27 é possível visualizar os padrões de bandas encontrados em camundongos, cascudos (*H. luetkeni*) e tilápias (*O. niloticus*). Percebe-se que o padrão de bandas na faixa de massa molecular onde são encontrados os CYP (45-66 kDa) é diferente entre as três espécies. Nessa faixa

de massa molecular, as amostras de camundongos apresentam maior número de bandas concentradas no terço inferior próximo ao padrão de massa molecular de 45 kDa. Nas amostras de tilápias, a maior concentração de bandas é no terço central localizado um pouco mais acima, e nas amostras de cascudo a região de maior concentração de bandas é mais difusa, ocupando os dois terços inferiores dessa região.

Na região entre 45-66 kDa foram cortadas 12 ou 13 fatias, tentando-se ao máximo separar cada banda. Em tilápias, foram identificadas 18 proteínas e quatro produtos protéicos sem nome (Tabela 4.5). Entre as proteínas identificadas, seis são envolvidas na biotransformação de xenobióticos: álcool desidrogenase, CYP1A, uma glicosil-transferase, uma aldolase, monoamino oxidase e a NADPH citocromo P450 redutase. Destaca-se que o CYP1A foi identificado nas amostras de tilápias tratadas com BNF (50 mg/kg ip) e com DMBA (50 mg/kg ip), mas não na amostra de tilápia controle. Da mesma forma, o NADPH citocromo P450 redutase só foi identificado na amostra de tilápia tratada com DMBA 50 mg/kg ip. Esses resultados são exemplos de que por esse método somente é possível identificar as proteínas mais abundantes em cada banda.

Nos cascudos, foram identificadas 11 proteínas, duas proteínas hipotéticas e mais dois produtos protéicos sem nome (Tabela 4.5). Dessas proteínas, apenas a aldeído desidrogenase tem papel importante na biotransformação de xenobióticos. Nenhum CYP, inclusive o CYP1A, foi identificado por gel unidimensional em qualquer amostra de microsomas hepáticos de cascudo. Como já mencionado, uma grande limitação desse método é sua incapacidade de identificar proteínas pouco expressas. Dessa forma, esses resultados não permitem uma conclusão definitiva quanto a presença ou ausência do CYP1A em fígado de cascudos. Contudo, esses resultados podem ser considerados como uma evidência adicional de que os tratamentos com BNF (50 mg/kg ip) e DMBA (50 mg/kg ip) não foram capazes de induzir a expressão do CYP1A em fígado de cascudos – como ocorreu com as tilápias. A tabela 4.5 mostra as proteínas identificadas em cada fatia de cada amostra. A tabela completa, com as seqüências dos peptídeos usados na identificação, as pontuações (*score*) obtidas e o número de acesso no NCBI, pode ser vista no anexo 1. Alguns dos espectros de MS (*fingerprinting*) e MS/MS podem ser vistos na Figura 4.28.

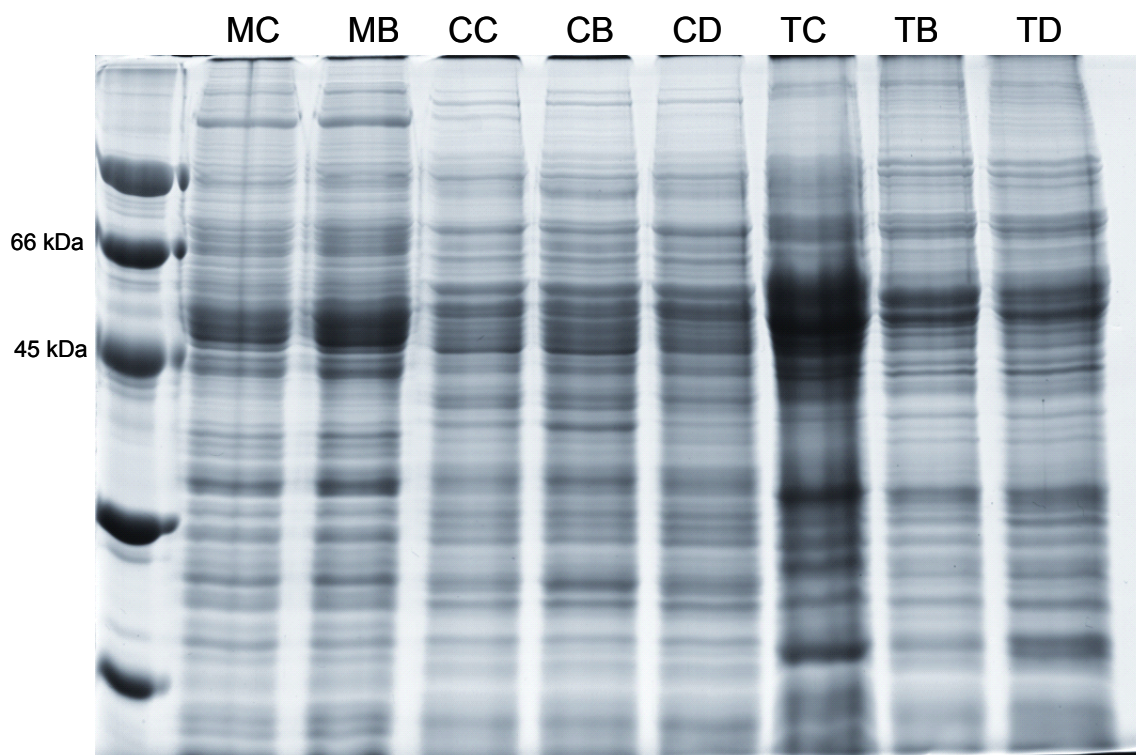


Figura 4.27) Gel de poliacrilamida 10% corado com Coomassie R-250. As bandas localizadas na região entre 45-66 kDa foram cortadas para identificação. MC: camundongo controle, MB: camundongo tratado com BNF, CC: cascudo controle, CB: cascudo tratado com BNF, CD: cascudo tratado com DMBA, TC: tilápia controle, TB: tilápia tratada com BNF e TD: tilápia tratada com DMBA.

Tabela 4.5) Proteínas identificadas por MALDI-TOF/TOF em cada banda cortada de gel 1D de acordo com as amostras de cascudos e tilápias.

	CC	CB	CD	TC	TB	TD
1	Proteína regulada por glicose 78 kDa (GRP78) Proteína de choque térmico 70 kDa (HSP70)	Transferrina Proteína de choque térmico 70 kDa (HSP70)	Proteína regulada por glicose 78 kDa (GRP78) Proteína de choque térmico 70 kDa (HSP70)	Proteína regulada por glicose 78 kDa (GRP78)	Proteína regulada por glicose 78 kDa (GRP78)	Proteína regulada por glicose 78 kDa (GRP78) Proteína de choque térmico 71 kDa (HSP71) NADPH citocromo P450 redutase
2	-	-	-	-	Proteína de choque térmico 71 kDa (HSP71)	-
3	-	-	-	Riboforina I Fosfoenolpiruvato carboxilase	Riboforina I	Riboforina I Fosfoenolpiruvato carboxilase
4	-	-	-	Monoamino oxidase	gi 47227494	gi 47227494
5	Disulfito isomerase	Disulfito isomerase	Disulfito isomerase Fosfolipase C-alfa gi 47223959	Monoamino oxidase Amilase 3	Monoamino oxidase Amilase 3	Monoamino oxidase
6	Calreticulina	Calreticulina	Calreticulina	Calreticulina Glutamato desidrogenase ATP sintase	Calreticulina CYP1A ATP sintase	Calreticulina CYP1A
7	ATP sintase	ATP sintase Proteína hipotética LOC393668	ATP sintase	gi 47220325	gi 47220325	gi 47220325
8	-	-	-	ATP sintase	gi 47221059 Dodecil-difosfofosfooligosacarídeo glicosiltransferase	gi 47221059 Riboforina I
9	-	Proteína hipotética LOC100038785	-	beta-actina Proteína ribissomal L3	-	Monoamino oxidase
10	beta-actina	-	beta-actina	gi 47221059 beta-actina beta-actina Álcool desidrogenase Alanina aminotransferase	gi 47221059 beta-actina	beta-actina Proteína ribissomal L4
11	beta-actina	beta-actina	beta-actina	Frutose-bifosfato aldolase B Proteína ribissomal L4	Proteína ribissomal L4	gi 47214598
12	-	gi 47214598	Aldolase B	Frutose-bifosfato aldolase B	Frutose-bifosfato aldolase B Álcool desidrogenase gi 47214598	Frutose-bifosfato aldolase B
13	-	Gliceraldeído fosfato desidrogenase	-	-	-	-

