

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

MARÍLIA NARDELLI SIEBERT

**Efeito de ligantes dos receptores nucleares PXR e VDR na
expressão de genes de biotransformação no fígado e intestino de
peixes *Danio rerio*.**

Florianópolis
2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

MARÍLIA NARDELLI SIEBERT

**Efeito de ligantes dos receptores nucleares PXR e VDR na
expressão de genes de biotransformação no fígado e intestino de
peixes *Danio rerio*.**

Orientador: Prof. Dr. Afonso Celso Dias Bainy

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Bioquímica da
Universidade Federal de Santa Catarina
como requisito parcial para a obtenção do
título de Mestre em Bioquímica.

Florianópolis

2010

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer em especial às instituições e pessoas que diretamente viabilizaram a realização desse trabalho e às pessoas que indiretamente colaboraram:

Ao Afonso Celso Dias Bainy, pela oportunidade de trabalhar no laboratório, pela orientação e pela confiança nesses 6 anos.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e ao Roberto, secretário do Programa.

Aos membros da banca, por aceitarem ler e corrigir a dissertação.

À CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, e ao CNPQ, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo provimento, não simultâneo, da bolsa de mestrado.

À Isabel e ao Guilherme por dividirem as angústias e as aprendizagens do real-time nos últimos dois anos.

Ao Jacó, por ter compartilhado todos os momentos deste trabalho, desde o surgimento da idéia até sua realização e conclusão. Por aceitar me ajudar mesmo quando não o chantageava, por não reclamar da minha música enquanto escrevíamos, pelo seu humor (ou mau humor?) negro e irônico quase constante e por compartilhar também os meus amigos imaginários que surgiram nesses dois anos.

À Karim, pela total disponibilidade em me ajudar com peixes, compras, galões de nitrogênio e outros imprevistos que surgiram e, principalmente, pela parceria e amizade.

Ao povo do LABCAI: Ana, Bel, Daniela, Juliana, Karim, Maya, Talita, Gui, Fabrício, Igor, Pedro, Ninna, Flávia, Juliano, Cris, Tarquim e Jacó, pela companhia e

ajuda no dia-a-dia, por tornarem os momentos de trabalhos muito mais divertidos, pela companhia em *happy-hours* e pelos anos de amizade. Além disso, agradeço aqueles que por repetidas vezes fizeram papel de faxineiros, pedreiros, motoristas, carregadores, telefonistas e tantas outras funções, deixando o sonho de cientista de lado, assim como suas teses, dissertações e trabalhos de conclusão, para ficar no *backstage* do laboratório e permitir com que o show continuasse.

Às meninas Mari(a), Mari(e), Mila, Cris e Laura pelos encontros (mais raros) nos últimos 2 anos e por entenderem o meu problema com emails.

Finalmente (e principalmente), agradeço à minha família. Aos meus irmãos, Elen, Diogo e Adri, pela cumplicidade e todos os extras que a acompanham. Um agradecimento especial para Elen, por ter aceitado trazer um computador do velho mundo, possibilitando que eu finalizasse a minha dissertação em segurança. E aos meus pais, Udo e Carmem, pela dedicação, confiança e incentivo incondicionais.

RESUMO

O receptor de Vitamina D (VDR) e o receptor Pregnano X (PXR) são receptores nucleares e agem como fatores de transcrição quando ativados pela ligação de moléculas específicas. *PXR* e *VDR* possivelmente se originaram da duplicação de um gene ancestral. Em mamíferos, esses receptores compartilham um número de genes alvos e dividem a função de mediação da resposta de detoxificação de xenobióticos. O objetivo deste trabalho foi analisar o efeito de agonistas dos receptores nucleares *PXR* e *VDR* na expressão de genes de biotransformação de xenobióticos em peixes da espécie *Danio rerio*. Para isso, 48 horas após o tratamento de peixes *D.rerio* com agonistas específicos para estes receptores, foi analisada a expressão hepática e intestinal dos genes *CYP3A65*, *CYP3C1*, *CYP24*, *CYP2AA1*, *CYP2AA2*, *GSTα*, *GSTπ*, *ABCB5*, *VDRα* e *PXR*. Os agonistas utilizados foram 1α,25-diidroxivitamina D3, como ativador do *VDR*, e 5-Pregnen-3β-ol-20-ona, como ativador do *PXR*. A análise da expressão dos genes foi feita através da técnica de RT-PCR em tempo real, utilizando o método delta-delta Ct. A expressão da *β-actina* foi utilizada para normalizar os dados. Ambos ligantes induziram genes da fase I, II e III do processo de biotransformação em peixes, no intestino e no fígado. A pregnenolona aumentou a expressão de *CYP3A65*, *CYP3C1*, *CYP2AA1*, *CYP2AA2*, *GSTα*, *GSTπ*, *ABCB5* e *PXR* no fígado e *CYP3A65*, *CYP3C1*, *CYP2AA1*, *CYP2AA2*, *GSTα*, *GSTπ* e *PXR* no intestino dos peixes, o que sugere um importante papel do *PXR* como mediador da biotransformação em peixes desta espécie. Além disso, 1α,25-diidroxivitamina D3 aumentou a expressão dos genes *CYP24*, *CYP3C1*, *CYP2AA1*, *CYP2AA2*, *GSTπ* e *PXR* no fígado e *CYP24*, *CYP2AA1*, *CYP2AA2*, *GSTα*, *GSTπ* e *PXR* no intestino dos peixes. Até então, não havia sido demonstrado o efeito do hormônio derivado da vitamina D na expressão de genes envolvidos no processo de biotransformação em peixes. Os resultados obtidos neste trabalho suportam a hipótese de que os dois receptores da família NR1I, *PXR* e *VDR*, compartilham a mediação na resposta de detoxificação em peixes, assim como em mamíferos.

Palavras-chave: Biotransformação; *Danio rerio*; Receptor Pregnano X; Receptor de Vitamina D.

ABSTRACT

The Vitamin D Receptor (VDR) and the Pregnane X Receptor (PXR) are members of the nuclear hormone receptor superfamily, acting as transcription factors when activated by specific molecules. VDR and PXR are thought to have arisen from duplication of an ancestral gene and in mammals they show considerable overlap in target gene regulation, sharing the function of modulators of xenobiotic response. In the present study, the ability of VDR and PXR agonists to induce biotransformation gene expression in *Danio rerio* was assessed *in vivo*. *D. rerio* were treated with PXR and VDR agonists, 5-Pregnen-3 β -ol-20-one and 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ respectively, and 48h after treatment the expression of *CYP3C1*, *CYP3A65*, *CYP24*, *CYP2AA1*, *CYP2AA2*, *GST α* , *GST π* , *ABCB5*, *PXR* and *VDR α* mRNA were analyzed by quantitative RT-PCR. Gene expression was analyzed with delta-delta Ct method and *β -actin* expression was used to normalize data. The effects of VDR and PXR agonists on biotransformation gene expression were demonstrated in fish. Both ligands showed an inductive effect in the expression of phase I, II and III biotransformation genes in *D. rerio*. Pregnenolone induced *CYP3C1*, *CYP3A65*, *CYP2AA1*, *CYP2AA2*, *GST α* , *GST π* , *ABCB5* and *PXR* in liver and *CYP3C1*, *CYP3A65*, *CYP2AA1*, *CYP2AA2*, *GST α* , *GST π* and *PXR* in intestine. Calcitriol induced *CYP3C1*, *CYP24*, *CYP2AA1*, *CYP2AA2*, *GST π* and *PXR* gene expression in liver, while in intestine it induced *CYP24*, *CYP2AA1*, *CYP2AA2*, *GST α* , *GST π* and *PXR* expression. These results suggest that both receptors of NR1I family, PXR and VDR, share the function of modulation of detoxification genes in *D. rerio*. Moreover, the data support the hypothesis that regulation of gene expression by PXR and VDR is conserved among mammals and fish.

Key words: Biotransformation; *Danio rerio*; Pregnane X Receptor; Vitamin D Receptor.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema da estrutura de um receptor nuclear demonstrando os domínios comuns a esses receptores: A/B, C, D, E e F. O domínio C é o domínio de ligação ao DNA (DBD) e o domínio E é o domínio de ligação ao ligante (LBD) (Adaptado de RASTINEJAD, 2001). 16
- Figura 2.** Mecanismo de regulação da expressão gênica intermediada pelo receptor PXR. Após a ativação pelo ligante, o PXR heterodimeriza com o receptor retinóide X (RXR). Este complexo interage com os elementos de resposta localizados na região promotora de genes alvos, como o *CYP3A*, e altera a expressão gênica. No exemplo, o aumento da expressão gênica culminou com um aumento de *CYP3A* e a enzima teve como substrato o próprio ligante do PXR, que normalmente é um composto lipofílico endógeno ou um xenobiótico (Adaptado de WILSON; KLIEWER, 2002). 17
- Figura 3.** Mecanismo de regulação da expressão gênica intermediada pelo receptor de vitamina D (VDR) ativado pelo calcitriol ou $1\alpha, 25(\text{OH})_2 \text{D}_3$. A ativação pelo calcitriol induz a heterodimerização do VDR com o receptor retinóide X (RXR). Este complexo interage com os elementos de resposta a vitamina D (VDRE) do DNA e com co-reguladores (CoReg, B), alterando a transcrição dos genes alvos realizada pela enzima RNA polimerase II (RNA Pol II) (Adaptado de DUSSO, 2003). 21
- Figura 4.** Exemplo de delimitação de limiar e determinação do valor de Ct. Dados típicos de uma reação de PCR em tempo real com 40 ciclos. O ponto em que a curva encontra o limiar (linha horizontal vermelha) é o Ct. No exemplo o Ct é 22,5 (Fonte: SCHMITTGEN; LIVAK, 2008). 27
- Figura 5.** Curva de dissociação dos produtos de PCR. Cada curva representa a dissociação do produto de PCR de um par de iniciadores. Da esquerda para a direita, as curvas representam os produtos de amplificação dos iniciadores específicos para os genes: **A.** *CYP3C1*, *CYP24*, *CYP3A65*; **B.** *CYP2AA2*, *CYP2AA1*; **C.** *GSTα*, *GSTπ*, *ABCB5*; **D.** *VDRα*, *PXR*; **E.** *ACT*, *GAPDH*; **F.** *28S*. 40
- Figura 6.** Expressão dos genes *28S*, *ACT* e *GAPDH* no fígado de peixe *D. rerio* (n=8), 48 horas após injeção de óleo de milho (grupo controle, CT), calcitriol (VD) e pregnenolona (PG). Diferenças estatísticas em relação ao grupo controle são marcadas com um asterisco (*), $p < 0.05$ 42
- Figura 7.** Expressão dos genes *28S*, *ACT* e *GAPDH* no intestino de peixe *D. rerio* (n=8), 48 horas após injeção de óleo de milho (CT), calcitriol (VD) ou pregnenolona (PG). Diferenças estatísticas em relação ao grupo controle são marcadas com um asterisco (*), $p < 0.05$ 43
- Figura 8.** Expressão dos genes *CYP24*, *CYP3A65* e *CYP3C1* no fígado de peixe *D. rerio*, normalizada pela expressão do gene *ACT* e em relação ao grupo controle, 48 horas após injeção de óleo de milho (grupo controle, em branco), calcitriol (cinza) ou pregnenolona (preto). Diferenças estatísticas em relação ao grupo controle são marcadas com um asterisco (*), $p < 0.05$ 44
- Figura 9.** Expressão dos genes *CYP2AA1* e *CYP2AA2* no fígado de peixe *D. rerio*, normalizada pela expressão do gene *ACT* e em relação ao grupo controle, 48 horas após injeção de óleo de milho (grupo controle, em branco), calcitriol (cinza) ou pregnenolona (preto). Diferenças estatísticas em relação ao grupo controle são marcadas com um asterisco (*), $p < 0.05$ 45
- Figura 10.** Expressão dos genes *GSTα*, *GSTπ* e *ABCB5* no fígado de peixe *D. rerio*, normalizada pela expressão do gene *ACT* e em relação ao grupo controle, 48 horas após injeção de óleo de milho (grupo controle, em branco), calcitriol (cinza) ou pregnenolona (preto). Diferenças estatísticas em relação ao grupo controle são marcadas com um asterisco (*), $p < 0.05$ 46