4700 Reflector Spec #1 MC=>BC[BP = 1809.8, 25443]

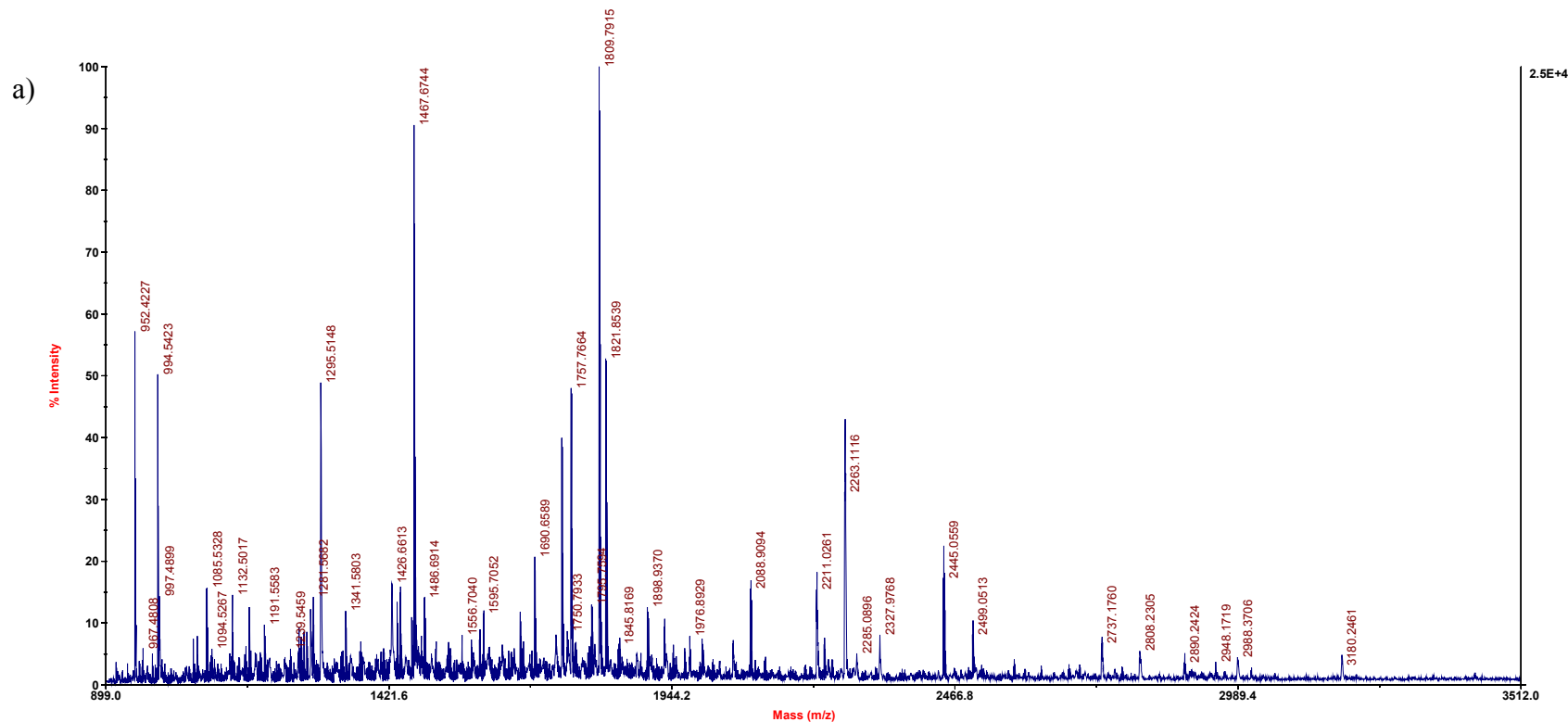
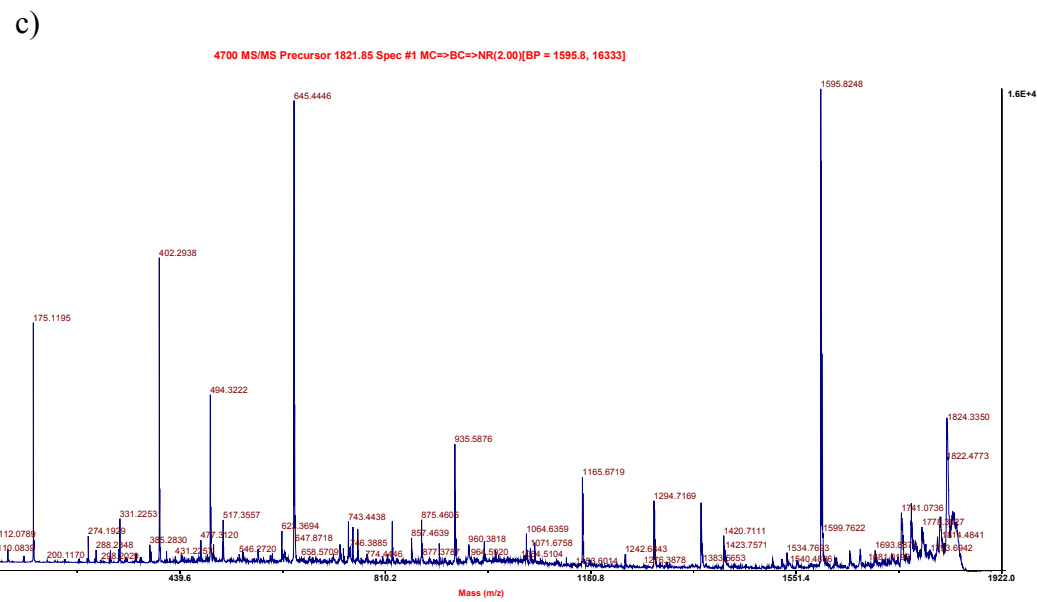
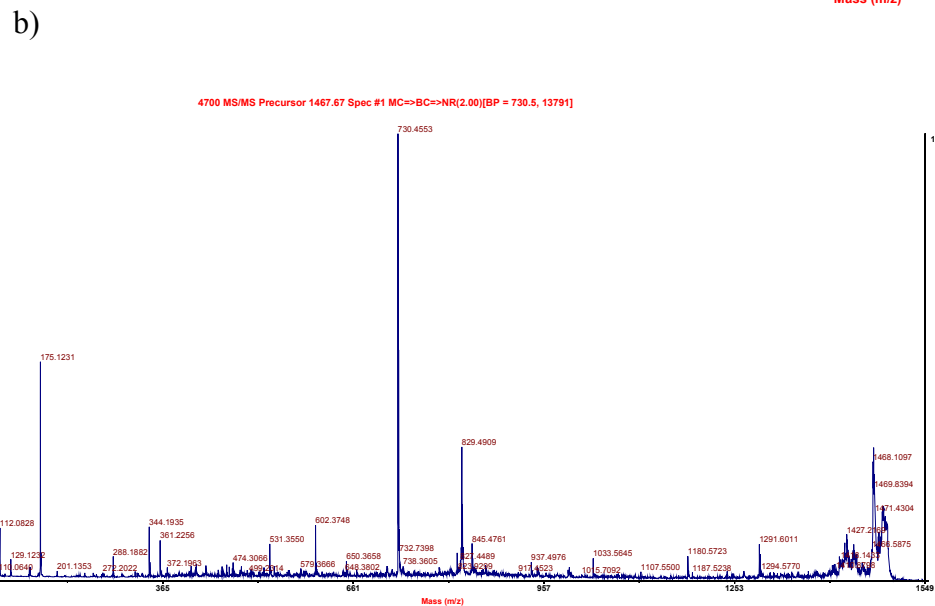


Figura 4.28: Espectros de massas dos fragmentos tripticos do CYP1A identificado em tilápias. a) espectro MS (fingerprinting); b) espectro MS/MS que identificou a seqüência SLSFSTDQAGIWR; e c) espectro MS/MS que identificou a seqüência LVTEHYATFDKNI



5. DISCUSSÃO

Em conjunto, os resultados apresentados neste trabalho mostraram que cascudos das duas espécies analisadas (*H.luetkeni* e *H.affinis*) diferem das tilápias do Nilo (*O.niloticus*) e, possivelmente, da maioria dos peixes até agora estudados, quanto à capacidade de metabolizar *in vitro* alguns substratos de enzimas do citocromo P450. Em contraste com o observado com tilápias e camundongos neste estudo e com o relatado na literatura para outros vertebrados (Stegeman e Livingstone, 1998), os microsossomos hepáticos de cascudos não foram capazes de catalisar a desalquilação de vários ésteres da resorufina, incluindo a desetilação da etoxiresorufina, um substrato típico da CYP1A (Whitlock, 1999). Além disso, os cascudos não responderam com a esperada indução da atividade de monooxigenases hepáticas (e.g. EROD/MROD), aos tratamentos com BNF e DMBA, conhecidos indutores de CYP1A (Weimer *et al.*, 2000; Weber e Janz, 2001; Parente *et al.*, 2008). No fígado dos cascudos examinados, no entanto, encontramos atividade da etoxicumarina-O-desetilase (ECOD) bem mais elevada do que a registrada nas tilápias e camundongos. O fato de não termos detectado atividade catalítica de CYP1A no fígado de cascudos contrasta com a observação de que os cascudos respondem com um claro aumento de danos cromossômicos (incidência de eritrócitos micronucleados) à exposição ao clastógeno DMBA que, em outras espécies de vertebrados, requer ativação por isoformas CYP1A (Weimer *et al.*, 2000). Foi possível ainda constatar a expressão das proteínas das subfamílias CYP1A e 3A no fígado de tilápias. No fígado dos cascudos examinados, também foi possível evidenciar a expressão de CYP3A e a presença de proteínas reconhecidas por anticorpos anti-CYP1A não pode ser descartada.

5.1 Proteínas CYP1A são ou não são expressas no fígado de cascudos?

Como comentado na Introdução deste trabalho, as proteínas da subfamília CYP1A são altamente conservadas durante a evolução dos vertebrados (Hahn *et al.*, 1998). Tal conservação indica a existência de uma forte pressão seletiva para a manutenção dessa enzima (Hahn *et al.*, 1998), o que, por sua vez, sugere que as enzimas CYP1A sejam fundamentais para os vertebrados. O CYP1A, no entanto, não tem nenhuma função endógena conhecida. A função atribuída a essa proteína

estaria relacionada ao seu importante papel no metabolismo de xenobióticos e, portanto, nas interações entre os organismos e o ambiente. Embora fundamental para eliminação de vários xenobióticos (desintoxicação), o CYP1A por outro lado é também uma das principais enzimas responsáveis pela ativação metabólica de pré-mutágenos e pré-carcinógenos. Assim, isoformas CYP1A são importantes para a desintoxicação de muitos xenobióticos, mas também são determinantes da toxicidade de vários poluentes ambientais (Stegeman e Livingstone, 1998).

Em estudos anteriores (Santos, 2004), verificamos que a atividade de EROD, marcadora de CYP1A, era muito baixa ou estava praticamente ausente no fígado de cascudos (*Hypostomus spp*) coletados em rios muito impactados pela ação humana (e.g. bacia do rio Paraíba do Sul). Essa observação inesperada nos motivou a investigar as enzimas hepáticas de biotransformação de xenobióticos desses loricarídeos, com ênfase nas isoformas da subfamília CYP1A.

Como muitos dos genes de resposta a fatores ambientais, o *CYP1A* é expresso em níveis basais (constitutivos) em situações normais (Whitlock, 1999). Essa expressão, entretanto, é induzida em resposta à exposição a xenobióticos ligantes do receptor Ah, como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAH) e hidrocarbonetos aromáticos poli-halogenados (pHAH) (Schmidt e Bradfield, 1996). Em diversas espécies, a expressão basal (constitutiva) do CYP1A é tão baixa que não é possível detectá-la empregando métodos convencionais de medida da atividade enzimática ou de identificação da proteína com o uso de anticorpos (Figura 4.21) (Ertl *et al.*, 1999; Schlezinger e Stegeman, 2000; Verbrugge *et al.*, 2001; Bastos *et al.*, 2004; Matsuo *et al.*, 2006). Nesses casos, o CYP1A só costuma ser detectado após a indução da transcrição gênica por ligantes do receptor Ah. Assim, inicialmente supomos que a não detecção de EROD nos cascudos coletados nos rios resultasse da baixa expressão basal (constitutiva) do CYP1A nesses peixes. Para esclarecer essa questão, os cascudos foram coletados, mantidos em cativeiro e tratados com uma dose suficientemente alta de conhecidos indutores de CYP1A (BNF ou DMBA, 50 mg/kg ip). Como relatamos nos resultados, após os tratamentos com os indutores de CYP1A, a atividade de EROD permaneceu muito baixa, ou não detectada, no fígado dos cascudos. Esses mesmos tratamentos, que foram ineficazes em cascudos, induziram fortemente a atividade de EROD no fígado de tilápias e camundongos (figura 4.1). Esses resultados indicaram que a atividade de EROD é muito baixa ou não detectável na fração microsomal hepática de cascudos (*H. luetkeni* e *H. affinis*). Como EROD é um conhecido marcador da atividade

catalítica do CYP1A em vários tecidos e espécies de vertebrados, esses resultados nos levaram a formular algumas hipóteses para explicá-los.

Os loricarídeos (cascudos) têm hábitos bentônicos e são, em vários outros aspectos, bastante diferentes dos ciclídeos (tilápia) e da maioria dos peixes de regiões temperadas que têm sido mais estudados quanto ao metabolismo de xenobióticos. Levando em conta estas marcantes diferenças de hábitos, a primeira hipótese que levantamos para a não detecção das atividades de EROD foi que as condições de realização do ensaio (padronizadas para ciclídeos) não seriam as condições ótimas para evidenciar a atividade das enzimas de cascudos. Assim sendo, determinamos as atividades de EROD (e também de MROD, PROD e BROD) em ensaios em que variamos parâmetros críticos para a cinética enzimática, tais como pH, temperatura e concentração de proteína microsomal. Como mostramos na seção de resultados, as atividades das alcoxi-resorufina-O-desalquilases (XROD) permaneceram muito baixas ou não detectadas nos microsomos hepáticos de cascudos em todas as condições de ensaio testadas (Figuras 4.6, 4.7, 4.8 e 4.9). Outra evidência que nos levou a desconsiderar esta primeira hipótese foi o fato de termos posteriormente encontrado alta atividade de uma outra reação de monooxigenação, a etoxicumarina-O-desetilase (ECOD), nos microsomos hepáticos de cascudos. Determinada em condições semelhantes às de XROD, a atividade de ECOD em cascudos foi superior à encontrada em tilápias.