- Figura 11.** Expressão dos genes *VDRα* e *PXR* no fígado de peixe *D. rerio*, normalizada pela expressão do gene *ACT* e em relação ao grupo controle, 48 horas após injeção de óleo de milho (grupo controle, em branco), calcitriol (cinza) ou pregnenolona (preto). Diferenças estatísticas em relação ao grupo controle são marcadas com um asterisco (*), $p < 0.05$ 46
- Figura 12.** Expressão dos genes *CYP24A*, *CYP3A65* e *CYP3C1* no intestino de peixe *D. rerio*, normalizada pela expressão do gene *ACT* e em relação ao grupo controle, 48 horas após injeção de óleo de milho (grupo controle, em branco), calcitriol (cinza) ou pregnenolona (preto). Diferenças estatísticas em relação ao grupo controle são marcadas com um asterisco (*), $p < 0.05$ 47
- Figura 13.** Expressão dos genes *CYP2AA1* e *CYP2AA2* no intestino de peixe *D. rerio*, normalizada pela expressão do gene *ACT* e em relação ao grupo controle, 48 horas após injeção de óleo de milho (grupo controle, em branco), calcitriol (cinza) ou pregnenolona (preto). Diferenças estatísticas em relação ao grupo controle são marcadas com um asterisco (*), $p < 0.05$ 47
- Figura 14.** Expressão dos genes *GSTα*, *GSTπ* e *ABCB5* no intestino de peixe *D. rerio*, normalizada pela expressão do gene *ACT* e em relação ao grupo controle, 48 horas após injeção de óleo de milho (grupo controle, em branco), calcitriol (cinza) ou pregnenolona (preto). Diferenças estatísticas em relação ao grupo controle são marcadas com um asterisco (*), $p < 0.05$ 48
- Figura 15.** Expressão dos genes *VDRα* e *PXR* no intestino de peixe *D. rerio*, normalizada pela expressão do gene *ACT* e em relação ao grupo controle, 48 horas após injeção de óleo de milho (grupo controle, em branco), calcitriol (cinza) ou pregnenolona (preto). Diferenças estatísticas em relação ao grupo controle são marcadas com um asterisco (*), $p < 0.05$ 49
- Figura 16.** Efeito do calcitriol na expressão de genes no fígado e no intestino de *D. rerio*. Os números que acompanham os genes indicam quantas vezes o gene teve sua expressão aumentada 48 horas após o tratamento com o hormônio..... 49
- Figura 17.** Efeito da pregnenolona na expressão de genes no fígado e no intestino de *D. rerio*. Os números que acompanham os genes indicam quantas vezes o gene teve sua expressão aumentada 48 horas após o tratamento com o hormônio. 50

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Dados dos iniciadores dos genes *CYP3A65*, *CYP3C1*, *CYP24*, *CYP2AA1*, *CYP2AA2*, *GST α* , *GST π* , *ABCB5*, *PXR*, *VDR α* , *28S*, *ACT* e *GAPDH* da espécie de peixe *D. rerio*. 32
- Tabela 2.** Padronização das condições de PCR em tempo real para os genes *CYP3A65*, *CYP3C1*, *CYP24*, *CYP2AA1*, *CYP2AA2*, *GST α* , *GST π* , *ABCB5*, *PXR*, *VDR α* , *28S*, *ACT* e *GAPDH* de fígado de *D. rerio*. Os dados da curva de cDNA foram obtidos em reações de PCR com 1, 10, 100, 200, 500 e 1000ng por reação. 41
- Tabela 3.** Padronização das condições de PCR em tempo real para os genes *CYP3A65*, *CYP3C1*, *CYP24*, *CYP2AA1*, *CYP2AA2*, *GST α* , *GST π* , *ABCB5*, *PXR*, *VDR α* , *28S*, *ACT* e *GAPDH* de intestino de *D. rerio*. Os dados da curva de cDNA foram obtidos em reações de PCR com 1, 10, 100, 200, 500 e 1000ng por reação. 41
- Tabela 4.** Expressão de genes no fígado e intestino de peixe da espécie *D. rerio*, 48 horas após tratamento com calcitriol (VD) e pregnenolona (PG). A expressão de cada gene está representada quando ocorreu uma alteração em relação ao grupo controle e os valores de p são referentes ao teste *t* de Student entre grupo tratado e grupo controle. Espaços em branco indicam ausência de diferença estatística entre o grupo tratado e controle..... 50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

18S	RNA ribossomal 18S
1α, 24, 25(OH)₃ D3	1 α , 24, 25-triidroxivitamina D3
1α,25(OH)₂ D3	1 α ,25-diidroxivitamina D3 ou calcitriol
28S	RNA ribossomal 28S
ABC	seqüência de ligação de ATP (<i>ATP-binding cassette</i>)
ACT	β -actina
AH	hidrocarbonetos aromáticos
ARE	elemento de resposta a antioxidantes
ATP	Trifosfato de adenosina
BXR	Receptor de Benzoato X
CAR	Receptor Androstano Constitutivo
cDNA	DNA complementar
Ct	Ciclo limiar (<i>threshold cycle</i>)
CXR	Receptor X de Frango
CYPp450	citocromo p450
DBD	Domínio de Ligação ao DNA (<i>DNA binding domain</i>)
DDT	Dicloro-Difenil-Tricloroetano
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
DR3	Repetições Diretas separadas por 3 nucleotídeos
dT	Desoxitimidina
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
FXR	Receptor de Farnesóide X

GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GC	Guanosina e Citidina
GST	Glutathione S-transferase
LBD	Domínio de ligação ao ligante (<i>Ligand binding domain</i>)
MDR	Resistência à multidrogas
MgCl₂	Cloreto de Magnésio
MRP2	Proteína relacionada à resistência a multidrogas 2
MXR	Resistência a multixenobióticos
NR	Receptor nuclear (<i>nuclear receptor</i>)
OATP2	Proteína transportadora de ânions orgânicos 2
PAH	Hidrocarbonetos poliaromáticos
PCB	Bifenilas policlorados
PCN	Pregnenolona 16 α -carbonitrilo
PCR	Reação em cadeia da polimerase
P-gp	Glicoproteína P
PXR	Receptor Pregnano X
PXRE	Elemento de resposta a Pregnano X
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
qRT-PCR	PCR quantitativa de transcrição reversa
RN	Receptor Nuclear
RNA	Ácido Ribonucléico
RNA Pol II	Polimerase de ácido ribonucléico II
RNA_m	RNA mensageiro
rRNA	RNA ribossomal
RXR	Receptor retinóide X

SULT	Sulfotransferase
SXR	Receptor de xenobióticos e esteróides
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TCPOBOP	3,3',5,5'-Tetracloro-1,4-bis(piridiloxi)benzeno
Tm	Temperatura de dissociação (<i>Melting temperature</i>)
UDPGT	Uridina difosfoglucuronosiltransferase
UV	Ultravioleta
VDR	Receptor de Vitamina D
VDRE	Elemento de resposta a Vitamina D

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1. Receptores Nucleares	14
1.2. Receptor Pregnano X	16
1.3. Receptor de Vitamina D	20
1.4. Biotransformação	23
1.5. PCR quantitativo	26
2. OBJETIVOS	29
3. METODOLOGIA	30
3.1. Obtenção dos animais	30
3.2. Tratamento do material biológico	30
3.3. Desenho dos iniciadores	31
3.4. Extração de RNA total	33
3.5. Tratamento com DNase e síntese do cDNA	34
3.6. RT-PCR quantitativa	35
3.6.1. <i>Padronização das condições</i>	35
3.6.2. <i>Análise das amostras</i>	37
3.6.3. <i>Análise dos resultados</i>	38
4. RESULTADOS	39
4.1. Padronização das condições de RT-qPCR	39
4.2. Análise dos genes constitutivos	39
4.3. Expressão gênica no fígado de <i>D. rerio</i>	44
4.4. Expressão gênica no intestino de <i>D. rerio</i>	46
5. DISCUSSÃO	51
5.1. Padronização da RT-PCR quantitativa	51
5.2. Expressão de genes do processo de biotransformação	52
5.2.1. <i>Genes de fase I</i>	52
5.2.2. <i>Genes de fase II e III</i>	58
5.2.3. <i>Genes de receptores nucleares</i>	60
5.3. Os ligantes dos receptores nucleares VDR e PXR	62
5.4. VDR e PXR: origem e função	64

6.	CONCLUSÕES	66
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

1. INTRODUÇÃO

1.1. Receptores Nucleares

A capacidade das células de receber e responder sinais é fundamental para a vida. Células animais trocam informações sobre concentrações de íons e glicose nos fluidos extracelulares, sobre vias metabólicas interdependentes que ocorrem em tecidos diferentes ou sobre a correta localização celular durante o desenvolvimento. Em todos esses casos, o sinal representa uma informação do meio externo que é detectada por receptores específicos e convertido em uma resposta celular. Dessa forma, os receptores têm um papel crucial na sobrevivência celular, pois integram sinais externos à resposta celular, adequando a célula às condições do meio e contribuindo para a manutenção da homeostase de todo o organismo.

Parte dos receptores que recebem sinais do meio externo agem no núcleo da célula, regulando a expressão gênica. Esses receptores são denominados receptores nucleares (RN). A regulação exercida pelos receptores nucleares influencia processos como a homeostase, diferenciação celular, desenvolvimento embrionário e neurogênese (SCHOTE et al., 2007).

Os RN formam uma superfamília que é dividida em 6 grupos gerais, dentre eles, a família dos receptores esteróides é a mais bem estudada, compreendendo receptores de estrógeno, glicocorticóides e progesterona. Os receptores nucleares também incluem os receptores de hormônios da tireóide, de vitamina D, receptor retinóide X e receptor pregnano X (PEARCE et al., 2004).

Os RN não estão presentes em plantas e leveduras, mas são componentes essenciais das células animais. Em mamíferos, a superfamília dos receptores nucleares é composta por aproximadamente 50 genes funcionais, sendo encontrados 48 em humanos, 47 em ratos e 49 em camundongos (KARPEN; TRAUNER, 2009). No genoma do peixe *Fugu rubripes*, foram identificados 68 seqüências diferentes de receptores nucleares. Comparando-se aos receptores nucleares humanos, todos os receptores de *Fugu rubripes* apresentam uma grande

homologia em termos das subfamílias de receptores, mas não em termos da quantidade de receptores em cada família (MAGLICH et al., 2003).

Os RN agem como fatores de transcrição ativados pela ligação específica de moléculas lipofílicas como hormônios, ácidos graxos, ácidos biliares, oxiesteróis e xeno e endobióticos (MAGLICH et al., 2001). Quando interagem com seus ligantes, os RN são ativados e sofrem uma mudança conformacional que permite que eles se desloquem ao núcleo e alterem a expressão de genes alvos na forma de monômeros, homodímeros ou heterodímeros, que podem ser formados com o receptor retinóide X (RXR, NR2B1). A alteração na expressão gênica ocorre através da interação dos receptores com seqüências específicas de DNA, denominadas de elementos responsivos, que normalmente estão localizadas nas regiões 5' flanqueadoras dos genes alvos (ARANDA; PASCUAL, 2001; MÉTIVIER; REID; GANNON, 2006).

Além disso, os receptores nucleares têm sua função complementada através do recrutamento de fatores celulares definidos como co-reguladores. Estes fatores podem ser divididos em co-ativadores, os quais ativam a transcrição gênica quando recrutados, e co-repressores, que agem atenuando ou inibindo a transcrição (McKENNA; O'MALLEY, 2002). Na maioria das vezes, quando não ativos, os receptores nucleares formam complexos físicos com os co-repressores. A ativação do receptor induz a uma mudança conformacional que leva a dissociação do co-repressor e ao posterior recrutamento de coativadores, o que permite a ligação do complexo à seqüência alvo no DNA. A especificidade na formação do complexo receptor/co-regulador é responsável pela sensibilidade da resposta biológica desencadeada pela interação ligante-receptor, o que aumenta a variabilidade de respostas gênicas a diferentes ligantes (GUREVICH; FLORES; ANESKIEVICH, 2007).

A estrutura organizacional desses receptores é, em geral, semelhante (**Figura 1**). A região N-terminal (domínio A/B) é muito variável e contém pelo menos uma região de transativação (AF-1), que confere uma função de ativação da transcrição independente de um ligante. Esse domínio possui tamanho variável entre 50 e 500 aminoácidos (ROBINSON-RECHAVI; GARCIA; LAUDET, 2003). O domínio C é o domínio de ligação ao DNA (DBD-*DNA Binding Domain*), uma região altamente conservada que possui dois dedos de zinco (*zinc fingers*) e duas α -hélices, sendo uma dessas hélices a mediadora do reconhecimento de seqüências específicas de

DNA. O DBD apresenta 66 aminoácidos altamente conservados e está localizado centralmente em cada receptor (RASTINEJAD, 2001). Entre o domínio de ligação ao DNA (domínio C) e o de ligação ao ligante (domínio E), existe o domínio D, uma região menos conservada que age como uma dobradiça entre os domínios C e E (ROBINSON-RECHAVI; GARCIA; LAUDET, 2003). A porção C-terminal apresenta o domínio de ligação ao ligante (LBD – *Ligand Binding Domain*), o domínio E, que interage diretamente com os ligantes e possui a região de transativação AF-2, que é dependente de ligante (MAGLICH et al., 2003).



Figura 1. Esquema da estrutura de um receptor nuclear demonstrando os domínios comuns a esses receptores: A/B, C, D, E e F. O domínio C é o domínio de ligação ao DNA (DBD) e o domínio E é o domínio de ligação ao ligante (LBD) (Adaptado de RASTINEJAD, 2001).

A mudança de conformação da LBD, causada pela interação com o ligante, determina a atividade do receptor em um determinado contexto celular. Os receptores nucleares podem conter ainda um domínio F, na região C-terminal, com sequência variável e com estrutura e função desconhecida.

1.2. Receptor Pregnano X

O receptor pregnano X (PXR, NR1I2), também denominado receptor de esteróide e xenobiótico (SXR), faz parte da subfamília dos receptores nucleares NR1I (NRNC, 1999), da qual também fazem parte o Receptor Vitamina D (VDR), o Receptor Androstano Constitutivo (CAR) e o Receptor Benzoato X (BXR). O PXR foi primeiramente denominado por Kliewer e colaboradores (1998), que levaram em consideração a eficiente ativação deste receptor por esteróides C₂₁ naturais ou pregnanos.

Em sua configuração ativa, o receptor PXR forma um heterodímero com RXR (NR2B1) sendo então translocado para o núcleo onde se liga ao DNA em elementos responsivos, por exemplo, o elemento formado por duas regiões consensos organizadas como repetições diretas separadas por 3 nucleotídeos (DR3) (**Figura 2**) (KLIEWER et al., 1998).

Em mamíferos, o PXR é definido como um receptor de xenobióticos devido a sua habilidade de reconhecer inúmeros sinais químicos e por regular a expressão de genes de enzimas metabolizadoras de drogas e de proteínas transportadoras. Dessa forma, a ativação do PXR possibilita uma resposta adaptativa para prevenir o acúmulo de substâncias tóxicas no interior das células (WADA; GAO; XIE, 2009).

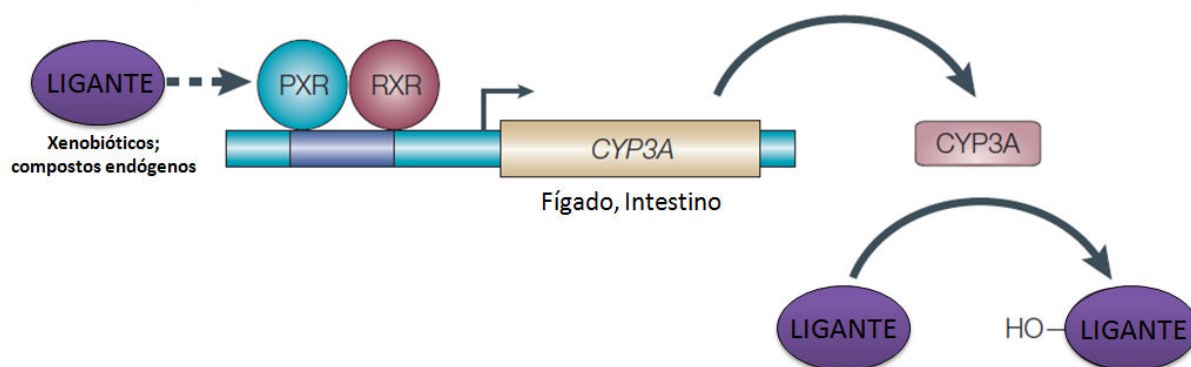


Figura 2. Mecanismo de regulação da expressão gênica intermediada pelo receptor PXR. Após a ativação pelo ligante, o PXR heterodimeriza com o receptor retinóide X (RXR). Este complexo interage com os elementos de resposta localizados na região promotora de genes alvos, como o *CYP3A*, e altera a expressão gênica. No exemplo, o aumento da expressão gênica culminou com um aumento de *CYP3A* e a enzima teve como substrato o próprio ligante do PXR, que normalmente é um composto lipofílico endógeno ou um xenobiótico (Adaptado de WILSON; KLIEWER, 2002).

A estrutura do PXR é similar a de outros receptores nucleares, com o DBD altamente conservado. Mas, em contraste com a alta especificidade de ligação encontrada na maioria dos receptores nucleares, o PXR apresenta uma adaptabilidade a diversos ligantes, que é explicada pela flexibilidade apresentada no LBD. Em humanos, o receptor PXR possui uma cavidade de ligação grande e esférica que pode acomodar uma ampla variedade de ligantes lipofílicos. A expansão desta cavidade é causada primariamente por uma inserção de 50-60 aminoácidos entre as hélices 1 e 3 na sequência do receptor. Esta inserção é

responsável pela conformação contendo 2 folhas β que efetivamente afastam a hélice 6, uma das α -hélices que normalmente alinha a cavidade de ligação, causando sua expansão (WATKINS et al., 2001).

Estas características estruturais tornam o PXR um receptor promíscuo, que pode ser ativado por uma ampla variedade de compostos endógenos, como o ácido litocólico, e exógenos naturais e sintéticos, como a rifamicina, pregnenolona 16 α -carbonitrila (PCN), clotrimazol e dexametasona (MOORE; KLIEWER, 2000). Os compostos que ativam o PXR podem apresentar efeitos tóxicos quando acumulados em altos níveis, como é o caso dos hormônios, ácidos biliares, carcinógenos, fármacos, assim como certas moléculas da dieta e poluentes ambientais.

Além da promiscuidade de ligação, o envolvimento do PXR na proteção contra compostos potencialmente tóxicos também se deve ao fato dele regular coordenadamente um conjunto de genes envolvidos no metabolismo, transporte e eliminação dessas moléculas do organismo, como as isoformas das enzimas do citocromo P450 (CYP2B, CYP2C8/9, CYP3A e CYP7A1), que são enzimas da fase I do processo de biotransformação (KLIEWER et al., 1998; XIE et al., 2000; STAUDINGER et al., 2001; SYNOLD; DUSSALT; FORMAN, 2001;); enzimas de fase II: Glutathione S-transferase (GST), sulfotransferases (SULTs), uridina difosfoglucuronosiltransferase (UDPGT) (ROSENFELD et al., 2003; ZHOU; ZHANG; XIE, 2005) e proteínas de fase III como a de resistência a multidrogas 1 (MDR1) (GEICK; EICHELBAUM; BURK, 2001; SYNOLD; DUSSALT; FORMAN, 2001), proteína transportadora de ânions orgânicos 2 (OATP2) (STAUDINGER et al., 2001) e proteína relacionada a resistência a multidrogas 2 (MRP 2) (DUSSAULT et al., 2001), além de outros genes (MAGLICH et al., 2002).

Outra característica do PXR é que ele apresenta uma grande variabilidade de sequência entre as espécies, principalmente no LBD. Essa variabilidade possivelmente ocorre devido à função deste receptor em detectar compostos tóxicos endógenos e exógenos. O contato com esses compostos varia de uma espécie para outra, acarretando diferentes pressões de seleção para esse gene (KRASOWSKI et al., 2005).

A habilidade do PXR em se ligar a vários compostos, incluindo esteróides e desreguladores endócrinos químicos como nonilfenol, metoxicloro e DDT, protege a integridade do sistema endócrino, devido à indução de genes das vias de detoxificação (KRETSCHMER; BALDWIN, 2005). Por outro lado, o PXR induz a

transcrição de genes envolvidos no metabolismo de hormônios endógenos, assim, sua ativação pode causar uma alteração no sistema endócrino do organismo e representar uma via indireta para a desregulação endócrina (MIKAMO et al., 2003).

O PXR tem sido mais estudado em mamíferos, particularmente em humanos (LEHMANN et al., 1998), chimpanzé (MOORE et al., 2002), rato (ZHANG et al., 1998), camundongo (KLIEWER et al., 1998) e coelho (JONES et al., 2000). Outros receptores relacionados ao PXR de mamíferos foram identificados em frangos e denominados CXR - *Chicken X receptor* (HANDSCHIN; PODVINEC; MEYER, 2000) e em *Xenopus laevis*, denominados de BXR - *Benzoate X receptor* (BLUMBERG et al., 1998).

Dentre as espécies de peixe que possuem o gene de PXR clonado, estão peixe-zebra (*Danio rerio*) (BAINY; STEGEMAN, 2004), *fathead minnow* (*Pimephales promelas*), baiacu (*Takifugu rubripes*) e medaka (*Oryzias latipes*) (MILNES et al., 2008).

A sequência completa do PXR de *D. rerio* contém 1290 nucleotídeos que codificam para 430 aminoácidos (BAINY; STEGEMAN, 2004). A sequência de aminoácidos deduzida apresenta 47, 47, 46 e 45% de identidade aos homólogos de humano, macaco, camundongo e coelho, respectivamente.

Em peixes-zebra adultos, o gene PXR é expresso no fígado, rim, ovário, intestino, testículos, brânquias, baço e coração, além disso, esse gene é expresso nos estágios iniciais de desenvolvimento dessa espécie, o que sugere que este receptor desempenhe um papel durante o desenvolvimento (BAINY; STEGEMAN, 2004). Até o momento, existem poucos trabalhos funcionais com PXR em peixes. Bresolin, Rebelo e Baily (2005) demonstraram que o tratamento com um ativador do PXR de mamíferos, pregnenolona 16 α -carbonitrila (PCN), aumentou a expressão dos genes PXR, CYP3A e ABCB5 no fígado de *D. rerio*, o que sugere uma associação intrínseca entre esses três genes no peixe-zebra e que o PXR possivelmente regula a expressão dos genes CYP3A e ABCB5 em peixes-zebra, assim como já previamente demonstrado em mamíferos, indicando a existência de uma conservação evolutiva deste mecanismo.

1.3. Receptor de Vitamina D

O receptor de Vitamina D (NR1I1, VDR) pertence à subfamília NR1I dos receptores nucleares (GERMAIN et al., 2006). Dentro da superfamília de receptores nucleares, o receptor pregnano X é o mais próximo do receptor de vitamina D (BERTRAND et al., 2004), apresentando identidade de 40% na sequência de aminoácidos.

O receptor nuclear VDR atua como um fator de transcrição, ligando-se a 1α , 25-dihidroxitamina D3 ($1\alpha,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$) ou calcitriol, que é a forma fisiologicamente ativa da vitamina D3. Em mamíferos, a vitamina D3 é sintetizada na pele ou obtida através da alimentação. Na pele, a exposição a raios ultravioleta levam a conversão fotolítica de 7-deidrocolesterol a pré-vitamina D3 que é isomerizada a vitamina D3 (DUSSO, 2003). Em peixes, a vitamina D3 é obtida principalmente através da alimentação de fito e zooplâncton. Os peixes podem sintetizar vitamina D3, mas, diferentemente dos mamíferos, a maior parte dessa vitamina sintetizada não envolve uma reação fotoquímica, mas reações independentes da luz que ocorrem no fígado (BLONDIN; KULKARNI; NES, 1964). Um dos prováveis motivos da baixa produção da vitamina D3 por reações fotoquímicas nos peixes é que a maior parte de raios ultravioleta do tipo B, responsável pela conversão do 7-deidrocolesterol em vitamina D3, é absorvida nos primeiros metros da coluna de água (HOLICK, 2003).

No fígado, a vitamina D3 é hidroxilada a 25-hidroxitamina D3 pela enzima citocromo p450 C27 (CYPC27) e no rim essa molécula é hidroxilada a 1α , 25-dihidroxitamina D3 pela enzima citocromo p450 1α (CYP1 α). O metabólito é transportado na corrente sanguínea associado à proteína ligante de vitamina D. Desta maneira, a forma ativa da vitamina D se distribui pelo corpo, entrando nas células e ligando-se ao receptor de vitamina D (LIPS, 2006; HOLICK, 1999).

Quando o VDR se liga ao ligante, ocorre a translocação do receptor do citosol para o núcleo, onde ele heterodimeriza com o RXR (**Figura 3**). Este complexo se liga a sequências específicas da região promotora de genes alvos, denominadas como elementos de resposta a vitamina D (VDRE). O complexo recruta fatores de transcrição e co-reguladores que aumentam ou suprimem a taxa de transcrição realizada pela RNA polimerase II (DUSSO, 2003).

A vitamina D3 é associada à manutenção da homeostase do cálcio e do fósforo no corpo. Esse papel é exercido por intermédio do VDR, que apresenta uma função central na regulação da homeostase do cálcio e fósforo, mineralização e reabsorção óssea e síntese do hormônio da paratireóide. Para exercer tais funções, o VDR atua no intestino, ossos, rins e glândula paratireóide. No intestino, o VDR é ativado pela $1\alpha, 25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ e regula a absorção intestinal de cálcio e fósforo; nos ossos, regula a liberação e a mineralização destas moléculas; nos rins, estimula a sua reabsorção; na glândula da paratireóide, influencia a síntese do hormônio da paratireóide. O hormônio da paratireóide está envolvido na ativação do CYP 1α nos rins quando os níveis de cálcio do sangue estão baixos (WHITFIELD et al., 2005).

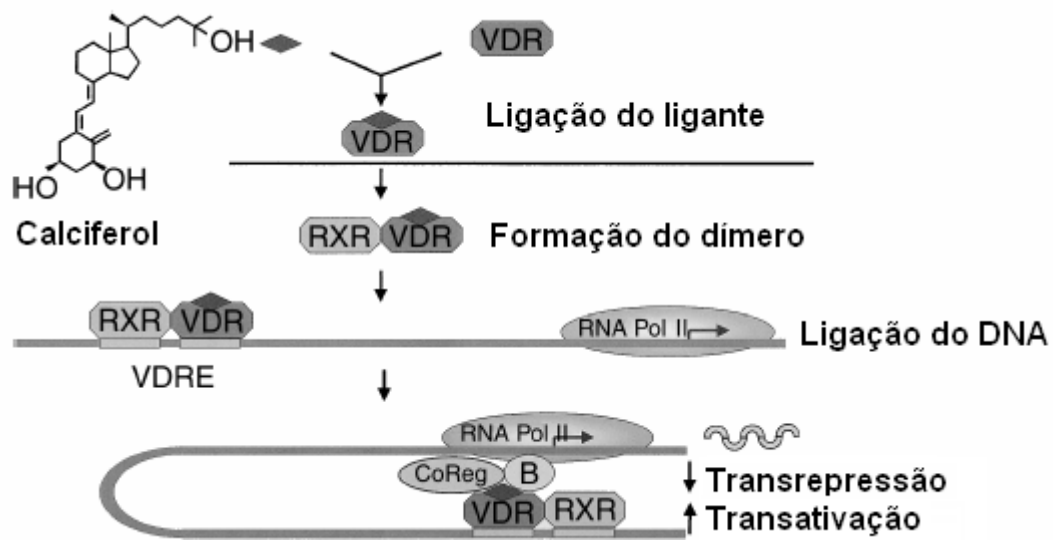


Figura 3. Mecanismo de regulação da expressão gênica intermediada pelo receptor de vitamina D (VDR) ativado pelo calcitriol ou $1\alpha, 25(\text{OH})_2 \text{D}_3$. A ativação pelo calcitriol induz a heterodimerização do VDR com o receptor retinóide X (RXR). Este complexo interage com os elementos de resposta a vitamina D (VDRE) do DNA e com co-reguladores (CoReg, B), alterando a transcrição dos genes alvos realizada pela enzima RNA polimerase II (RNA Pol II) (Adaptado de DUSSO, 2003).