A segunda hipótese formulada seria a de que a proteína CYP1A expressa no fígado de cascudos teria sofrido alguma alteração e perdido a afinidade pela etoxiresorufina (embora eventualmente mantendo a afinidade por outros substratos). A terceira hipótese, que se contrapõe à segunda, seria a de que a proteína CYP1A não é expressa no fígado e, eventualmente, em outros tecidos dos cascudos. Em virtude da já mencionada alta conservação dessa proteína ao longo da evolução dos vertebrados, a segunda hipótese nos pareceu inicialmente mais provável.

Assim sendo, investigamos se cascudos, controles e tratados com indutores de CYP1A, eram capazes de catalisar outras reações de desalquilação de xenobióticos que se sabem serem mediadas por CYP. A desmetilação da metoxiresorufina (MROD), outra atividade mediada por enzimas da subfamília CYP1A, também não foi detectada em microsomo hepático de cascudos. Nas tilápias e nos camundongos, entretanto, MROD foi detectada nos animais controles e induzida pelos tratamentos com BNF e DMBA (Figura 4.2). As reações de desalquilação de outros ésteres da resorufina, como a pentoxi- (PROD) e a

benziloxiresorufina (BROD) foram detectadas em microsossomos hepáticos de cascudos, mas em níveis muito baixos, e não foram induzidas pelos tratamentos com BNF e DMBA. Apesar de PROD e BROD serem considerados marcadores da atividade catalítica da subfamília CYP2B em roedores e em outros mamíferos, nas tilápias e camundongos tratados com indutores de CYP1A (ligantes do receptor Ah), notamos uma indução dessas duas reações de monooxigenação (Figuras 4.3 e 4.4) (Pretti *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2008).

Como os microsossomos hepáticos de cascudo não tinham exibido nenhuma das atividades de desalquilação de ésteres da resorufina (EROD, MROD, PROD e BROD), decidimos investigar se eles apresentariam a atividade de desetilação da etoxicumarina (ECOD). Nos roedores, ECOD tem mostrado ser catalisada de forma relativamente inespecífica por diversas isoformas de CYP (*e.g.* CYP1A1, 1A2, 2A2, 2B1, 2C11, 2C13, 2E1, 3A2) (Funae e Imaoka, 1993). Surpreendentemente, observamos que nos microsossomos hepáticos dos cascudos a atividade de ECOD é similar à registrada nos camundongos e cerca de cinco vezes maior do que a encontrada nas tilápias (figura 4.5). A detecção de alta atividade de ECOD nos cascudos demonstrou que o sistema citocromo P450 nessa espécie é funcional e que a não detecção das atividades de desalquilação dos ésteres de resorufina (XROD) não era devida a degradação dos citocromos ou a falhas inadvertidas durante o preparo das amostras. Como comentamos, em roedores ECOD é uma reação aparentemente mediada por várias isoformas de diferentes famílias. A(s) isoforma(s) responsável(eis) pela catálise da desetilação da etoxicumarina em peixes ainda não foi(ram) identificada(s). O CYP1A tem participação marcante na catálise de ECOD em roedores e poderia ser o principal responsável por essa reação em peixes que expressam a isoforma. Nos cascudos e nas tilápias, todavia, os tratamentos com indutores de CYP1A não aumentaram a atividade de ECOD. Além disso, a adição de α -NF, um conhecido inibidor do CYP1A, não inibiu a reação de ECOD *in vitro*. Como esperado, a presença de α -NF inibiu fortemente a atividade de EROD em microsossomos hepáticos de tilápias controles. As mesmas concentrações de α -NF que inibiram acentuadamente EROD em microsossomos hepáticos de tilápia, provocaram apenas uma discreta diminuição de ECOD tanto em microsossomos de cascudos quanto de tilápias (figura 4.10 e 4.11). Esses resultados sugerem que o CYP1A não tem participação marcante na catálise de ECOD no fígado de cascudos e de tilápias.

Em síntese, os resultados deste estudo não identificaram atividade catalítica de CYP1A no fígado de cascudos, tanto em termos de atividade constitutiva quanto de atividade induzida. Até onde sabemos, esse é o primeiro relato de um peixe teleosteo que não apresenta atividade de EROD no fígado, ausência essa notada mesmo após o tratamento com ligantes do receptor Ah. Uma cuidadosa revisão da literatura encontrou apenas um caso similar, descrito em peixes agnatas (lampreias e peixes-bruxa) que tiveram origem no início da evolução dos vertebrados (Hahn *et al.*, 1998).

Em virtude dos resultados obtidos com as determinações das atividades catalíticas de CYP, decidimos procurar evidenciar diretamente a apoproteína do CYP1A, empregando *immunoblotting* e anticorpos anti-CYP1A de peixe. Nesses experimentos, empregando um anticorpo monoclonal anti-CYP1A de *Stenotomus chrysops* (“scup”), detectamos regularmente intensas bandas imunoreativas correspondentes ao CYP1A nas amostras de microsomas hepáticos de tilápias tratadas com indutores de CYP1A e camundongos controles e tratados com indutores (Figuras 4.13, 4.15, 4.17, 4.18 e 4.19). Nas amostras de microsomas hepáticos de tilápias controles e de cascudos controles e tratados com indutores de CYP1A, a banda imunoreativa (~50kDa) que corresponderia ao CYP1A, não foi detectada de forma consistente (Figuras 4.13, 4.15, 4.16, 4.17, 4.18 e 4.19). No entanto, esta banda imunoreativa foi detectada nessas amostras quando maximizamos a sensibilidade, *i.e.*, aumentamos a quantidade de proteína aplicada ao gel e o tempo de exposição do filme (Figura 4.14). Nessas condições, em algumas amostras de cascudo e na de tilápia tratada com DMBA, uma outra banda imunoreativa, de massa molecular inferior (~42 kDa), foi detectada. Com o emprego de um outro anticorpo, o anticorpo policlonal CP-226, obtivemos resultados similares. Fortes bandas imunoreativas (~50kDa) foram observadas nas amostras de microsomas hepáticos de tilápias tratadas com indutores de CYP1A (Figura 4.21, 4.23). O anticorpo policlonal não reconheceu nenhuma proteína nas amostras de camundongo (figura 4.21). Fracas bandas foram observadas nas amostras de tilápia controle e nas de cascudos controles e tratados com indutores (Figura 4.21). Apenas quando aumentamos a quantidade de proteína aplicada ao gel e o tempo de exposição do filme, foi possível evidenciar uma banda imunoreativa nas amostras de cascudo (figura 4.22). Assim, os resultados de *immunoblotting* revelados com anticorpos anti-CYP1A sugerem que os cascudos possuem uma proteína similar ao CYP1A, proteína essa que seria expressa em níveis muito inferiores aos níveis de

expressão da CYP1A de tilápias. Além disso, em cascudos, a expressão dessa proteína não seria aumentada pelos tratamentos com indutores CYP1A (ligantes do receptor Ah). A banda imunoreativa de baixa massa molecular (~42kDa) detectada pelo anticorpo monoclonal anti-CYP1A foi identificada por espectrometria de massas como sendo actina. No entanto, como pelo método usado somente é possível identificar as proteínas mais abundantes em cada banda, não é possível afirmar que a proteína que reagiu com o anticorpo seja de fato a actina. É possível que exista na mesma banda outra proteína menos abundante do que a actina, que seja a responsável pela marcação detectada por *immunoblotting*. Um caso semelhante a esse foi descrito na literatura. Nesse caso, anticorpos policlonais anti-CYP1A (incluindo o CP-226, usado neste trabalho) reagiram com bandas de géis unidimensional e manchas de géis bidimensionais que foram posteriormente identificadas como proteínas de citoesqueleto, como actina e tropomiosina (Grøsvik *et al.*, 2006). Nesse relato, os anticorpos também reagiram com proteínas na faixa de massa molecular entre 48-54 kDa, mas a identificação dessas proteínas não foi possível (Grøsvik *et al.*, 2006). No mesmo estudo, os autores mostram que uma região do CYP1A altamente conservada em peixes tem seqüência de resíduos de aminoácidos com alto grau de identidade com regiões de actina de peixe e molusco e de tropomiosina de molusco (Grøsvik *et al.*, 2006). Dessa forma, apesar da detecção de bandas imunoreativas ser um forte indício da expressão do CYP1A em cascudos; é preciso ter em mente que: i) tal detecção só foi realizada em condições extremamente favoráveis, ii) existe grande identidade entre regiões do CYP1A e de proteínas do citoesqueleto, e iii) anticorpos anti-CYP1A, inclusive o CP-226 usado neste trabalho, reagem contra proteínas do citoesqueleto em moluscos.

Utilizando espectrometria de massas, conseguimos identificar o CYP1A somente nas amostras de microsomas hepáticos de tilápias tratadas tanto com DMBA como com BNF. Esses peixes foram os que apresentaram maior indução de CYP1A, constatada tanto por *immunoblotting* quanto pelas atividades de EROD e MROD. Na amostra de microsomas hepáticos de tilápia tratada com DMBA também foi identificado o NADPH citocromo P450 redutase, enzima do complexo citocromo P450 necessária para a ação catalítica dessas monooxigenases. Nas amostras de tilápias tratadas, na mesma banda em que o CYP1A foi encontrado, também foi identificada a proteína calreticulina. A calreticulina foi identificada na mesma banda em todas as amostras de tilápias e de cascudos. Nessa mesma banda, nas tilápias controles, foi identificada ainda a enzima glutamato desidrogenase. Esses resultados

demonstram que, após a indução, o CYP1A passa a ser uma proteína abundante nos microsossomos hepáticos das tilápias. Como o CYP1A não foi identificado nos cascudos tratados com indutores, pode-se inferir que, ao contrário do que ocorreu com as tilápias, o tratamento dos cascudos com BNF e DMBA não foi eficiente para induzir CYP1A.

Considerados em sua totalidade, os resultados do presente estudo não permitem excluir a possibilidade da proteína CYP1A ser expressa no fígado de cascudos. No entanto, os resultados sugerem que se a proteína CYP1A é expressa no fígado de cascudos, i) o CYP1A desses loricarídeos exibiria características catalíticas e imunogênicas diferentes das da enzima CYP1A de tilápias, e ii) o nível de expressão constitutiva do CYP1A em cascudos seria muitas vezes inferior ao nível de expressão em tilápias e, iii) a expressão de CYP1A em cascudos não seria induzida por BNF e DMBA, ao contrário do que ocorre em tilápias e outros peixes.

5.2 Conversão do DMBA em metabólitos genotóxicos nos cascudos

O DMBA foi genotóxico tanto para cascudos como para tilápias, como evidenciado pelo aumento na frequência de eritrócitos com micronúcleos no sangue periférico. O DMBA necessita ser convertido em metabólitos eletrofilicos para exercer os seus efeitos mutagênicos e clastogênicos. Nas tilápias e em outros vertebrados, acredita-se que a ativação do DMBA envolva a participação do CYP1A. Como nos cascudos a atividade de EROD não foi detectada, a proteína CYP1A é muito pouco expressa constitutivamente e não é induzida por ligantes do receptor Ah, parece improvável que o DMBA possa ser ativado pelo CYP1A nesses peixes. Alguns estudos demonstram que o DMBA também pode ser ativado por outras subfamílias da família 1, como a CYP1B (Savas *et al.*, 1997; Shimada e Fujii-Kuriyama, 2004; Gao *et al.*, 2008). Aparentemente, a ação catalítica do CYP1B produz os mesmo metabólitos do DMBA produzidos pela ativação pelo CYP1A. Tem sido relatado que a ativação de HAP pelo CYP1B ocorre em níveis equivalentes, ou mesmo, superiores à ativação mediada por CYP1A (Shimada e Fujii-Kuriyama, 2004). Não é claro, entretanto, se o CYP1B é expresso em cascudos. Ainda permanece por ser esclarecido que isoformas CYP catalisam a ativação do DMBA em cascudos.

6. CONCLUSÕES

Neste trabalho, confirmamos amplamente os inesperados resultados que havíamos obtido, durante um estudo de biomonitoramento da bacia do rio Paraíba do Sul, indicando que a atividade catalítica de CYP1A (EROD) era extremamente baixa ou mesmo ausente no fígado de cascudos da família Loricariidae (*H.luetkeni* e *H.affinis*). Além disso, verificamos também que, apesar da aparente ausência de atividade mediada por CYP1A, os cascudos responderam ao tratamento com o pré-mutágeno DMBA (que, em outras espécies, requer ativação metabólica por CYPs da família 1, subfamílias 1A e 1B) de forma semelhante a outros peixes (*O.niloticus*), exibindo um acentuado aumento da frequência de eritrócitos micronucleados (dano cromossômico) no sangue periférico. Esta susceptibilidade dos cascudos ao efeito genotóxico de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos é consistente com relatos de estudos de campo, realizados pela equipe do Laboratório de Ictiologia do Museu Nacional do Rio de Janeiro (MNRJ-UFRJ), sobre a alta incidência de tumores em loricarídeos coletados em trechos do rio Paraíba do Sul contaminados com esses poluentes. Constatamos ainda que, nos microsossomos hepáticos dos cascudos, a atividade constitutiva da etoxicumarina-O-desetilase (ECOD) é alta e que proteínas imunoreativas com anticorpos anti-CYP3A de peixes são claramente expressas no fígado desses loricarídeos. Embora a presença de proteínas CYP1A na fração microsossomal hepática de cascudos tenha sido investigada por eletroforese em gel (SDS-PAGE), *immunoblotting* com dois anticorpos anti-CYP1A de peixes e, também, com o emprego de detecção por espectrometria de massas, não foi possível confirmar a expressão, nem excluir a possibilidade que essas proteínas sejam expressas constitutivamente em níveis muito baixos nesses loricarídeos. Os resultados indicaram, porém, que a expressão de proteínas CYP1A não foi induzida no fígado de cascudos após o tratamento com conhecidos ligantes do receptor Ah e indutores de CYP1A.

Em síntese, os resultados desse estudo indicaram que existem diferenças fundamentais entre cascudos e as outras espécies estudadas quanto à atividade catalítica e expressão de proteínas CYP1A no fígado. Os resultados mostraram ainda que cascudos tem alta atividade de ECOD no fígado e são capazes de converter hidrocarbonetos aromáticos policíclicos em metabólitos genotóxicos. Não foi claro, e necessita ser esclarecido em estudos subseqüentes, que isoformas CYP

catalisam a desetilacão da etoxicumarina no fígado de cascudos e a ativação metabólica de HPAs nesses peixes.

As principais conclusões pontuais deste trabalho são destacadas a seguir:

1. O DMBA foi genotóxico tanto para cascudos como para tilápias, o que foi demonstrado pelo aumento da frequência de eritrócitos com micronúcleo em sangue periférico de indivíduos tratados (50 mg/kg ip).
2. Nas tilápias e nos camundongos, a fração microsomal hepática foi capaz de catalisar reações de desalquilação de ésteres da resorufina (EROD, MROD, PROD e BROD). Nesses animais, as atividades de desalquilação dos ésteres da resorufina foram detectadas em níveis constitutivos, claramente aumentados após tratamento com conhecidos indutores de CYP1A e ligantes do receptor Ah (BNF e DMBA).
3. Nas duas espécies de cascudo estudadas (*H.luetkeni* e *H.affinis*), uma baixa atividade constitutiva de PROD e BROD foi detectada na fração microsomal hepática. Essa atividade, entretanto, não aumentou nos peixes tratados com conhecidos indutores de CYP1A.
4. Na fração microsomal hepática de cascudos, não foi possível detectar as atividades de EROD e MROD tanto em níveis constitutivos quanto após indução com ligantes do receptor Ah (BNF e DMBA).
5. A atividade de ECOD foi encontrada no fígado de todas as espécies analisadas neste trabalho, mas não foi induzida pelo tratamento com indutores de CYP1A. A atividade constitutiva de ECOD em cascudos e camundongos foi cerca de cinco vezes maior do que a registrada em tilápias.
6. Os resultados foram consistentes com a hipótese de que EROD é um marcador da atividade catalítica do CYP1A em tilápias (*O. niloticus*) tendo sido induzida pelo tratamento com conhecidos ligantes do receptor Ah e inibida *in vitro* pela α NF. Os dados também sugerem que o CYP1A não tem participação importante na catálise de ECOD no fígado de tilápias e cascudos. ECOD não foi induzida pelos conhecidos indutores de CYP1A e a inibição *in vitro* pela α NF foi fraca.
7. A expressão da proteína do CYP1A em tilápias tratadas foi confirmada por *immunoblotting* e por espectrometria de massas. Os resultados não foram conclusivos quanto à expressão constitutiva (em níveis baixos) do CYP1A em fígado cascudos.

7. PERSPECTIVAS

No presente trabalho, mostramos que existem diferenças fundamentais entre loricarídeos (cascudos) e ciclídeos (tilápia do Nilo) quanto a atividade catalítica e expressão de CYP1A no tecido hepático. Como desdobramento desse estudo, pretendemos caracterizar melhor as proteínas CYP presentes nos microsossomos hepáticos de cascudos e investigar os mecanismos subjacentes às diferenças encontradas entre esses loricarídeos e outros vertebrados. É possível que a regulação da expressão do CYP1A pelo receptor Ah seja diferente em cascudos, o que poderia explicar alguns dos resultados que obtivemos. A regulação do CYP1A via receptor Ah, entretanto, ainda não é completamente compreendida (Schmidt e Bradfield, 1996). Outros fatores de transcrição também estão envolvidos no processo, além de diversos co-fatores e sinais na região promotora do gene (Whitlock, 1999; Karchner *et al.*, 2002; Powell *et al.*, 2004; Hankinson, 2005; Oshima *et al.*, 2007). As interações entre a via AhR-CYP1A e outras vias, como a de resposta a hipoxia, também tem sido pouco estudadas. É nossa intenção continuar estudando o sistema de biotransformação de xenobióticos dos cascudos ao nível da regulação gênica e tentar elucidar os mecanismos de ativação do CYP1A via receptor AhR nessas espécies e suas interações com outras vias de sinalização celular.

ANEXO 1 – Tabela completa com a identificação das proteínas por MALDI-TOF/TOF

Cascudos

Amostra	Banda	Posição Maldi	Proteína	MW _{theor.} /pI _{theor.}	NCBI ID	“Score”	Seqüencia(s) identificada(s) dos peptídeos (Da)
CC	1	F17	Glucose-regulated protein 78 (Paralichthys olivaceus)	72247/ 4.97	gi 110226520		LTPEDIER (972.49), VEIANDQGNR (1228.62), ITPSYVAFTSEGER (1556.75), NQLTSNPENTVFDK (1677.78)
CD	1	G7	Glucose-regulated protein 78 (Paralichthys olivaceus)	72247/ 4.97	gi 110226520	20	ITPSYVAFTSEGER (1556.65)
CB	1	F9	Heat shock 70 kDa protein 5 (Danio rerio)	71946/ 5.04	gi 39645428	18 39 33 44 48	LTPEDIER (972.58), ITITNDQNR (1074.64), VYEGERPLTK (1191.74), VEIANDQGNR (1228.73), TWGDSSVQQDIK (1363.76)
CD	1	G7	Heat shock 70 kDa protein 5 (Danio rerio)	71946/ 5.04	gi 39645428	19 22 26 38 41	LTPEDIER (972.43), ITITNDQNR (1074.48), VYEGERPLTK (1191.55), VEIANDQGNR (1228.54), TWGDSSVQQDIK (1363.54)
CB	1	F9	Heat shock 70kDa protein (Danio rerio)	71946/ 5.04	gi 39645428	31 33 43 51	ITITNDQNR (1074.64), VYEGERPLTK (1191.74), VEIANDQGNR (1228.73), TWGDSSVQQDIK (1363.76)
CC	1	F17	Heat shock 70kDa protein 5 (glucose-regulated protein) (Danio rerio)	71946/ 5.04	gi 39645428	82 34	TWGDSSVQQDIK (1363.63), NQLTSNPENTVFDK (1677.78)
CD	1	G7	Heat shock protein 70 (Oxytricha sp. LPJ-2005)	40357/ 6.32	gi 67462292	44 38	EFFDGKEPSR (1211.49), VEIANDQGNR (1228.54)
CB	1	F9	Transferrin (Salmo trutta)		gi 5837809	48	VPAHAVVSR (935.62)
CD	5	G11	Phospholipase C-alpha (Homo sapiens)				MDATANDVPSPYEVR (1664.69)
CB	5	F13	Protein disulfide-isomerase (Ictalurus punctatus)	18584/ 4.30	gi 86370990	35 31	VHSFPTLK (928.49), KIIDYSGER (1080.53)
CC	5	F21	Protein disulfide-isomerase (Ictalurus punctatus)	18584/ 4.30	gi 86370990	37 37	VHSFPTLK (928.52), KIIDYSGER (1080.58)

CD	5	G11	Protein disulfide-isomerase (Ictalurus punctatus)	18584/ 4.30	gi 86370990	39 23 47	VHSFPTLK (928.48), IIDYSGER (952.43), KIIDYSGER (1080.52)
CD	5	G11	Unnamed protein product (Tetraodon nigroviridis)	54777/ 4.74	gi 47223959	39 22	VHSFPTLK (928.48), KEECPAIR + Carbamidomethyl (C) (1002.48)
CB	6	F14	Calrl protein (Danio rerio)	48230/ 4.33	gi 28422327	34 32 48	FEPFSNEGK (1054.46), KPEDWDDR(1060.45), LTAGNFYGDAAEKDK (1528.68)
CC	6	F22	Calrl protein (Danio rerio)	48230/ 4.33	gi 28422327	26 37 38	IDCGGGYVK.V + Carbamidomethyl (C) (968.48), FEPFSNEGK (1054.49), KPEDWDDR(1060.45)
CC	6	F22	Calrl protein (Danio rerio)	48230/ 4.33	gi 28422327	24 38 35	IDCGGGYVK + Carbamidomethyl (C) (968.47), FEPFSNEGK (1054.50), KPEDWDDR (1060.50)
CD	6	G12	Calrl protein (Danio rerio)	48230/ 4.33	gi 28422327	32 32 42 35	FEPFSNEGK (1054.44), KPEDWDDR (1060.44), KVHVIFNYK (1147.60), LTAGNFYGDAAEKDK (1528.66)
CB	7	F15	Aldehyde dehydrogenase (Danio rerio)	54640/ 8.94	gi 47086741	76 19	FDHIFYTGNSTVGK (1585.72), QRFDHIFYTGNSTVGK (1869.88)
CB	7	F15	Hypothetical protein LOC393668 (Danio rerio)		gi 41152346	53	GNPTVEVDLYTER (1492.69)
CB	7	F15	Predicted: ATP synthase (Pan troglodytes)	56410/ 5.20	gi 114644226	30 17 71 40	IPVGPETLGR (1038.56), IMNVIGEPIDER (1385.67), AHGGYSVFAGVGER (1406.63), VALVYGMNEPPGAR (1601.77)
CC	7	F23	Predicted: ATP synthase (Pan troglodytes)	56410/ 5.20	gi 114644226	36	AHGGYSVFAGVGER (1406.63)
CD	7	G13	Predicted: ATP synthase (Pan troglodytes)	56410/ 5.20	gi 114644226	37 47	IPVGPETLGR (1038.56), AHGGYSVFAGVGER (1406.63)
CB	9	F5	Hypothetical protein LOC100038785 (Danio rerio)	55779/ 5.19	gi 147905995	20 39 13	IPVGPETLGR (1038.70), AHGGYSVFAGVGER (1406.83), VALVYGMNEPPGAR (1601.99)