Em outros tecidos, como no fígado, músculo, pele, pâncreas e cérebro, o VDR controla uma série de processos biológicos que incluem imuno-modulação, regeneração tecidual, inibição do crescimento celular, apoptose e diferenciação celular (DROCOURT et al., 2002). Outra função atribuída ao VDR é o controle do balanço oxi-redutor celular através da regulação da expressão gênica das enzimas glicose 6-fosfato desidrogenase, glutatona peroxidase, tioredoxina redutase e γ -glutamil transpeptidase (GARCION et al., 1999; LIN et al., 2002). Além disso, em

mamíferos, o VDR é considerado um xenosensor de compostos tóxicos, pois pode ser ativado pelo ácido biliar litocólico e regular a expressão de genes envolvidos no processo de biotransformação, como *CYP3A4* (THUMMEL et al., 2001; MAKASHIMA et al., 2002).

O catabolismo da $1\alpha,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ ocorre através de uma hidroxilação catalisada pela enzima Citocromo P450 24A1 (*CYP24A1*), que dá origem a molécula $1\alpha, 24, 25(\text{OH})_3$, triidroxivitamina D_3 , que é 10 vezes menos potente que a $1\alpha, 25(\text{OH})_2 \text{D}_3$. Oxidações subseqüentes diminuem a atividade biológica da molécula, produzindo o ácido calcitróico, que é solúvel em água e pode ser excretado (LIN; WHITE, 2003).

O gene *VDR* foi caracterizado em mamíferos, aves, anfíbios, répteis e peixes (LI et al., 1997; LU; HANSON; DELUCA, 1997; RESCHLY; KRASOWSKI, 2006). Em peixes, o gene *VDR* foi identificado em peixe-zebra (*D. rerio*) (CIESIELSKI et al., 2004), medaka (*Oryza latipes*) (HOWARTH et al., 2008), salmão do atlântico (*Salmo salar*) (LOCK et al., 2007), linguado japonês (*Paralichthys olivaceus*) (SUZUKI et al., 2000) e baiacu (*Takifugu rubripes*) (MAGLICH et al., 2003). Recentemente, o *VDR* foi clonado em peixes agnatos (lampreia), que representam a mais antiga linhagem dentre os vertebrados atuais (WHITFIELD et al., 2003).

Em peixes teleósteos, dois genes *VDRs* estão presentes, *VDR α* e *VDR β* (HOWARTH et al., 2008). Em medaka, ambos transcritos dos *VDRs* foram identificados na maioria dos tecidos adultos examinados, incluindo cérebro, brânquia, intestino, fígado, rim, músculo esquelético, baço, testículos e ovários (HOWARTH et al., 2008). O *VDR α* de baiacu e o *VDR β* do linguado possuem ampla distribuição, em contraste, *VDR β* de baiacu tem sua expressão restrita ao intestino, enquanto que o *VDR α* do linguado apresenta pouca ou nenhuma expressão no fígado, brânquia e músculo esquelético (SUZUKI et al., 2000; MAGLICH et al., 2003). A função molecular e o significado biológico de múltiplos genes *VDR* dos teleósteos ainda não foi elucidada (HOWARTH et al., 2008).

A presença de VDR com alta afinidade ao calcitriol na lampreia, um peixe agnato sem mandíbula e com esqueleto cartilaginoso não calcificado, sugere que a regulação da homeostase do cálcio não seja uma função crítica do VDR ancestral (WHITFIELD et al., 2003). Em mamíferos, o VDR media um número de funções além da regulação dos níveis de cálcio e fosfato e várias novas funções do VDR têm sido

descobertas, incluindo o papel do VDR no metabolismo de endo e xenobióticos (SUTTON; MACDONALD, 2003; DUSSO, 2003).

Apesar de VDR e PXR supostamente apresentarem funções distintas, esses receptores se ligam a elementos responsivos similares da região promotora dos genes alvos. *PXR* e *VDR* possivelmente se originaram da duplicação de um gene ancestral, representado por um único gene no invertebrado *Ciona intestinalis*, que se apresenta igualmente relacionado a *VDR*, *PXR* e *CAR* (KRASOWSKI et al., 2005). Além disso, VDR e PXR compartilham um número de genes alvos em mamíferos, muitos deles envolvidos no processo de biotransformação, incluindo citocromo p450 3A (CYP3A), sulfotransferase 2A1 (SULT2A1) e UDP-glucuroniltransferase (UDPGT) (THUMMEL et al., 2001; KUTUZOVA; DELUCA, 2006). A capacidade de ambos receptores regular genes envolvidos no processo de biotransformação de xenobióticos sugere que esses receptores dividem a função de mediação da resposta de detoxificação em mamíferos (ADACHI et al., 2004).

Em peixes, existem poucos estudos relacionando a função desses receptores nucleares no controle da expressão de genes do processo de biotransformação (WHITFIELD et al., 2003; BRESOLIN; REBELO; BAINY, 2005). Neste grupo de animais, uma possível divisão da função de mediação da resposta de detoxificação de xenobióticos por PXR e VDR ainda não foi sugerida.

1.4. Biotransformação

Os sistemas enzimáticos de biotransformação são responsáveis pela modificação de compostos endógenos ou xenobióticos lipofílicos em substâncias mais hidrossolúveis e facilmente excretadas pela urina ou bile. Este metabolismo é mediado primariamente por enzimas de fase I e fase II do processo de biotransformação (URQUHART et al., 2007).

As reações de fase I são mediadas pela superfamília de enzimas microsossomais citocromo p450 (CYP) além de outras, como as monooxigenases, peroxidases, amino-oxidases e dehidro-oxigenases (ZAMEK-GLISZCZYNSKI et al., 2006).

A superfamília Citocromo p450 é de importância central em muitos processos-chave, como homeostase, controle hormonal, regulação gênica, estresse oxidativo, biotransformação de xenobióticos naturais e antropogênicos (STEGEMAN; HAHN, 1994). Dentre os compostos endógenos metabolizados por este grupo de enzimas estão esteróides, ácidos biliares, ácidos graxos, prostaglandinas, leucotrienos e retinóides (ZHOU; VERMA; BLUMBERG, 2009). Além disso, essa superfamília biotransforma xenobióticos, incluindo drogas, pesticidas, hidrocarbonetos aromáticos (PAH, AH), bifenilas policloradas (PCB) e carcinógenos (GONZALEZ, 2005).

A biotransformação de xenobióticos é mediada primariamente pela atividade de quatro famílias de enzimas pertencentes à superfamília Citocromo p450 monooxigenases: CYP1, CYP2, CYP3 e CYP4. Dentre essas quatro famílias de enzimas, as famílias de CYP3 e CYP2 são consideradas as mais importantes. A família CYP3 é responsável pela iniciação do metabolismo de vários xenobióticos, estimado em mais de 50% das drogas usadas clinicamente e muitos químicos xenobióticos. A subfamília CYP2B é responsável por 20 a 30% do metabolismo de drogas e xenobióticos.

A fase I do sistema de biotransformação representa a primeira linha de defesa contra substâncias tóxicas provenientes da dieta e do ambiente. É notável que muitos xenobióticos biotransformados por essa enzimas sejam capazes de induzirem ou regularem a expressão dos genes que codificam as enzimas dessa superfamília. A habilidade dos organismos de induzir as enzimas da superfamília p450 em resposta a níveis de xenobióticos é crucial para a sobrevivência e manutenção da homeostase (ZHOU; VERMA; BLUMBERG, 2009) e é uma intensa área de pesquisa porque sua modulação tem importantes implicações terapêuticas e toxicológicas.

Em geral, o metabolismo de fase I não resulta em muita mudança na massa molecular ou solubilidade em água do substrato, mas é de grande importância porque as reações adicionam ou expõem locais para que a atuação das enzimas do metabolismo de fase II possa ocorrer subsequente. Contrastando com a fase I, a fase II se caracteriza por uma etapa de conjugação e, tipicamente, resulta em um aumento considerável da massa molecular e da solubilidade em água do substrato metabolizado (ZAMEK-GLISZCZYNSKI et al., 2006).

O metabolismo de fase II é representado principalmente por três classes de enzimas: Sulfotransferases (SULT), Uridina difosfoglucuronosiltransferase (UDPGT),

e Glutathione S-transferases (GST). Essas enzimas catalisam, respectivamente, reações de sulfatação, glucuronidação e conjugação à glutathione. Essas reações podem ocorrer diretamente no composto nativo que contenha motivos estruturais apropriados ou, como ocorre mais comumente, a partir de grupos funcionais adicionados ou expostos pela oxidação de fase I. Esta cadeia metabólica resulta na biotransformação de uma molécula hidrofóbica em um produto mais hidrofílico, sendo, conseqüentemente, mais facilmente excretado (ZAMEK-GLISZCZYNSKI et al., 2006).

Alguns autores incluem uma terceira fase no processo de biotransformação (XU; LI; KONG, 2005). Essa fase compreende proteínas de membrana que atuam no bombeamento de substratos, estrutural e funcionalmente, diversos para o meio extracelular. As proteínas dessa fase evitam que haja um acúmulo de metabólitos endógenos, fosfolípidos, sais biliares e xenobióticos no interior da célula. O bombeamento de drogas e xenobióticos realizado por essas proteínas conferem ao organismo a característica de resistência a multidroga (MDR) ou multixenobióticos (MXR). As proteínas que conferem ao organismo MDR ou MXR são glicoproteínas P (P-gp) e fazem parte de uma superfamília de transportadores denominada como proteínas *ATP-binding cassette* (ABC) ou *Traffic-ATPases*. Proteínas do tipo ABC agem como uma bomba dependente de ATP que translocam através da membrana celular uma ampla variedade de substratos. Esses compostos são moderadamente hidrofóbicos e planares, podendo ser produtos naturais ou xenobióticos, que são substratos ou metabólitos das enzimas de detoxificação (BARD, 2000).

O estudo da modulação do sistema de biotransformação de compostos tóxicos em peixes é essencial devido à crescente exposição de organismos aquáticos a compostos químicos lançados no ambiente. O estudo da regulação da transcrição de genes relacionados à defesa do organismo contra xenobióticos possibilita uma melhor compreensão dos mecanismos de modulação molecular das defesas celulares contra contaminantes e quais vias metabólicas podem ser afetadas pela exposição aos contaminantes. Em nosso laboratório, o estudo dos mecanismos de regulação da expressão de genes envolvidos no processo de biotransformação é recente. Bresolin, Rebelo e Bainy (2005) demonstraram a indução dos genes *PXR*, *CYP3C1* e *ABCB5* por PCN em fígado de peixes *D. rerio*, Mattos et al. (2008) estudaram o efeito do anti-concepcional etinilestradiol na expressão de *CYP3C1*, *ABCB5* e *PXR* no fígado e intestino de *D. rerio* e Reschly et

al. (2007) demonstraram o efeito de metabólitos da bile na expressão desses mesmos genes.

1.5. PCR quantitativo

Em estudos de expressão gênica, a técnica de PCR quantitativo (qPCR) é considerada uma importante ferramenta (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008) e uma referência para a quantificação de ácidos nucleicos, devido a simplicidade conceitual e prática, em conjunto com a combinação de velocidade, sensibilidade e especificidade em um mesmo ensaio (BUSTIN, 2000). Na qPCR, o acúmulo de produtos da PCR é detectado e monitorado diretamente pelo registro do aumento da fluorescência do composto utilizado, enquanto na PCR tradicional os produtos precisam ser posteriormente analisados por eletroforese.

Diferentes estratégias de detecção de fluorescência foram desenvolvidas para qPCR. Algumas destas estratégias incluem o uso de corantes “não-específicos” ligantes ao DNA, como *SYBR Green I*, que é um corante que se liga a toda e qualquer dupla fita de DNA (MORRISON; WEIS; WITTEWER, 1998). Em solução (não ligada ao DNA), a fluorescência de *SYBR Green I* é baixa, mas quando se liga ao DNA dupla fita, a fluorescência aumenta. À medida que a reação de PCR ocorre, uma maior quantidade de *SYBR Green I* liga-se aos amplicons dupla-fita gerados, aumentando a fluorescência proporcionalmente à concentração do produto e essa alteração na fluorescência é medida a cada ciclo.