CC	10	G2	Bactin1 protein (Danio rerio)	41726/ 5.30	gi 28279111	38 28 39 59 87	AGFAGDDAPR (976.35), GYSFTTTAER (1132.41), HQGVMVGMGQK (1171.44), QEYDESGPSIVHR + Pyro-glu (N-term Q) (1499.50), QEYDESGPSIVHR (1516.53)
CD	10	G16	Bactin1 protein (Danio rerio)	41726/ 5.30	gi 28279111	18	AGFAGDDAPR (976.44)
CC	10	G2	Beta-actin (Oncorhynchus mykiss)	41670/ 5.38	gi 8886013	39 30 39 99	AGFAGDDAPR (976.35), GYSFTTTAER (1132.41), HQGVMVGMGQK (1171.44), QEYDESGPSIVHR (1516.53)
CD	11	G21	Bactin1 protein (Danio rerio)	41726/ 5.30	gi 28279111	51 34 58 95 26	AGFAGDDAPR (976.46), GYSFTTTAER (1132.55), HQGVMVGMGQK (1171.59), QEYDESGPSIVHR (1516.74), SYELPDGQVITIGNER (1790.91)
CC	11	G3	Beta-actin (Oncorhynchus mykiss)	41670/ 5.38	gi 8886013	31 41	AGFAGDDAPR (976.34), QEYDESGPSIVHR (1516.53)
CB	11	F7	Beta-actin (Tanichthys albonubes)	41654/ 5.30	gi 157382498	49 62 55 22	IWHHTFYNELR (1515.89), SYELPDGQVITIGNER (1791.05), VAPEEHPVLLTEAPLNPK (1954.23), DLYANTVLSGGTTMYPGIADR (2215.26)
CD	12	G17	Aldolase B (Poecilia reticulata)	39468/ 8.64	gi 126211573	24 46	AAQEAFFTR (1040.51), INVENTEENRR (1373.66)
CB	12	F8	Unnamed protein product (Tetraodon nigroviridis)		gi 47214598	42	VFGATEFVNPK (1208.75)
CB	13	F16	Glyceraldehyde phosphate dehydrogenase (Oncorhynchus mykiss)	36251/ 7.23	gi 13936898	40 49	VPTPNVSVVDLTVR (1945.81), LVTWYDNEFGYSNR (1763.76)
CB	13	F16	Glyceraldehyde phosphate dehydrogenase (Oncorhynchus mykiss)	36251/ 7.23	gi 13936898	40 49	VPTPNVSVVDLTVR (1495.81), LISWYDNEFGYSNR (1763.77)

Tilápia

Amostra	Banda	Posição Maldi	Proteína	MW _{theor.} /pI _{theor.}	NCBI ID	“Score”	Sequência(s) identificada(s) dos peptídeos (Da)
TB	1	A13	Glucose-regulated protein 78 (Paralichthys olivaceus)		gi 110226520	65 55 95 58 84 129 32	SDIDEIVLVGGSTR (1460.65), AKFEELNMDLFR (1512.64), ITPSYVAFTSEGER (1556.65), KSDIDEIVLVGGSTR (1588.74), VTHAVVTVPAYFNDAQR (1887.84), DNHLLGTFDLTGIPPAPR (1933.87) KVTHAVVTVPAYFNDAQR (2015.92)
TC	1	B7	Glucose-regulated protein 78 (Paralichthys olivaceus)		gi 110226520	27 23	ITITNDQNR (1074.52), VEIANDQGNR (1228.59)
TD	1	A1	Glucose-regulated protein 78 (Paralichthys olivaceus)		gi 110226520	56 36 95 66 75	SDIDEIVLVGGSTR (1460.73), AKFEELNMDLFR (1512.72), ITPSYVAFTSEGER (1556.74), KSDIDEIVLVGGSTR (1588.82), VTHAVVTVPAYFNDAQR (1887.94)
TC	1	B7	Heat shock cognate 71 (Kryptolebias marmoratus)		gi 37925912	23	VEIANDQGNR (1228.59)
TD	1	A1	Heat shock cognate 71 (Kryptolebias marmoratus)		gi 37925912	22 40 30	FELTGIPPAPR (1197.64), TTPSYVAFTDTER(1487.68), STAGDTHLGGEDFDNR (1691.73)
TD	1	A1	NADPH--cytochrome P450 reductase (Salmo trutta)		gi 29337176	23	NPFLAPVTVNR (1227.66)
TB	2	A14	Heat shock cognate 71 (Kryptolebias marmoratus)		gi 37925912	19 24 28 22 76	FELTGIPPAPR (1197.57), FEELNADLFR (1253.52), GQIHDIIVLVGGSTR (1451.69), TTPSYVAFTDTER(1487.59), STAGDTHLGGEDFDNR (1691.60)
TC	3	B9	Phosphoenolpyruvate carboxykinase (Salmo salar)		gi 76885910	26	YENCWLAR + Carbamidomethyl (C) (1111.47)
TD	3	A3	Phosphoenolpyruvate carboxykinase (Salmo salar)		gi 76885910	15 22	YENCWLAR + Carbamidomethyl (C) (1111.49), IFHVNWFR (1118.57)

TB	3	A15	Ribophorin I (Danio rerio)	gi 37497110	37	TILPASAQDVYYR (1496.65)
TC	3	B9	Ribophorin I (Danio rerio)	gi 37497110	24	TILPASAQDVYYR (1496.73)
TD	3	A3	Ribophorin I (Danio rerio)	gi 37497110	39 47 31	FPLFGGWK (951.49), TILPASAQDVYYR (1496.74), TIEVSHWGNIAVEETIDLR (2182.06)
TC	4	B10	Monoamine oxidase (Oncorhynchus mykiss)	gi 728485	29	MHFNPELPPLR (1350.67)
TC	4	B10	Monoamine oxidase (Danio rerio)	gi 40218524	80	WVDLGGAYIGPTQNR (1646.80)
TB	4	A16	Unnamed protein product (Tetraodon nigroviridis)	gi 47227494	32	HHPFVAPTLEGGQR (1545.66)
TD	4	A4	Unnamed protein product (Tetraodon nigroviridis)	gi 47227494	21	HHPFVAPTLEGGQR (1545.75)
TB	5	A17	Monoamine oxidase (Oncorhynchus mykiss)	gi 728485	37	MHFNPELPPLR (1350.58)
TC	5	B11	Monoamine oxidase (Oncorhynchus mykiss)	gi 728485	26	MHFNPELPPLR (1350.70)
TD	5	A5	Monoamine oxidase (Oncorhynchus mykiss)	gi 728485	27	MHFNPELPPLR (1350.66)
TB	5	A17	Amylase-3 protein (Tetraodon nigroviridis)	gi 17148483	30	TSIVHLFEWR (1287.57)
TC	5	B11	Amylase-3 protein (Tetraodon nigroviridis)	gi 17148483	21 25	LINMGVAGFR (1077.59), YQPISYNLCSR + Carbamidomethyl (C) (1400.66)
TB	5	A17	Monoamine oxidase (Danio rerio)	gi 40218524	83 40	WVDLGGAYIGPTQNR (1646.68), LYFAGTETATEWSGYMEGAVQAGER (2723.99)
TC	5	B11	Monoamine oxidase (Danio rerio)	gi 40218524	93	WVDLGGAYIGPTQNR (1646.82)
TD	5	A5	Monoamine oxidase (Danio rerio)	gi 40218524	74	WVDLGGAYIGPTQNR (1646.78)
TB	6	A18	Calreticulin (Paralichthys olivaceus)	gi 108735934	59	EEFLDGDEWR (1295.43)

TC	6	B12	Calreticulin (Paralichthys olivaceus)	gi 108735934	27	EEFLDGDEWR (1295.55)
TD	6	A6	Calreticulin (Paralichthys olivaceus)	gi 108735934	67	EEFLDGDEWR (1295.51)
TB	6	A18	Cytochrome P450 1A (Oreochromis niloticus)	gi 13365614	39	SLSFSTDQAGIWR (1467.58)
TD	6	A6	Cytochrome P450 1A (Oreochromis niloticus)	gi 13365614	64 62 64	SLSFSTDQAGIWR (1467.67), LVTEHYATFDKDNIR (1821.85), SFSNLEGGTTPEYSCALEEHISK + Carbamidomethyl (C) (2499.05)
TD	6	A6	Cytochrome P450 1A (Paralichthys olivaceus)	gi 133779715	62	IVTEHYATFDKDNIR (1821.25)
TB	6	A18	Cytochrome P450 1A1 (Dicentrarchus labrax)	gi 5921905	25	QGDEFAGRPDLYSFR (1757.66)
TD	6	A6	Cytochrome P450 1A1 (Dicentrarchus labrax)	gi 5921905	43	QGDEFAGRPDLYSFR (1757.77)
TC	6	B12	Glutamate dehydrogenase (Oncorhynchus mykiss)	gi 21715871	21 21	DNGEWEVVEGYR (1452.67), QGGPIVPTADFQAR (1666.87)
TB	7	B1	ATP synthase subunit beta (Cyprinus carpio)	gi 47605558	31 93 41	IPVGPETLGR (1038.51), AHGGYSVFAGVGER (1406.57), VALVYQGMNEPPGAR (1601.68)
TC	7	B13	ATP synthase subunit beta (Cyprinus carpio)	gi 47605558	73 49	AHGGYSVFAGVGER (1406.69), VALVYQGMNEPPGAR (1601.82)
TB	7	B1	Unnamed protein product (Tetraodon nigroviridis)	gi 47220325	23 34	YDQLFPR (938.40), KYDQLFPR (1066.49)
TC	7	B13	Unnamed protein product (Tetraodon nigroviridis)	gi 47220325	21 40	YDQLFPR (938.48), KYDQLFPR (1066.57)
TD	7	A7	Unnamed protein product (Tetraodon nigroviridis)	gi 47220325	29	KYDQLFPR (1066.53)

TC	8	B14	ATP synthase subunit beta (<i>Cyprinus carpio</i>)	gi 47605558	20 68 37 67 88 43 103	IMNVIGEPIDER (1385.72), AHGGYSVFAGVGER (1406.69), VALTGLTVAEYFR (1439.80), VALVYQMNPPGAR (1601.82), LVLEVAQHLGENTVR (1677.93), AIAELGIYPAVDPLDSTSR (1988.04), IPSAVGYQPTLATDMGMTMQR (2266.09)
TB	8	B2	Dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase (<i>Danio rerio</i>)	gi 33991828	15 37	LPDVYGVFQFK (1312.56), WVPFDGDDIQLFVR (1835.74)
TD	8	A8	Ribophorin I (<i>Danio rerio</i>)	gi 37497110	15 22	IHYENNSPFLTISSITR (1991.93), QLVVFQGNHYLYSPYPTR (2182.01)
TB	8	B2	Unnamed protein product (<i>Tetraodon nigroviridis</i>)	gi 47221059	38	EALVDQADDFTGR (1436.55) (tem homologia com Cytochrome P450 de outras especies)
TC	8	B14	Unnamed protein product (<i>Tetraodon nigroviridis</i>)	gi 47220325	25	KYDQLFPR (1066.58)
TD	8	A8	Unnamed protein product (<i>Tetraodon nigroviridis</i>)	gi 47221059	58	EALVDQADDFTGR (1436.61)
TC	9	B15	Beta-actin (<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>)	gi 119943232	22	IWHHTFYNELR (1515.77)
TD	9	A9	Monoamine oxidase (<i>Danio rerio</i>)	gi 40218524	16	WVDLGGAYIGPTQNR (1646.75)
TB	9	B3	Ribosomal protein L3 (<i>Danio rerio</i>)	gi 60688481	23 21	HGSLGFLPR (983.49), VACIGAWHPAR + Carbamidomethyl (C) (1237.56)
TB	9	B3	Unnamed protein product (<i>Tetraodon nigroviridis</i>)	gi 47221059	42	EALVDQADDFTGR (1436.58)
TC	9	B15	Unnamed protein product (<i>Tetraodon nigroviridis</i>)	gi 47221059	102	EALVDQADDFTGR (1436.69)
TD	9	A9	Unnamed protein product (<i>Tetraodon nigroviridis</i>)	gi 47221059	78	EALVDQADDFTGR (1436.60)

TC	10	B16	Beta-actin (<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>)	gi 119943232	22 21 63 54 107 53 109	AGFAGDDAPR (976.47), GYSFTTTAER (1132.55), QEYDESGPSIVHR + Pyro-glu (N-term Q) (1499.70), IWHHTFYNELR (1515.78), SYELPDGQVITIGNER (1790.92), VAPEEHPVLLTEAPLNPK (1954.08), DLYANTVLSGGTTMYPGIADR (2215.09)
TB	10	B4	Beta-actin (<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>)	gi 119943232	23 24 67 61 101 55 87	AGFAGDDAPR (976.40), AVFPSIVGRPR (1198.62), QEYDESGPSIVHR + Pyro-glu (N-term Q) (1499.58), IWHHTFYNELR (1515.65), SYELPDGQVITIGNER (1790.78), VAPEEHPVLLTEAPLNPK (1953.93), DLYANTVLSGGTTMYPGIADR (2214.92)
TD	10	A10	Beta-actin (<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>)	gi 119943232	33 29 93 45 46 80	AVFPSIVGR (945.50), GYSFTTTAER (1132.47), QEYDESGPSIVHR + Pyro-glu (N-term Q) (1499.60), IWHHTFYNELR (1515.68), SYELPDGQVITIGNER (1790.80), VAPEEHPVLLTEAPLNPK (1953.97)
TC	11	B17	Alanine-glyoxylate aminotransferase (<i>Danio rerio</i>)	gi 47085935	45	YLFPGPSNVPPR (1400.77)
TB	11	B5	Alcohol dehydrogenase Class VI (<i>Oryzias latipes</i>)	gi 157278329	27	VIPLFISQCR + Carbamidomethyl (C) (1232.62)
TC	11	B17	Alcohol dehydrogenase Class VI (<i>Oryzias latipes</i>)	gi 157278329	37 51	VIPLFISQCR + Carbamidomethyl (C) (1232.72), AAVAWEPNKPLVIEDIEVAPPQANEVR (2955.61)
TC	11	B17	Beta-actin (<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>)	gi 119943232	34 40	IWHHTFYNELR (1515.79), SYELPDGQVITIGNER (1790.93)
TC	11	B17	Fructose-bisphosphate aldolase B (<i>Oryzias latipes</i>)	gi 46849373	32	ISDGCPALAIENANVLAR + Carbamidomethyl (C) (2042.08)

TB	11	B5	Ribosomal protein L4 (Pagrus major)	gi 37779080	19 51 30 102	SGQGAFGNMCR + Carbamidomethyl (1184.44), FCIWTESAFR + Carbamidomethyl (C) (1316.55), APIRPDVVNFVHTNMR (1865.89), QPYAVSELAGHQ TSAESWG TGR + Pyro-glu (N-term Q) (2314.95)
TC	11	B17	Ribosomal protein L4 (Pagrus major)	gi 37779080	15 49	FCIWTESAFR + Carbamidomethyl (C) (1316.65), QPYAVSELAGHQ TSAESWG TGR + Pyro-glu (N-term Q) (2315.13)
TD	11	A11	Ribosomal protein L4 (Pagrus major)	gi 37779080	28 14	SGQGAFGNMCR + Carbamidomethyl (1184.42), QPYAVSELAGHQ TSAESWG TGR + Pyro-glu (N-term Q) (2314.92)
TD	11	A11	Unnamed protein product (Tetraodon nigroviridis)	gi 47214598	44	VFGATEFVNPK (1208.56)
TB	12	B6	Alcohol dehydrogenase Class VI (Oryzias latipes)	gi 157278329	37 59	VIPLFISQCR + Carbamidomethyl (C) (1232.62), AAVAWEPNKPLVIEDIEVAPPQANEVR (2955.39)
TB	12	B6	Fructose-bisphosphate aldolase B (Lepisosteus osseus)	gi 46849387	28 11	YTPQEVAMATVTALR (1650.77), KYTPQEVAMATVTALR (1778.85)
TC	12	B18	Fructose-bisphosphate aldolase B (Lepisosteus osseus)	gi 46849387	12 18	YTPQEVAMATVTALR (1650.89), KYTPQEVAMATVTALR (1778.99)
TB	12	B6	Fructose-bisphosphate aldolase B (Oryzias latipes)	gi 46849373	137	ISDGCP SALAIAENANVLAR + Carbamidomethyl (C) (2041.93)
TC	12	B18	Fructose-bisphosphate aldolase B (Oryzias latipes)	gi 46849373	141	ISDGCP SALAIAENANVLAR + Carbamidomethyl (C) (2042.09)
TD	12	A12	Fructose-bisphosphate aldolase B (Oryzias latipes)	gi 46849373	52	ISDGCP SALAIAENANVLAR + Carbamidomethyl (C) (2041.91)
TB	12	B6	Unnamed protein product (Tetraodon nigroviridis)	gi 47214598	27	VFGATEFVNPK (1208.57)

ANEXO 2 - Trabalhos publicados no período do mestrado

Artigos completos em revistas internacionais

1 - Parente, T. E., A. C. De-Oliveira e F. J. Paumgartten. Induced cytochrome P450 1A activity in cichlid fishes from Guandu River and Jacarepagua Lake, Rio de Janeiro, Brazil. Environmental Pollution, v.152, n.1, Jun 27, p.233-8. 2008.

Resumos publicados em periódicos internacionais

1 - PARENTE, T. E. M., OLIVEIRA, A. C. A. X., FRIEDRICH, K., ACQUARONE, M., Paumgarttem, F.J.R. Comparative study on cytochrome P450s of cichlidae and loriciidae fish. In: Abstracts from Fourteenth International Symposium on Pollutant Responses in Marine Organisms (PRIMO 14) - Organic Xenobiotics: Mechanisms of detoxification and mechanisms of toxicity. Marine Environmental Research 66 (2008) 27-34.

2 - PARENTE, T. E. M., Santos, L.M.F., Torres, J.P.M., Araujo, F. G., Paumgarttem, F.J.R. Evaluation of Paraíba do Sul River basin pollution using biochemical biomarkers in fish.. In: Abstracts from Fourteenth International Symposium on Pollutant Responses in Marine Organisms (PRIMO 14) - Field studies. Marine Environmental Research 66 (2008) 199-204

3 - MATIAS, G. R. A., RODRIGUES, I. L., NASCIMENTO, I. A., REBELO, M. F., PARENTE, T. E. M., LUZ, L. D., KIPERSTOCK, A. Evaluation of the contamination of the water bodies using the induction of EROD activity as biomarker. In: Abstracts from Fourteenth International Symposium on Pollutant Responses in Marine Organisms (PRIMO 14) - Biomarkers of pollutants at the molecular, cellular, histological and organismic level. Marine Environmental Research 66 (2008) 166-180

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Abrahamson, A., C. Andersson, M. E. Jonsson, O. Fogelberg, J. Orberg, B. Brunstrom e I. Brandt. Gill EROD in monitoring of CYP1A inducers in fish—A study in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) caged in Stockholm and Uppsala waters. Aquatic Toxicology, v.85 p.1–8. 2007.
- Alestrom, P., J. L. Holter e R. Nourizadeh-Lillabadi. Zebrafish in functional genomics and aquatic biomedicine. TRENDS in Biotechnology, v.24, n.1, p.15-21. 2006.
- Bastos, V. L., L. F. Pinto, L. M. Lima e J. C. Bastos. Identification and induction by beta-naphthoflavone of CYP1A1 in liver of the neotropical fish pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Characiformes: characidae). Bull Environ Contam Toxicol, v.72, n.1, Jan, p.13-20. 2004.
- Bello, S. M., D. G. Franks, J. J. Stegeman e M. E. Hahn. Acquired resistance to Ah receptor agonists in a population of Atlantic Killifish (*Fundulus heteroclitus*) inhabiting a marine superfund site: *in vivo* and *in vitro* studies on the inducibility of xenobiotics metabolizing enzymes. TOXICOLOGICAL SCIENCES, v.60, p.77-91. 2001.
- Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, v.72, May 7, p.248-54. 1976.
- Burke, M. D., S. Thompson, R. J. Weaver, C. R. Wolf e R. T. Mayer. Cytochrome P450 specificities of alkoxyresorufin O-dealkylation in human and rat liver. Biochem Pharmacol, v.48, n.5, Aug 30, p.923-36. 1994.
- Burnett, K. G., L. J. Bain, W. S. Baldwin, G. V. Callard, S. Cohen, R. T. Di Giulio, D. H. Evans, M. Gomez-Chiarri, M. E. Hahn, C. A. Hoover, S. I. Karchner, F. Katoh, D. L. Maclatchy, W. S. Marshall, J. N. Meyer, D. E. Nacci, M. F. Oleksiak, B. B. Rees, T. D. Singer, J. J. Stegeman, D. W. Towle, P. A. Van Veld, W. K. Vogelbein, A. Whitehead, R. N. Winn e D. L. Crawford. *Fundulus* as the Premier Teleost Model in Environmental Biology: Opportunities for New Insights Using Genomics. Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics, v.2, n.4, Dec, p.257-286. 2007.
- Cajaraville, M. P., M. J. Bebianno, J. Blasco, C. Porte, C. Sarasquete e A. Viarengo. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. Sci Total Environ, v.247, n.2-3, Mar 20, p.295-311. 2000.
- Canova, S., P. Degan, L. D. Peters, D. R. Livingstone, R. Voltan e P. Venier. Tissue dose, DNA adducts, oxidative DNA damage and CYP1A-immunopositive proteins in mussels exposed to waterborne benzo[a]pyrene. Mutat Res., v.399, n.1, p.17-30. 1998.
- Ccac. The care and use of fish in research, teaching and testing. Ottawa: Canadian Council on Animal Care. 2005
- Celander, M., Buhler, D.R., Förllin, L., Goksoyr, A., Miranda, C.L., Woodin, B.R., Stegeman, J.J. Immunochemical relationships of cytochrome P4503A-like proteins in teleost fish. Fish Physiol. Biochem., v.15, n.4. 1996.
- Celander, M. C., M. J. Moore e J. J. Stegeman. Cellular localization of CYP3A proteins in various tissues from pilot whale (*Globicephala melas*). Environ Toxicol Pharmacol, v.8, n.4, Jun 1, p.245-253. 2000.
- Chen, S. e X. Li. Transposable elements are enriched within or in close proximity to xenobiotic-metabolizing cytochrome P450 genes. BMC Evol Biol. 2007 Mar 23;7:46., v.Mar 23, n.7. 2007.