O principal fundamento do método de qPCR é o chamado ciclo limiar, ou *threshold cycle* (Ct). O Ct é definido como o ciclo da reação de PCR no qual o sinal fluorescente do corante sinalizador atravessa uma linha arbitrária denominada limiar, conforme ilustrado na **Figura 4**. Para apresentar os dados na forma de Ct, deve-se certificar que o limiar está delimitado na fase exponencial de amplificação, acima do ruído de fundo e abaixo da fase de platô da reação de PCR. O valor numérico do Ct é inversamente proporcional à quantidade inicial do transcrito de interesse na reação, ou seja, quanto menor o valor de Ct, maior a quantidade inicial do transcrito na amostra (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008).

Existem dois diferentes métodos para se analisar os resultados de um experimento utilizando PCR em tempo real: quantificação absoluta e quantificação relativa. Quantificação absoluta determina o número exato de cópias do transcrito de interesse e a quantificação relativa descreve a alteração na expressão em relação a algum grupo referência, como um controle não-tratado ou uma amostra tempo zero (SUGDEN; WINTER, 2008).

A expressão relativa é utilizada em estudos de expressão gênica, quando é desnecessário apresentar os dados como número absoluto de cópias, sendo mais interessante apresentar o resultado como uma alteração em número de vezes na expressão do gene (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008). Ensaio de expressão gênica relativa são tipicamente relacionados a um gene controle interno como *gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase* ou *β -actina*, para normalizar as diferenças nas quantidades de RNAm. Essa quantidade pode variar devido a diferenças na massa tecidual, número celular, tratamento experimental, eficiência na extração de RNA e/ou síntese de cDNA. Uma das condições necessárias para que um gene possa ser considerado como controle interno é que as condições do experimento não influenciem sua expressão (SCHMITTGEN; ZAKRAJSEK, 2000).

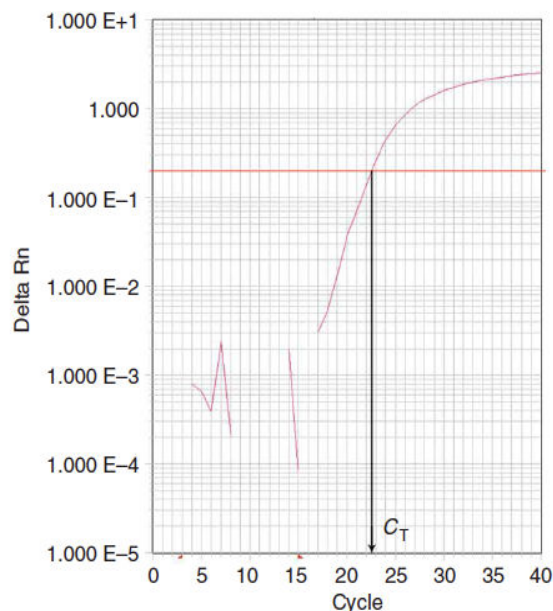


Figura 4. Exemplo de delimitação de limiar e determinação do valor de C_t . Dados típicos de uma reação de PCR em tempo real com 40 ciclos. O ponto em que a curva encontra o limiar (linha horizontal vermelha) é o C_t . No exemplo o C_t é 22,5 (Fonte: SCHMITTGEN; LIVAK, 2008).

Em condições ideais, a eficiência da reação de PCR é 100% ($E = 1$), com a quantidade de produto gerado crescendo exponencialmente, dobrando a cada ciclo da PCR (SUGDEN; WINTER, 2008). Um dos métodos utilizados na análise da expressão relativa em qPCR é o método de Ct comparativo ou $\Delta\Delta Ct$. Para utilizar o método de Ct comparativo é necessária a otimização das reações de forma que as eficiências fiquem próximas de 100% e também a certificação de que a eficiência da reação do gene de interesse seja similar a do gene controle interno (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Entre as vantagens do método comparativo de Ct estão a facilidade de aplicação do método e a possibilidade de apresentação dos dados através do aumento em vezes na expressão. As desvantagens do método comparativo de Ct incluem a obrigação das eficiências de PCR serem muito próximas ou iguais, o que requer uma otimização prévia (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008).

2. OBJETIVOS

Objetivo geral

- Avaliar se os receptores nucleares VDR e PXR modulam a transcrição de genes envolvidos no processo de biotransformação em peixes da espécie *D. rerio*.

Objetivos específicos

- Analisar a expressão de genes envolvidos no processo de biotransformação no intestino e no fígado de peixes da espécie *D. rerio* após o tratamento destes com agonistas dos receptores nucleares VDR e PXR, respectivamente, 1 α ,25-diidroxivitamina D3 e 5-Pregnen-3 β -ol-20-ona;
- Analisar a expressão dos genes dos receptores nucleares, *VDR* α e *PXR*, no intestino e no fígado de peixes da espécie *D. rerio* após o tratamento destes com agonistas dos receptores nucleares VDR e PXR;
- Comparar os resultados obtidos para os dois agonistas.

3. METODOLOGIA

3.1. Obtenção dos animais

Indivíduos adultos machos e fêmeas (massa corpórea de $0,61 \pm 0,17\text{g}$) da espécie *Danio rerio*, foram adquiridos comercialmente em uma loja de aquários da cidade de Florianópolis, Santa Catarina. A espécie de peixe *Danio rerio* é conhecida popularmente como peixe-zebra e pertence à Família Cyprinidae (Ordem Cypriniformes). Esta espécie é utilizada como modelo experimental e possui seu genoma completamente seqüenciado (www.zfin.org).

Os animais foram levados à área de aclimação do Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica onde permaneceram por duas semanas em aquários de 30L, com 24 indivíduos por aquários. Nesse período, os animais foram alimentados com ração comercial (TetraMin® Tropical Flakes) duas vezes por dia e mantidos em aeração constante; a água dos aquários foi trocada diariamente; o ambiente teve a temperatura controlada (23-24°C) e fotoperíodo de 12 horas.

Os procedimentos experimentais executados neste projeto foram autorizados pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (Protocolo: PP00244).

3.2. Tratamento do material biológico

Após o período de aclimação, os peixes foram separados em 3 grupos de 24 animais. Ao primeiro grupo foi administrado calcitriol (1 α ,25-diidroxitamina D3-Sigma-Aldrich), ao segundo grupo pregnenolona (5-Pregnen-3 β -ol-20-ona-Steraloids) e ao último grupo o veículo, óleo de milho (Mazola).

Os compostos foram previamente dissolvidos em óleo de milho e a administração da dose foi via injeção intraperitoneal. A concentração final de cada ativador nos peixes foi de $500\mu\text{g.Kg}^{-1}$.

A escolha dos ativadores e da dose utilizada foi baseada nos trabalhos de Reschly e colaboradores (2007) e Ekins e colaboradores (2008) que demonstraram *in vitro* que os compostos $1\alpha,25\text{-diidroxivitamina D3}$ e o $5\text{-Pregnen-}3\beta\text{-ol-}20\text{-ona}$ são ativadores dos receptores nucleares VDR e PXR de *D. rerio*, respectivamente.

Após a injeção, os peixes foram mantidos em aquários de 30L por 48 horas, nas mesmas condições de aclimação, exceto pela alimentação, que não foi fornecida após o tratamento dos animais. Após o período de 48 horas, os animais foram mortos por decapitação e dissecados para a retirada do fígado e intestino. Os tecidos dos 24 animais de cada grupo foram reunidos em pool de 3 animais ($n=8$) e congelados em nitrogênio líquido para as análises posteriores.

3.3. Desenho dos iniciadores

Os genes analisados nesse estudo foram genes que codificam para citocromo p450 família 2 (*CYP2AA1* e *CYP2AA1*), citocromo p450 família 3 (*CYP3A65* e *CYP3C1*), citocromo p450 24 (*CYP24*), Glutathione *S*-transferases (*GST α* e *GST π*); proteína transportadora do tipo *ATP-binding cassette* (*ABCB5*) e os genes dos receptores nucleares *PXR* e *VDR α* (**Tabela 1**).

Além disso, foi analisada a expressão de três genes constitutivos que codificam para β -actina (*ACT*); gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*) e rRNA ribossomal 28S (28S) (**Tabela 1**). A partir da expressão destes três genes, foi selecionado um para normalizar as reações de PCR.

Os iniciadores específicos para os 13 genes citados foram desenhados utilizando-se o programa PrimerQuest (Integrated DNA Technology) e foram baseados na sequência de RNAm dos genes obtidas no banco de dados GenBank.

Os parâmetros definidos para os desenhos foram temperatura de dissociação entre 63 e 67°C (diferença máxima entre os iniciadores de um par de 1°C); concentração média de GC de 55% e máximo de 5 nucleotídeos complementares entre as sequências de um mesmo par.

Os iniciadores foram analisados *in silico* quanto à formação de estruturas secundárias do tipo *hairpin*, hetero e homodímeros utilizando o programa PrimerQuest.

Tabela 1. Dados dos iniciadores dos genes *CYP3A65*, *CYP3C1*, *CYP24*, *CYP2AA1*, *CYP2AA2*, *GST α* , *GST π* , *ABCB5*, *PXR*, *VDR α* , *28S*, *ACT* e *GAPDH* da espécie de peixe *D. rerio*.

Código	Iniciador	Tamanho	Tm	Produto	Acesso
Fase I					
CYP3A65-F	5´ tgagcatggactacctggacgcagc 3´	25	64,3	199	AY452279
CYP3A65-R	5´ tcgggtttgaagctctccggttcgc 3´	25	64,7		
CYP3C1-F	5´ gctggtcctcgcttagaaaggggtctgt 3´	27	63,3	197	NM_212673
CYP3C1-R	5´ ggcatgaaggcacactggttgatctctgtc 3´	30	63,7		
CYP24-F	5´ tgctgggcgattacacctgcctaa 3´	25	64,2	172	NM_001089458
CYP24-R	5´ cgcttcccaacaccaaagcgacat 3´	25	64,3		
CYP2AA1-F	5´ agaacggacacttcagcaagccgga 3´	25	63,7	151	não publicado
CYP2AA1-R	5´ ttgctgcaggtgccaggagaaa 3´	24	62,6		
CYP2AA2-F	5´ tgacctgtttctggctggaaccga 3´	24	61,8	183	não publicado
CYP2AA2-R	5´ tgaacagtggcgagtgtgtacggt 3´	24	61,7		
Fase II					
GSTα-F	5´ agctgtttccctccatactggccacatt 3´	28	63,3	88	NM_213394
GSTα-R	5´ aggaactgtctgatcgctggtaaagcct 3´	28	63,2		
GSTπ-F	5´ tggcggacaaagaccagcagctgaa 3´	25	64,8	161	NM_131734
GSTπ-R	5´ tcgaccagatgtctcagcatggcggt 3´	27	65,2		
Fase III					
ABCB5-F	5´ tatgccacctgcccagaggtgttct 3´	26	65,2	84	BC155545
ABCB5-R	5´ cacacatgagaggcaaagcgacgccca 3´	26	64,9		
Receptores Nucleares					
PXR-F	5´ acgattcgggacacgggtgatgggt 3´	24	64,1	189	NM_001098617
PXR-R	5´ aggcgctctgaaatgggcagcaga 3´	24	64,8		
VDRα-F	5´ tgtgcggagacaaagccaccggatt 3´	25	64,5	93	NM_130919
VDRα-R	5´ tggccttacgccttcatactgcgcct 3´	25	64,1		
Constitutivos					
28S-F	5´ actaaccaggattccctcagtagc 3´	24	57,9	300	AJ306602
28S-R	5´ actgtcgactatcggtctcgtg 3´	23	58,2		
ACT-F	5´ tgaagatcctgaccgagcgtggct 3´	24	63,8	129	NM_131031
ACT-R	5´ aagaggcagcggtcccatctct 3´	24	63,9		
GAPDH-F	5´ accacagttcatgcctacaccgccca 3´	25	64,3	196	BC154822
GAPDH-R	5´ acacatcagcgactggcacacggaa 3´	25	64,2		

A qualidade dos iniciadores foi analisada através do programa FASTPCR (KALENDAR; LEE; SCHULMAN, 2009) e apenas aqueles com qualidade acima de 90% foram aceitos. Neste mesmo programa foi realizado o PCR *in silico* para estimar o tamanho de produto esperado e confirmar o pareamento dos pares na sequência do gene.

3.4. Extração de RNA total

O uso de RT-qPCR para medir níveis de expressão de RNA mensageiros específicos requer o isolamento de RNA, conversão do mesmo em cDNA pela enzima transcriptase reversa e finalmente a amplificação e detecção dos produtos gerados em qPCR.

Dessa forma, a partir dos tecidos congelados em nitrogênio líquido realizou-se a extração do RNA total. A extração de RNA total foi feita utilizando o reagente Trizol, seguindo condições adaptadas do protocolo do fabricante (Invitrogen). Este reagente é composto de fenol e tiocianato de guanidina, que possibilitam a lise celular e manutenção da integridade do RNA.

Após a homogeneização dos tecidos no reagente Trizol, foi adicionado clorofórmio e as amostras foram centrifugadas a 14.000g por 30 minutos a 4°C. Esse procedimento permite a obtenção de uma fase superior aquosa contendo o RNA, que foi separada. O RNA foi então precipitado com isopropanol a -20°C por 30 minutos, seguido de centrifugação a 14.000g por 30 minutos a 4°C., lavagem em álcool 70% e diluição em água.

O RNA extraído foi quantificado por espectrofotometria a 260nm. A qualidade do material foi analisada pelas razões espectrofotométricas 260/230 e 260/280, utilizando o espectrofotômetro NanoDrop (ThermoScientific).

3.5. Tratamento com DNase e síntese do cDNA

Após a verificação da integridade do RNA total, foi realizado o tratamento desse material com DNase I. Esse procedimento visa eliminar a contaminação das amostras de RNA total com DNA genômico. Uma contaminação desse tipo pode superestimar a expressão de um gene.

O tratamento foi realizado em 2µg de RNA total utilizando-se 1U da enzima DNase I (Sigma-Aldrich) durante 20 minutos a 25°C. A inativação da DNase foi feita com a adição de um tampão de inativação contendo EDTA (50µM) e aquecimento a 70°C por 15 minutos. Em seguida, as amostras foram imediatamente esfriadas em gelo. Esse procedimento foi feito de acordo com o protocolo do fabricante da enzima.

Experimentos paralelos verificaram que os reagentes utilizados no tratamento com DNase I não interferiam na síntese de cDNA ou na qualidade das reações de PCR. Dessa forma, a partir do tratamento com DNase, as amostras seguiram diretamente para a síntese de cDNA.

Para a síntese do cDNA foi realizada a transcrição reversa utilizando o sistema Omniscript RT Kit (Qiagen), de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante. A transcriptase reversa é a enzima utilizada nesse kit e realiza a síntese do cDNA a partir da fita de RNA, utilizando um iniciador do tipo oligo(dT), que anela na cauda poliA dos RNAm.

Além de 2µg de RNA molde, a reação de transcrição reversa continha tampão RT 1x; dNTPs (0,5mM de cada dNTP); iniciador Oligo dT 1µM (Promega); inibidor de RNase 10 U/µL e transcriptase reversa Omniscript (4 unidades).

A reação foi mantida durante 90 minutos a 37°C, após este período, o material foi precipitado em 50µL de isopropanol durante 12 horas, seguido de centrifugação a 20.000g por 45 minutos, lavagem em etanol 80% e diluição em água deionizada.

A concentração e a pureza de cDNA foram determinadas através de espectrofotometria a 260nm e pela razão 260/230 e 260/280nm, respectivamente, utilizando o espectrofotômetro NanoDrop (ThermoScientific).

3.6. RT-PCR quantitativa

3.6.1. Padronização das condições

A técnica utilizada para a determinação da expressão dos genes foi a RT-PCR quantitativa ou RT-PCR em tempo real. Essa técnica é capaz de detectar a presença de uma única cópia gênica e quantificar exatamente a expressão de um gene.

Os níveis dos transcritos dos animais foram analisados em um termociclador Rotor-Gene TM 6000 (Corbett Life Science) utilizando o kit QuantiTect SYBR Green qPCR Mix (Qiagen). As reações de 20µL continham 10µL de SYBR Green qPCR Mix 1x, que possui o fluoróforo SYBR Green I, Taq DNA polimerase, dNTPs, MgCl₂ e o tampão da enzima; os 10µL restantes foram divididos entre o volume de cDNA de cada amostra e de iniciadores, ambos diluídos em água deionizada.

Testes realizados paralelamente ao experimento demonstraram que a qualidade da reação não é alterada por concentrações de iniciadores entre 100 a 750nM. Assim, a concentração dos iniciadores utilizada em todas as reações descritas nesse trabalho foi de 300nM cada, seguindo as instruções do fabricante do kit para qPCR.

Os programas de ciclagem de cada gene incluíam ativação da enzima polimerase a 95°C por 15 min, seguida de 40 ciclos de 15s de desnaturação a 95°C, 30s de associação de iniciadores a 58°C (exceto para o gene 28S que foi a 54°C) e 30s de extensão a 72°C. Ao final da última etapa de cada ciclo ocorreu a aquisição da fluorescência a 72°C.

Visando analisar o perfil dos produtos formados, ao término de 40 ciclos, foi realizada uma curva de dissociação através do aumento de 1°C a cada 5s, partindo de 60°C e terminando a 99°C.

A quantificação relativa da expressão dos genes estudados foi feita utilizando-se o método de comparação de Ct ou $\Delta\Delta Ct$. Esse método se baseia na redução dos valores de Cts do grupo controle em relação ao grupo de interesse. Os valores de ambos os grupos foram normalizados por um gene controle ou normalizador. O Ct (*cycle threshold* - ciclo limiar) é definido como o número de ciclos requerido para que

a fluorescência da reação atinja níveis superiores à fluorescência basal da reação (*background*) e apresente uma amplificação exponencial.

Esse método deve ser usado apenas quando dois pré-requisitos forem cumpridos: as eficiências das reações devem ser próximas a 1 e as eficiências das reações do gene de interesse e do gene utilizado para normalizar os dados devem ser iguais.

Com o intuito de seguir os pré-requisitos necessários para se utilizar o método de $\Delta\Delta C_t$, foram realizados mais dois ensaios, que consistiram em testar a especificidade dos iniciadores e analisar a eficiência das reações de cada gene estudado.

O teste de especificidade dos pares de iniciadores verifica se o par em questão amplifica apenas o fragmento do gene de interesse. Depois de terminada a reação de PCR, essa análise é feita pela curva de dissociação do produto. Nesse procedimento, a variação da fluorescência da reação é monitorada a cada grau crescente, de 60 a 99°C.

Devido a presença do corante intercalante SYBR Green I na reação, a desnaturação de diferentes amplicons pode ser monitorada pela alteração na fluorescência da reação quando atingida a temperatura de dissociação (T_m) de cada produto.

Esse dado foi analisado em um gráfico da razão entre a derivada da fluorescência e a derivada da temperatura (dF/dT) pela temperatura. Nessa análise, a presença de apenas um pico na curva de dissociação indica uma amplificação específica de um único fragmento. Esse teste também possibilita verificar a ausência de dímeros de iniciadores durante a reação. Essa análise foi feita utilizando-se o programa Corbett Rotor-Gene 6000 Application Software.

A análise da eficiência da reação foi feita a partir de RT-PCR em diferentes concentrações de cDNA (1, 10, 100, 200, 500 e 1000ng) para todos os genes estudados.

Através da relação entre ciclo e quantidade de cDNA para cada reação, obteve-se uma reta através da qual foi possível analisar a qualidade da reação em uma determinada fluorescência com um determinado par de iniciadores. A linearidade da reta (R^2) e o valor de m , que representa a taxa de variação dos dados ou a inclinação da reta, foram utilizados para analisar a eficiência da reação. As

análises foram feitas utilizando o programa Corbett Rotor-Gene 6000 Application Software.

Um valor de m igual a -3,32 representa uma eficiência de 100% de duplicação do fragmento a cada ciclo, naquela fluorescência. A linearidade (R^2) de 1,0 indica que a reação se mantém com eficiência semelhante nas diferentes concentrações de cDNA utilizados. Em conjunto, esses dados indicam que as reações duplicaram o material a cada ciclo, independente da quantidade de material utilizada. A partir das curvas padrões foi estabelecido o *threshold* de cada par de iniciadores.

O *threshold* foi estabelecido na menor fluorescência em que a reação ocorre com uma eficiência de duplicação de 100%. A partir do *threshold* foram extraídos os Cts de cada amostra, que é a variável utilizada na quantificação relativa.

3.6.2. Análise das amostras

Após a padronização das condições de PCR, reações de PCR em tempo real foram realizadas para cada gene estudado, com duas repetições para cada gene. Cada reação continha 100ng de cDNA e as condições de PCR foram as mesmas utilizadas nas padronizações. Os valores de Cts gerados correspondem ao ciclo em que a fluorescência atingiu o *threshold*, momento em que, de acordo com a curva de cDNA feita previamente, a reação apresenta uma eficiência de 100%.

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

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{alvo}} - Ct_{\text{constitutivo}})^{\text{tratado}} - (Ct_{\text{alvo}} - Ct_{\text{constitutivo}})^{\text{controle}}$$

As análises estatísticas para a escolha do gene constitutivo foram feitas utilizando o valor de Ct dos genes *28S*, *ACT* e *GAPDH* de cada amostra como um expoente negativo de base 2.

3.6.3. Análise dos resultados

Os resultados foram submetidos a testes estatísticos para determinar a normalidade e homocedacidade dos dados. Para estas análises preliminares, utilizou-se o teste de Shapiro-Wilk para determinar a normalidade e o teste de Bartlett para a homocedacidade dos dados.

A análise dos dados foi realizada através o teste *t* de Student entre cada grupo tratado e o grupo controle. Esse mesmo teste foi utilizado como critério de escolha do gene constitutivo.

As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o programa GraphPad 5.0 para Windows.

4. RESULTADOS

4.1. Padronização das condições de RT-qPCR

O uso da técnica de RT-qPCR em tempo real requer duas análises iniciais para cada par de iniciadores utilizado. Essas análises consistem em testar a especificidade dos iniciadores e a eficiência da reação.

Para testar a especificidade de amplificação dos pares de iniciadores foram realizadas reações de PCR e cada reação foi feita utilizando-se apenas um par de iniciadores. Após a amplificação, analisou-se o perfil da curva de dissociação. A presença de apenas um pico em todas as reações indica uma amplificação específica de um único fragmento e ausência de dímeros de iniciadores (**Figura 5**).

Em relação à eficiência das reações para cada par de iniciadores, as PCRs apresentaram eficiência de 1 ($\pm 0,02$) para 11, dos 13 genes estudados, no fígado e no intestino. As reações do gene 28S apresentaram eficiência de 0,94 e 0,96 para fígado e intestino, respectivamente (**Tabela 2 e 3**).

Os dados das curvas demonstraram que todos os genes possuem uma eficiência de reação próximo a 1 e que todas as eficiências estão próximas aos genes constitutivos, o que possibilitou a análise da expressão relativa desses genes nas amostras dos grupos de peixes tratados com os agonistas do PXR, do VDR e do grupo controle (**Tabela 2 e 3**).

4.2. Análise dos genes constitutivos

Após determinar a eficiência de reação de todos os genes estudados, foi determinado qual gene normalizaria a expressão dos genes de interesse durante as análises. Foram escolhidos três genes candidatos a normalizadores: o rRNA 28S (28S), Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*) e β - Actina (*ACT*).

Um dos pré-requisitos para um gene ser utilizado como normalizador é que ele apresente características de um gene constitutivo mesmo com o tratamento conferido no experimento, ou seja, esse gene não deve possuir sua expressão alterada pelos tratamentos. Dentre os genes candidatos a normalizar os dados, no fígado, o gene *28S* e *GAPDH* apresentaram diferenças estatísticas entre o grupo tratado com pregnenolona e o grupo controle (**Figura 6**).

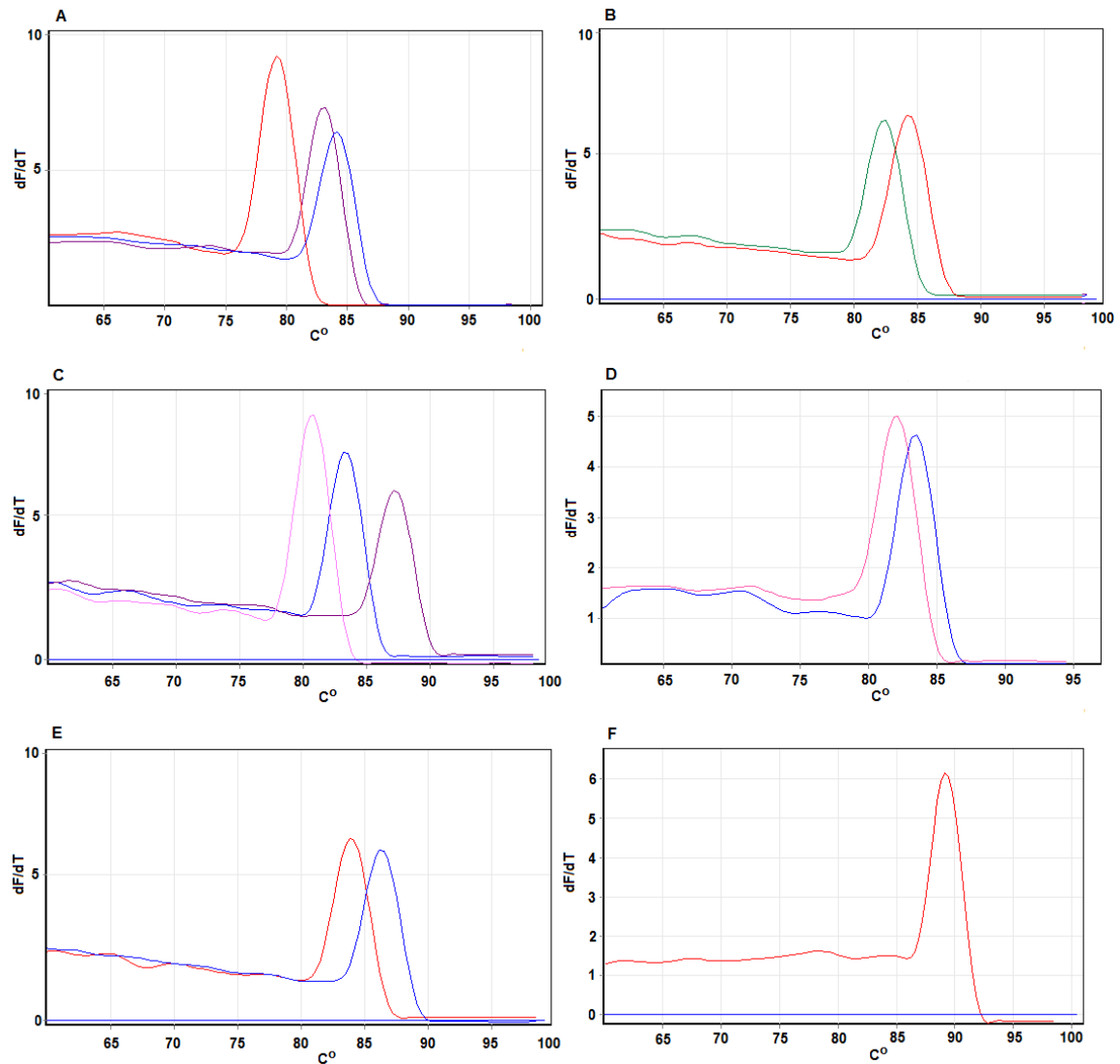


Figura 5. Curva de dissociação dos produtos de PCR. Cada curva representa a dissociação do produto de PCR de um par de iniciadores. Da esquerda para a direita, as curvas representam os produtos de amplificação dos iniciadores específicos para os genes: **A.** *CYP3C1*, *CYP24*, *CYP3A65*; **B.** *CYP2AA2*, *CYP2AA1*; **C.** *GSTα*, *GSTπ*, *ABCB5*; **D.** *VDRα*, *PXR*; **E.** *ACT*, *GAPDH*; **F.** *28S*.