- Chen, W. J., G. Orti e A. Meyer. Novel evolutionary relationship among four fish model systems. Trends Genet, v.20, n.9, Sep, p.424-31. 2004.
- Da Silva Souza, T. e C. S. Fontanetti. Micronucleus test and observation of nuclear alterations in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters affected by refinery effluent. Mutat Res, v.605, n.1-2, Jun 16, p.87-93. 2006.
- Ding, X. e L. S. Kaminsky. HUMAN EXTRAHEPATIC CYTOCHROMES P450: Function in Xenobiotic Metabolism and Tissue-Selective Chemical Toxicity in the Respiratory and Gastrointestinal Tracts. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. . ., v.43, p.149-73. 2003.
- Ertl, R. P., S. M. Bandiera, D. R. Buhler, J. J. Stegeman e G. W. Winston. Immunochemical analysis of liver microsomal cytochromes P450 of the American alligator, Alligator mississippiensis. Toxicol Appl Pharmacol, v.157, n.3, Jun 15, p.157-65. 1999.
- Estabrook, R. W., D. Y. Cooper e O. Rosenthal. The light reversible carbon monoxide inhibition of the steroid C21-hydroxylase system of the adrenal cortex. Biochem Z., v.338, p.741-55. 1963.
- Fisher, M. A. e M. F. Oleksiak. Convergence and divergence in gene expression among natural populations exposed to pollution. BMC Genomics, v.8, p.10. 2007.
- Funae, Y. e S. Imaoka. Cytochrome P450 in rodents. In: J. B. S. H. Greim (Ed.). Handbook of experimental pharmacology. Heidelberg: Springer-Verlag, v.105, 1993. Cytochrome P450 in rodents., p.221-238
- Gao, J., L. A. Mitchell, F. T. Lauer e S. W. Burchiel. p53 and ATM/ATR regulate 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced immunosuppression. Mol Pharmacol, v.73, n.1, Jan, p.137-46. 2008.
- Goksøyr, A., T. Andersson, D. R. Buhler, J. J. Stegeman, D. E. Williams e L. Forlin. Immunochemical cross-reactivity of b-naphthoflavone-inducible cytochrome P450 (P450IA) in liver microsomes from different fish species and rat. Fish Physiol Biochem, v.9, p.1-13. 1991.
- Goldstone, H. M. e J. J. Stegeman. A revised evolutionary history of the CYP1A subfamily: gene duplication, gene conversion, and positive selection. J Mol Evol, v.62, n.6, Jun, p.708-17. 2006.
- Goldstone, J. V., H. M. Goldstone, A. M. Morrison, A. Tarrant, S. E. Kern, B. R. Woodin e J. J. Stegeman. Cytochrome P450 1 Genes in Early Deuterostomes (Tunicates and Sea Urchins) and Vertebrates (Chicken and Frog): Origin and Diversification of the CYP1 Gene Family. Mol Biol Evol, v.24, n.12, Oct 4, p.2619-31. 2007.
- Goldstone, J. V., A. Hamdoun, B. J. Cole, M. Howard-Ashby, D. W. Nebert, M. Scally, M. Dean, D. Epel, M. E. Hahn e J. J. Stegeman. The chemical defensome: Environmental sensing and response genes in the *Strongylocentrotus purpuratus* genome. Developmental Biology v.300, p. 366-384. 2006.
- Grimm, N. B., S. H. Faeth, N. E. Golubiewski, C. L. Redman, J. Wu, X. Bai e J. M. Briggs. Global change and the ecology of cities. Science, v.319, n.5864, p.756-60. 2008.
- Grøsvik, B. E., H. Jonsson, M. J. Rodríguez-Ortega, P. Roepstorff e A. Goksøyr. CYP1A-immunopositive proteins in bivalves identified as cytoskeletal and major vault proteins. Aquat Toxicol., v.79, n.4, p.334-40. 2006.
- Hahn, M. E. The aryl hydrocarbon receptor: a comparative perspective. Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol, v.121, n.1-3, Nov, p.23-53. 1998.

- Hahn, M. E., S. I. Karchner, B. R. Evans, D. G. Franks, R. R. Merson e J. M. Lapsieritis. Unexpected diversity of aryl hydrocarbon receptors in non-mamalian vertebrates: insights from comparative genomics. J Exp Zool A Comp Exp Biol., v.305, n.9, p.693-706. 2006.
- Hahn, M. E., B. R. Woodin, J. J. Stegeman e D. E. Tillitt. Aryl hydrocarbon receptor function in early vertebrates: inducibility of cytochrome P450 1A in agnathan and elasmobranch fish. Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol, v.120, n.1, Jul, p.67-75. 1998.
- Handley-Goldstone, H. M., M. W. Grow e J. J. Stegeman. Cardiovascular Gene Expression Profiles of Dioxin Exposure in Zebrafish Embryos. TOXICOLOGICAL SCIENCES, v.85, p.683-693. 2005.
- Handschin, C. e U. A. Meyer. Induction of drug metabolism: the role of nuclear receptors. Pharmacol Rev, v.55, n.4, Dec, p.649-73. 2003.
- Hankinson, O. Role of coactivators in transcriptional activation by the aryl hydrocarbon receptor. Arch Biochem Biophys, v.433, n.2, Jan 15, p.379-86. 2005.
- Hugla, J. L. e J. P. Thome. Effects of polychlorinated biphenyls on liver ultrastructure, hepatic monooxygenases, and reproductive success in the barbel. Ecotoxicol Environ Saf, v.42, n.3, Mar, p.265-73. 1999.
- James, M. O., Z. Lou, L. Rowland-Faux e M. C. Celander. Properties and regional expression of a CYP3A-like protein in channel catfish intestine. Aquatic Toxicology, v.72, n.4, May, p.361-371. 2005.
- Jonsson, H., D. Schiedek, A. Goksøyr e B. E. Grøsvik. Expression of cytoskeletal proteins, cross-reacting with anti-CYP1A, in *Mytilus* sp. exposed to organic contaminants. Aquat Toxicol., v.78, n.Suppl 1, p.S42-8. 2006.
- Karchner, S. I., D. G. Franks, S. W. Kennedy e M. E. Hahn. The molecular basis for differential dioxin sensitivity in birds: Role of the aryl hydrocarbon receptor. PNAS, v.103, n.16, p.6252-6257. 2006.
- Karchner, S. I., D. G. Franks, W. H. Powell e M. E. Hahn. Regulatory interactions among three members of the vertebrate aryl hydrocarbon receptor family: AHR repressor, AHR1, and AHR2. J Biol Chem, v.277, n.9, Mar 1, p.6949-59. 2002.
- Kirby, M. F., P. Neall, T. A. Bateman e J. E. Thain. Hepatic ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) activity in flounder (*Platichthys flesus*) from contaminant impacted estuaries of the United Kingdom: continued monitoring 1999-2001. Mar Pollut Bull, v.49, n.1-2, Jul, p.71-8. 2004.
- Klingenberg, M. Pigments of rat liver microsomes. Arch Biochem Biophys., v.75, n.2, p.376-86. 1958.
- Klinger, W., A. Lupp, A. Barth, E. Karge, L. Knels, U. Kuhn, D. Muller, F. Schiller, U. Demme, P. Lindstrom-Seppa e O. Hanninen. Cytochrome P450 (P450) isoforms expression, P450 concentration, monooxygenase activities, reactive oxygen species formation, lipid peroxidation, and glutathione content in wild catch carp and tench liver--influence of a two weeks exposure to phenobarbital. Exp Toxicol Pathol, v.52, n.6, Feb, p.513-22. 2001.
- Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, v.227, n.5259, Aug 15, p.680-5. 1970.
- Mansuy, D. The great diversity of reactions catalyzed by cytochromes P450. Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol, v.121, n.1-3, Nov, p.5-14. 1998.

- Matsuo, A. Y., E. P. Gallagher, M. Trute, P. L. Stapleton, R. Levado e D. Schlenk. Characterization of Phase I biotransformation enzymes in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol, v.147, n.1, Jan, p.78-84. 2008.
- Matsuo, A. Y., B. R. Woodin, C. M. Reddy, A. L. Val e J. J. Stegeman. Humic substances and crude oil induce cytochrome P450 1A expression in the Amazonian fish species *Colossoma macropomum* (Tambaqui). Environ Sci Technol, v.40, n.8, Apr 15, p.2851-8. 2006.
- Mcguire, J., P. Coumailleau, M. L. Whitelaw, J. A. Gustafsson e L. Poellinger. The basic helix-loop-helix/PAS factor Sim is associated with hsp90. Implications for regulation by interaction with partner factors. J Biol Chem, v.270, n.52, Dec 29, p.31353-7. 1995.
- Mortensen, A. S. e A. Arukwe. Modulation of xenobiotic biotransformation system and hormonal responses in Atlantic salmon (*Salmo salar*) after exposure to tributyltin (TBT). Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol, v.145, n.3, Apr, p.431-41. 2007.
- Nebert, D. W. e T. P. Dalton. The role of cytochrome P450 enzymes in endogenous signalling pathways and environmental carcinogenesis. Nat. Rev. Cancer, v.6, p.947-960. 2006.
- Nelson, D. R. Comparison of P450s from human and fugu: 420 million years of vertebrate P450 evolution. Arch. Biochem. Biophys., v.409, p.18-24. 2003.
- _____. Cytochrome P450 nomenclature, 2004. Methods Mol Biol., v.320, p.1-10. 2006.
- Omura, T. Forty years of cytochrome P450. Biochem Biophys Res Commun, v.266, n.3, Dec 29, p.690-8. 1999.
- Omura, T. e R. Sato. A new cytochrome in liver microsomes. J Biol Chem., v.237, p.1375-6. 1962.
- _____. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. J Biol Chem., v.239, p.2370-8. 1964a.
- _____. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. II. Solubilization, purification, and properties. J Biol Chem., v.239, p.2379-85. 1964b.
- Oshima, M., J. Mimura, M. Yamamoto e Y. Fujii-Kuriyama. Molecular mechanism of transcriptional repression of AhR repressor involving ANKRA2, HDAC4, and HDAC5. Biochem Biophys Res Commun, v.364, n.2, Dec 14, p.276-82. 2007.
- Parente, T. E., A. C. De-Oliveira e F. J. Paumgarten. Induced cytochrome P450 1A activity in cichlid fishes from Guandu River and Jacarepagua Lake, Rio de Janeiro, Brazil. Environmental Pollution, v.152, n.1, Jun 27, p.233-8. 2008.
- Parente, T. E., A. C. De-Oliveira, I. B. Silva, F. G. Araujo e F. J. Paumgarten. Induced alkoxyresorufin-O-dealkylases in tilapias (*Oreochromis niloticus*) from Guandu river, Rio de Janeiro, Brazil. Chemosphere, v.54, n.11, Mar, p.1613-8. 2004.
- Peng, Z., S. He, J. Wang, W. Wang e R. Diogo. Mitochondrial molecular clocks and the origin of the major Otocephalan clades (Pisces: Teleostei): A new insight. Gene, v.370, Mar 29, p.113-24. 2006.
- Peng, Z., J. Wang e S. He. The complete mitochondrial genome of the helmet catfish *Cranoglanis boudierius* (Siluriformes: Cranoglanididae) and the phylogeny of otophysan fishes. Gene, v.376, n.2, Jul 19, p.290-7. 2006.

- Peters, L. D., C. Nasi e D. R. Livingstone. Immunochemical investigations of cytochrome P450 forms/epitopes (CYP1A, 2B, 2E, 3A and 4A) in digestive gland of *Mytilus* sp. Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol., v.121, n.1-3, p.361-9. 1998.
- Poca, K. S., A. C. De-Oliveira, M. J. Santos e F. J. Paumgartten. Malaria infection modulates effects of genotoxic chemicals in the mouse bone-marrow micronucleus test. Mutat Res, v.649, n.1-2, Jan 8, p.28-33. 2008.
- Powell, W. H., H. G. Morrison, E. J. Weil, S. I. Karchner, M. L. Sogin, J. J. Stegeman e M. E. Hahn. Cloning and analysis of the CYP1A promoter from the atlantic killifish (*Fundulus heteroclitus*). Mar Environ Res, v.58, n.2-5, Aug-Dec, p.119-24. 2004.
- Pretti, C., A. Salvetti, V. Longo, M. Giorgi e P. G. Gervasi. Effects of beta-naphthoflavone on the cytochrome P450 system, and phase II enzymes in gilthead seabream (*Sparus aurata*). Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol, v.130, n.1, Sep, p.133-44. 2001.
- Raner, G. M., A. D. N. Vaz e M. J. Coon. Metabolism of All-trans, 9-cis, and 13-cis Isomers of Retinal by Purified Isozymes of Microsomal Cytochrome P450 and Mechanism-based Inhibition of Retinoid Oxidation by Citral. Molecular Pharmacology, v.49, p.515-522. 1996.
- Ronis, M. J. J., T. Andersson, T. Hansson e C. H. Walker. Differential expression of multiple forms of cytochrome P-450 in vertebrates: antibodies to purified rat cytochrome P-450 as molecular probes for the evolution of P-450 gene families I and II. Mar Environ Res, v.28, p.131-5. 1989.
- Ruus, A., M. Sandvik, K. I. Ugland e J. U. Skaare. Factors influencing activities of biotransformation enzymes, concentrations and compositional patterns of organochlorine contaminants in members of a marine food web. Aquat Toxicol, v.61, n.1-2, Nov 13, p.73-87. 2002.
- Santos, L. M. F. Atividade de etoxiresorufina-O-desetilase, frequência de micronúcleos e níveis de metais em peixes provenientes da bacia do rio Paraíba do Sul. ENSP - FIOCRUZ, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 2004. 174 p.
- Savas, U., C. P. Carstens e C. R. Jefcoate. Biological oxidations and P450 reactions. Recombinant mouse CYP1B1 expressed in *Escherichia coli* exhibits selective binding by polycyclic hydrocarbons and metabolism which parallels C3H10T1/2 cell microsomes, but differs from human recombinant CYP1B1. Arch Biochem Biophys, v.347, n.2, Nov 15, p.181-92. 1997.
- Schlezing, J. J. e J. J. Stegeman. Induction of cytochrome P450 1A in the American Eel by model halogenated and non-halogenated aryl hydrocarbon receptor agonists. Aquat Toxicol, v.50, n.4, Oct 1, p.375-386. 2000.
- Schmidt, J. V. e C. A. Bradfield. Ah receptor signaling pathways. Annu Rev Cell Dev Biol, v.12, p.55-89. 1996.
- Sen, A. e E. Arinc. Further immunochemical and biocatalytic characterization of CYP1A1 from feral leaping mullet liver (*Liza saliens*) microsomes. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol, v.126, n.3, Jul, p.235-44. 2000.
- Shailaja, M. S. e C. D'silva. Evaluation of impact of PAH on a tropical fish, *Oreochromis mossambicus* using multiple biomarkers. Chemosphere, v.53, n.8, Dec, p.835-41. 2003.
- Shaw, J. P., A. T. Large, J. K. Chipman, D. R. Livingstone e L. D. Peters. Seasonal variation in mussel *Mytilus edulis* digestive gland cytochrome P4501A- and 2E-immunoidentified protein levels and DNA strand breaks (Comet assay). Mar Environ Res., v.50, n.1-5, p.405-9. 2000.

- Shaw, J. P., L. D. Peters e J. K. Chipman. CYP1A- and CYP3A-immunopositive protein levels in digestive gland of the mussel *Mytilus galloprovincialis* from the Mediterranean Sea. Mar Environ Res., v.58, n.2-5, p.649-53. 2004
- Shimada, T. Xenobiotic-metabolizing enzymes involved in activation and detoxification of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. Drug Metab Pharmacokinet, v.21, n.4, Aug, p.257-76. 2006.
- Shimada, T. e Y. Fujii-Kuriyama. Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons to carcinogens by cytochromes P450 1A1 and 1B1. Cancer Sci, v.95, n.1, Jan, p.1-6. 2004.
- Smeets, J. M., J. Wamsteker, B. Roth, J. Everaarts e M. Van Den Berg. Cytochrome P4501A induction and testosterone hydroxylation in cultured hepatocytes of four fish species. Chemosphere, v.46, n.2, Jan, p.163-72. 2002.
- Stegeman, J. J. Cytochrome P450 forms in fish: catalytic, immunological and sequence similarities. Xenobiotica, v.19, n.10, Oct, p.1093-110. 1989.
- Stegeman, J. J. e M. E. Hahn. Biochemistry and Molecular Biology of Monooxygenases: Current perspectives on forms, functions and regulation of cytochromes P450 in aquatic species. In: D. C. Malins e G. K. Ostrander (Ed.). Aquatic Toxicology: Molecular , biochemical and cellular perspectives. Boca Raton: CRV/Lewis, 1994. Biochemistry and Molecular Biology of Monooxygenases: Current perspectives on forms, functions and regulation of cytochromes P450 in aquatic species, p.87-206
- Stegeman, J. J. e D. R. Livingstone. Forms and functions of cytochrome P450. Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol, v.121, n.1-3, Nov, p.1-3. 1998.
- Stegeman, J. J. e B. R. Woodin. The metabolism of α -naphthoflavone (7, 8-benzoflavone) by hepatic microsomes from the marine fish *Stenotomus versicolor*. Biochemical and Biophysical research communications, v.95, n.1, p.6. 1980.
- Stegeman, J. J., B. R. Woodin, H. Singh, M. F. Oleksiak e M. Celander. Cytochromes P450 (CYP) in tropical fishes: catalytic activities, expression of multiple CYP proteins and high levels of microsomal P450 in liver of fishes from Bermuda. Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol, v.116, n.1, Jan, p.61-75. 1997.
- Sullivan, J. P., J. G. Lundberg e M. Hardman. A phylogenetic analysis of the major groups of catfishes (Teleostei: Siluriformes) using rag1 and rag2 nuclear gene sequences. Mol Phylogenet Evol, v.41, n.3, Dec, p.636-62. 2006.
- The Comparative Toxicogenomics Database, C. The Comparative Toxicogenomics Database: The Comparative Toxicogenomics Database. 2008 2008.
- Thomas, J. H. Rapid birth-death evolution specific to xenobiotic cytochrome P450 genes in vertebrates. PLoS Genet, v.3, n.5, May 11, p.e67. 2007.
- Torre, C. D., I. Corsi, L. Alcaro, E. Amato e S. Focardi. The involvement of cytochrome P450 system in the fate of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) in European eel [*Anguilla anguilla* (Linnaeus, 1758)]. Biochem Soc Trans, v.34, n.Pt 6, Dec, p.1228-30. 2006.
- Troxel, C. M., D. R. Buhler, J. D. Hendricks e G. S. Bailey. CYP1A induction by beta-naphthoflavone, Aroclor 1254, and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and its influence on aflatoxin B1 metabolism and DNA adduction in zebrafish. Toxicol Appl Pharmacol, v.146, n.1, Sep, p.69-78. 1997.

Verbrugge, L. A., J. P. Giesy, D. A. Verbrugge, B. R. Woodin e J. J. Stegeman. Catalytic and immunochemical properties of hepatic cytochrome P450 1A in three avian species treated with beta-naphthoflavone or isosafrole. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol, v.130, n.1, Sep, p.67-83. 2001.

Wang, Y., A. Al-Gazzar, C. Seibert, A. Sharif, C. Lane e W. J. Griffiths. Proteomic analysis of cytochromes P450: a mass spectrometry approach. Biochemical Society Transactions, v.34, n.6, p.1246-1251. 2006.

Weaver, R. J., S. Thompson, G. Smith, M. Dickins, C. R. Elcombe, R. T. Mayer e M. D. Burke. A comparative study of constitutive and induced alkoxyresorufin O-dealkylation and individual cytochrome P450 forms in cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*), human, mouse, rat and hamster liver microsomes. Biochem Pharmacol., v.47, n.5, p.763-73. 1994.

Weber, L. P. e D. M. Janz. Effect of beta-naphthoflavone and dimethylbenz[a]anthracene on apoptosis and HSP70 expression in juvenile channel catfish (*Ictalurus punctatus*) ovary. Aquat Toxicol, v.54, n.1-2, Sep, p.39-50. 2001.

Weimer, T. L., A. P. Reddy, U. Harttig, D. Alexander, S. C. Stamm, M. R. Miller, W. Baird, J. Hendricks e G. Bailey. Influence of beta-naphthoflavone on 7,12-dimethylbenz(a)anthracene metabolism, DNA adduction, and tumorigenicity in rainbow trout. Toxicol Sci, v.57, n.2, Oct, p.217-28. 2000.

Wen, Z., S. Rupasinghe, G. Niu, M. R. Berenbaum e M. A. Schuler. CYP6B1 and CYP6B3 of the black swallowtail (*Papilio polyxenes*): adaptive evolution through subfunctionalization. Mol Biol Evol., v.23, n.12, p.2434-43. 2006.

Werck-Reichhart, D. e R. Feyereisen. Cytochromes P450: a success story. Genome Biol, v.1, n.6, p.REVIEWS3003. 2000.

Whitlock, J. P., Jr. Induction of cytochrome P4501A1. Annu Rev Pharmacol Toxicol, v.39, p.103-25. 1999.

Wirgin, I. e J. R. Waldman. Resistance to contaminants in North American fish populations. Mutat Res, v.552, n.1-2, Aug 18, p.73-100. 2004.

Zhang, X., F. Yang, Y. Xu, T. Liao, S. Song e J. Wang. Induction of hepatic enzymes and oxidative stress in Chinese rare minnow (*Gobiocypris rarus*) exposed to waterborne hexabromocyclododecane (HBCDD). Aquat Toxicol, v.86, n.1, Jan 20, p.4-11. 2008.