O gene *ACT* não apresentou alteração em sua expressão no fígado dos animais submetidos aos diferentes tratamentos, sendo, portanto, selecionado para normalizar os dados dos demais genes estudados neste tecido.

Tabela 2. Padronização das condições de PCR em tempo real para os genes *CYP3A65*, *CYP3C1*, *CYP24*, *CYP2AA1*, *CYP2AA2*, *GSTα*, *GSTπ*, *ABCB5*, *PXR*, *VDRα*, *28S*, *ACT* e *GAPDH* de fígado de *D. rerio*. Os dados da curva de cDNA foram obtidos em reações de PCR com 1, 10, 100, 200, 500 e 1000ng por reação.

Código	R ²	M	Eficiência
<i>CYP3A65</i>	1,00	-3,32	1,00
<i>CYP3C1</i>	1,00	-3,33	1,00
<i>CYP24</i>	1,00	-3,32	1,00
<i>CYP2AA1</i>	1,00	-3,32	1,00
<i>CYP2AA2</i>	0,99	-3,27	1,02
<i>GSTα</i>	1,00	-3,29	1,01
<i>GSTπ</i>	1,00	-3,33	1,00
<i>ABCB5</i>	0,99	-3,32	1,00
<i>PXR</i>	0,99	3,32	1,00
<i>VDRα</i>	0,99	-3,33	1,00
<i>28S</i>	1,00	-3,49	0,94
<i>ACT</i>	1,00	-3,32	1,00
<i>GAPDH</i>	1,00	-3,32	1,00

Tabela 3. Padronização das condições de PCR em tempo real para os genes *CYP3A65*, *CYP3C1*, *CYP24*, *CYP2AA1*, *CYP2AA2*, *GSTα*, *GSTπ*, *ABCB5*, *PXR*, *VDRα*, *28S*, *ACT* e *GAPDH* de intestino de *D. rerio*. Os dados da curva de cDNA foram obtidos em reações de PCR com 1, 10, 100, 200, 500 e 1000ng por reação.

Código	R ²	M	Eficiência
<i>CYP3A65</i>	1,00	-3,32	1,00
<i>CYP3C1</i>	1,00	-3,33	1,00
<i>CYP24</i>	0,99	-3,33	1,00
<i>CYP2AA1</i>	0,99	-3,25	1,02
<i>CYP2AA2</i>	1,00	-3,33	1,00
<i>GSTα</i>	1,00	-3,33	1,00
<i>GSTπ</i>	1,00	-3,33	1,00
<i>ABCB5</i>	0,98	-3,32	1,00
<i>PXR</i>	1,00	-3,32	1,00
<i>VDRα</i>	0,99	-3,31	1,00
<i>28S</i>	0,97	-3,42	0,96
<i>ACT</i>	1,00	-3,32	1,00
<i>GAPDH</i>	1,00	-3,33	1,00

No intestino, a expressão do gene 28S diferiu com o tratamento de calcitriol, ocorrendo uma diminuição na expressão desse gene em relação ao controle (**Figura 7**). Apesar da expressão do gene *GAPDH* não ter diferido com os tratamentos no intestino, a expressão do gene *ACT* foi escolhida para normalizar os dados neste tecido, para manter o mesmo padrão de normalização utilizado no fígado.

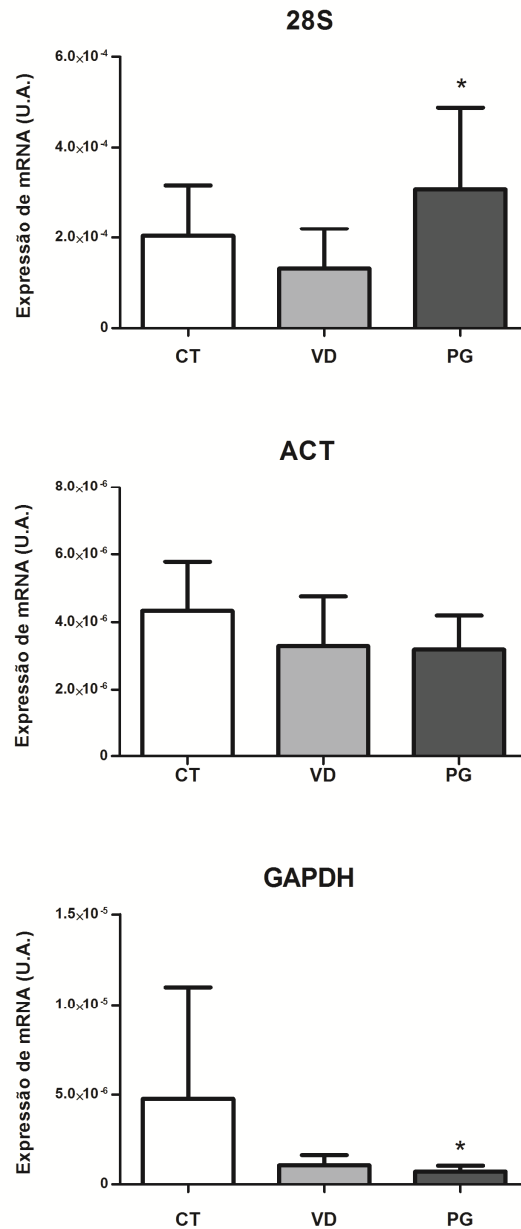


Figura 6. Expressão dos genes 28S, ACT e GAPDH no fígado de peixe *D. rerio* (n=8), 48 horas após injeção de óleo de milho (grupo controle, CT), calcitriol (VD) e pregnenolona (PG). Diferenças estatísticas em relação ao grupo controle são marcadas com um asterisco (*), $p < 0.05$.

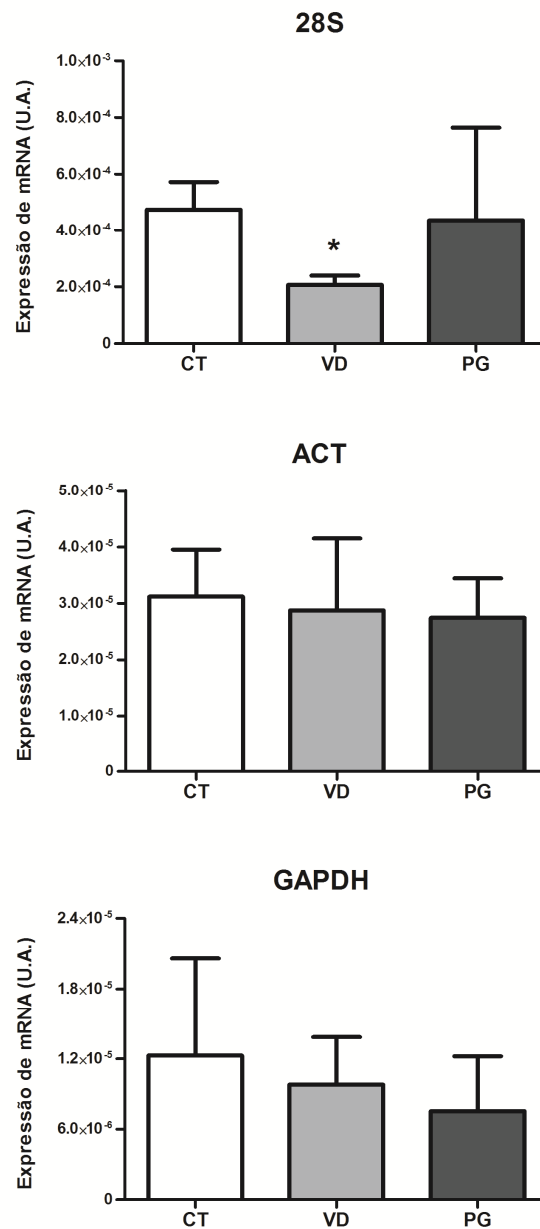


Figura 7. Expressão dos genes *28S*, *ACT* e *GAPDH* no intestino de peixe *D. rerio* (n=8), 48 horas após injeção de óleo de milho (CT), calcitriol (VD) ou pregnenolona (PG). Diferenças estatísticas em relação ao grupo controle são marcadas com um asterisco (*), $p < 0.05$.

4.3. Expressão gênica em fígado de *D. rerio*

A fim de elucidar a capacidade de ativadores dos receptores nucleares de regular a expressão de genes envolvidos no processo de biotransformação em peixes *D. rerio*, foi analisada a expressão gênica por RT-PCR em tempo real utilizando cDNA de fígado e intestino de peixes *D. rerio* tratados com o ativador do receptor nuclear VDR (calcitriol); o ativador do receptor nuclear PXR (pregnenolona) ou o veículo (óleo de milho).

No fígado, em relação à expressão dos genes da superfamília citocromo p450, observou-se um aumento de 8,4 vezes na expressão do *CYP24* na presença de calcitriol. A pregnenolona não alterou a expressão desse gene. O gene *CYP3A65* teve sua expressão aumentada 2,3 vezes na presença de pregnenolona e o gene *CYP3C1* teve sua expressão aumentada 2,5 e 2,8 vezes no fígado de animais tratados com calcitriol e pregnenolona, respectivamente (**Figura 8**).

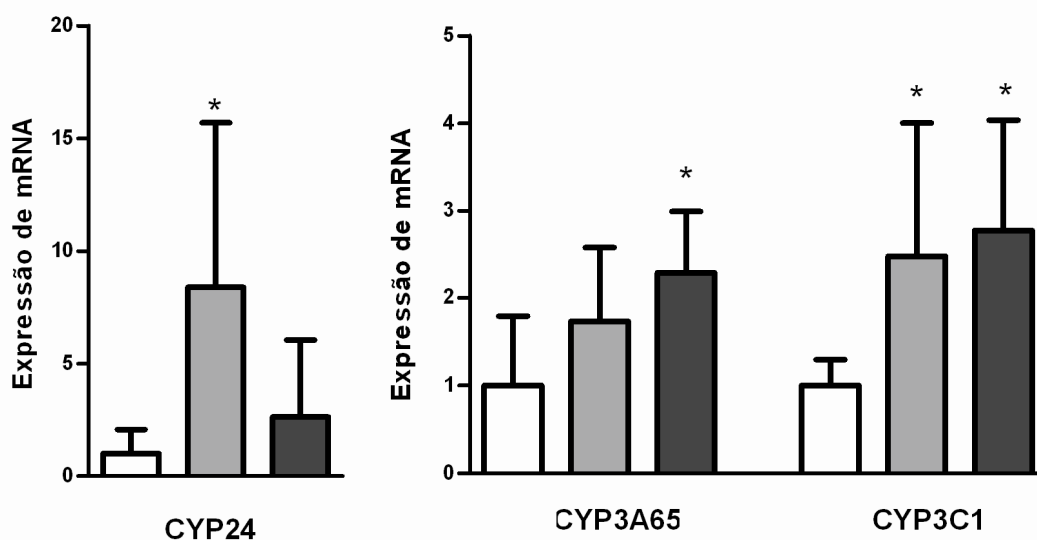


Figura 8. Expressão dos genes *CYP24*, *CYP3A65* e *CYP3C1* no fígado de peixe *D. rerio*, normalizada pela expressão do gene *ACT* e em relação ao grupo controle, 48 horas após injeção de óleo de milho (grupo controle, em branco), calcitriol (cinza) ou pregnenolona (preto). Diferenças estatísticas em relação ao grupo controle são marcadas com um asterisco (*), $p < 0.05$.

A expressão de *CYP2AA1* aumentou 3,2 vezes na presença de calcitriol e 4 vezes na presença de pregnenolona no fígado. A expressão de *CYP2AA2* teve sua expressão aumentada com o tratamento de calcitriol e pregnenolona 2,8 e 2,2 vezes, respectivamente (**Figura 9**).

Em relação à expressão dos genes que codificam enzimas de fase II do processo de biotransformação estudadas (*GST α* e *GST π*), calcitriol e pregnenolona apresentaram a capacidade de modular um aumento na expressão desses genes no fígado de *D. rerio*. O gene *GST α* aumentou 2,3 vezes no fígado dos peixes tratados com pregnenolona. A expressão desse gene não alterou com o tratamento de calcitriol. O gene *GST π* teve um aumento de 2,0 e 2,1 vezes na expressão de RNAm no fígado de peixes-zebra tratados, respectivamente, com calcitriol e pregnenolona (**Figura 10**).

A expressão do gene da proteína transportadora de fase 3, *ABCB5*, apresentou um aumento de 4 vezes no fígado dos peixes tratados com pregnenolona (**Figura 10**). A expressão desse gene não foi alterada com o tratamento de calcitriol nesse órgão.

Foi observado um aumento de 2,3 e 2,5 vezes na expressão de *PXR* nos animais tratados com calcitriol e pregnenolona, respectivamente (**Figura 11**). A expressão de *VDR α* no fígado não foi alterada após os tratamentos dos animais (**Figura 11**).

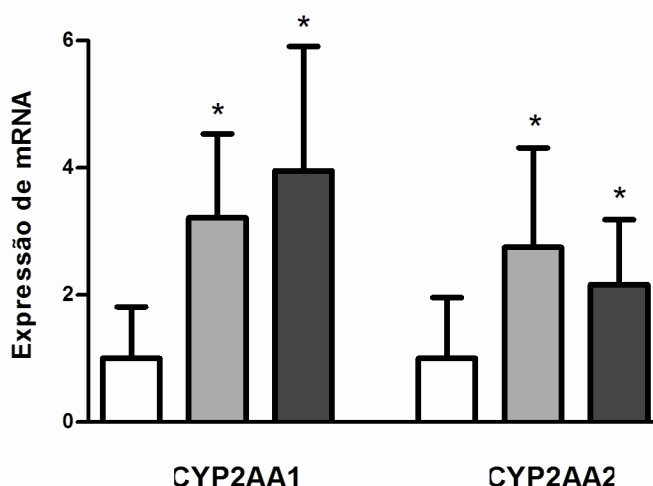


Figura 9. Expressão dos genes *CYP2AA1* e *CYP2AA2* no fígado de peixe *D. rerio*, normalizada pela expressão do gene *ACT* e em relação ao grupo controle, 48 horas após injeção de óleo de milho (grupo controle, em branco), calcitriol (cinza) ou pregnenolona (preto). Diferenças estatísticas em relação ao grupo controle são marcadas com um asterisco (*), $p < 0.05$.

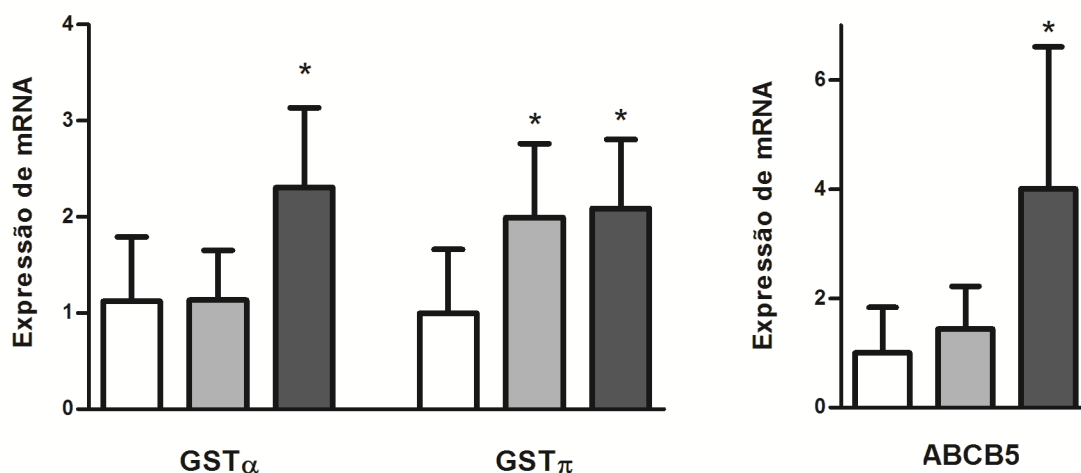


Figura 10. Expressão dos genes *GSTα*, *GSTπ* e *ABCB5* no fígado de peixe *D. rerio*, normalizada pela expressão do gene *ACT* e em relação ao grupo controle, 48 horas após injeção de óleo de milho (grupo controle, em branco), calcitriol (cinza) ou pregnenolona (preto). Diferenças estatísticas em relação ao grupo controle são marcadas com um asterisco (*), $p < 0.05$.

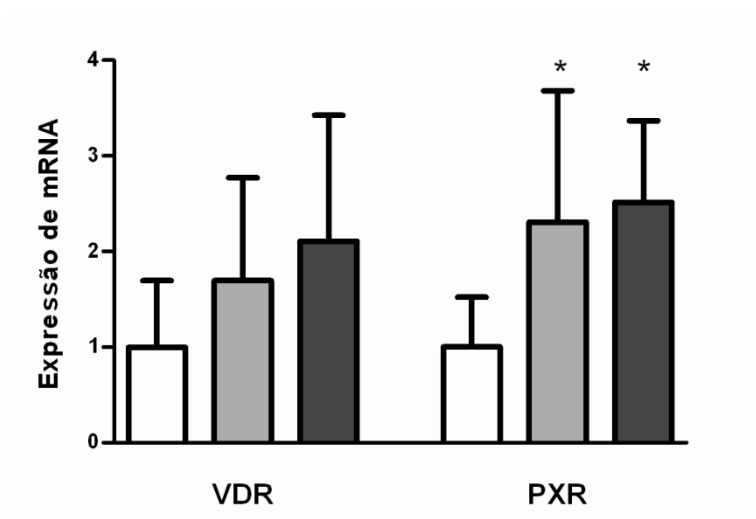


Figura 11. Expressão dos genes *VDRα* e *PXR* no fígado de peixe *D. rerio*, normalizada pela expressão do gene *ACT* e em relação ao grupo controle, 48 horas após injeção de óleo de milho (grupo controle, em branco), calcitriol (cinza) ou pregnenolona (preto). Diferenças estatísticas em relação ao grupo controle são marcadas com um asterisco (*), $p < 0.05$.

4.4. Expressão gênica no intestino de *D. rerio*

Os peixes tratados com calcitriol apresentaram um aumento de 4,4 vezes na expressão de *CYP24* intestinal. A expressão deste gene não foi alterada pelo tratamento com pregnenolona. Foi observado um aumento de 1,8 e 1,9 vezes na

expressão dos genes *CYP3A65* e *CYP3C1*, respectivamente, no intestino de peixes tratados com pregnenolona (**Figura 12**).

A expressão de *CYP2AA1* aumentou 20,3 vezes após o tratamento com calcitriol e 20,3 vezes após o tratamento com pregnenolona. A expressão de *CYP2AA2* aumentou 3,5 e 2,4 vezes, respectivamente, com o tratamento de calcitriol e pregnenolona (**Figura 13**).

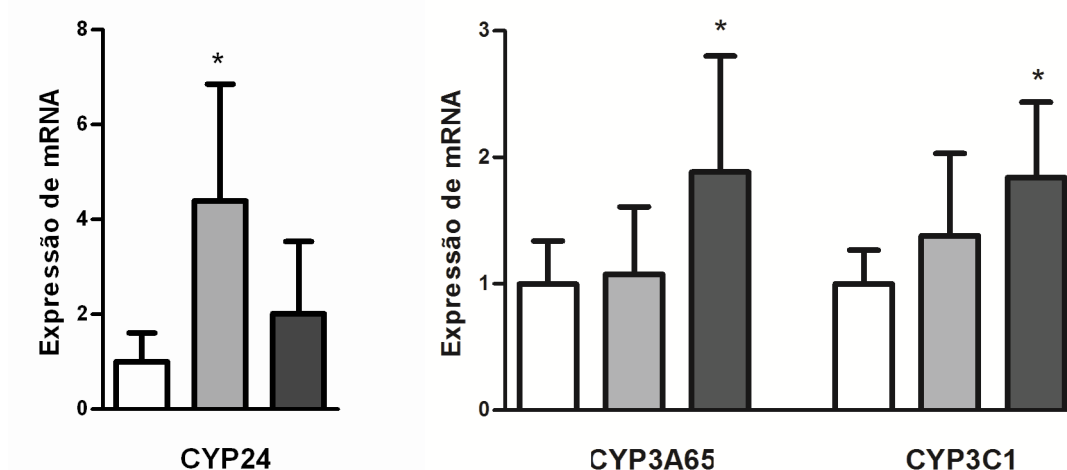


Figura 12. Expressão dos genes *CYP24A*, *CYP3A65* e *CYP3C1* no intestino de peixe *D. rerio*, normalizada pela expressão do gene *ACT* e em relação ao grupo controle, 48 horas após injeção de óleo de milho (grupo controle, em branco), calcitriol (cinza) ou pregnenolona (preto). Diferenças estatísticas em relação ao grupo controle são marcadas com um asterisco (*), $p < 0.05$.

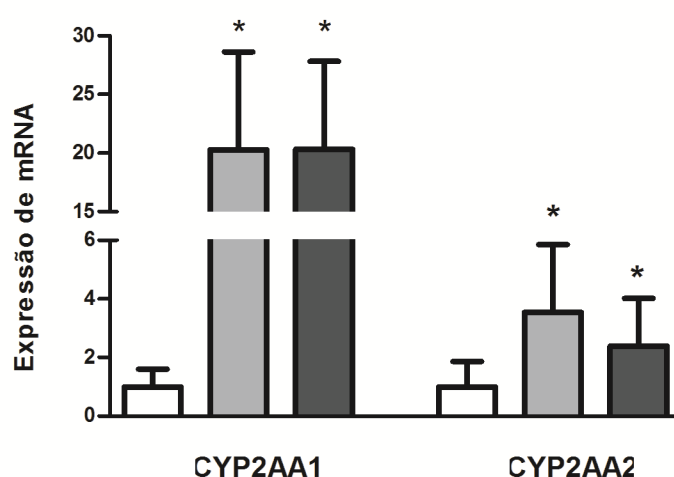


Figura 13. Expressão dos genes *CYP2AA1* e *CYP2AA2* no intestino de peixe *D. rerio*, normalizada pela expressão do gene *ACT* e em relação ao grupo controle, 48 horas após injeção de óleo de milho (grupo controle, em branco), calcitriol (cinza) ou pregnenolona (preto). Diferenças estatísticas em relação ao grupo controle são marcadas com um asterisco (*), $p < 0.05$.

O gene que codifica a *GST α* aumentou 1,6 vezes a expressão de RNAm com o tratamento de calcitriol e 1,8 vezes com o tratamento de pregnenolona. Os tratamentos de calcitriol e pregnenolona causaram, respectivamente, um aumento de 1,7 e 1,8 vezes na expressão de *GST π* . O gene *ABCB5* no intestino não variou sua expressão com os tratamentos (**Figura 14**).

Na análise da expressão dos genes dos receptores nucleares *PXR* e *VDR α* , um aumento na expressão de *PXR* foi observado no intestino. Na presença de calcitriol, a expressão desse gene aumentou 2,1 vezes e na presença de pregnenolona 3,0 vezes. O gene *VDR α* não apresentou alteração em sua expressão no intestino (**Figura 15**).

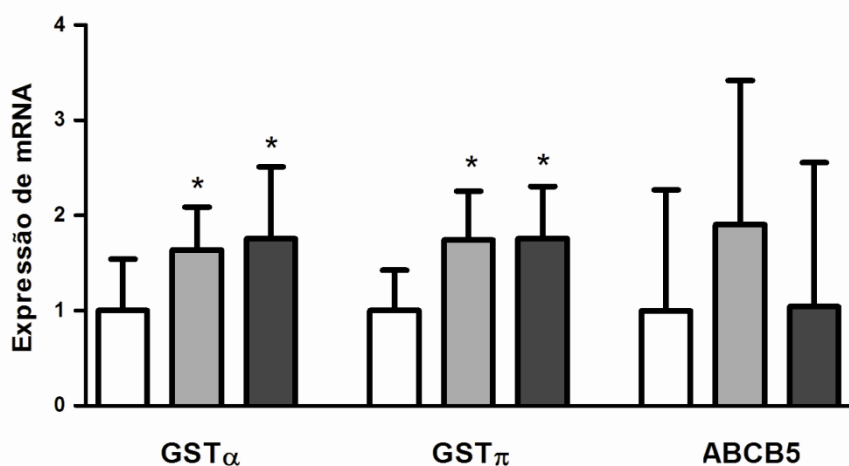


Figura 14. Expressão dos genes *GST α* , *GST π* e *ABCB5* no intestino de peixe *D. rerio*, normalizada pela expressão do gene *ACT* e em relação ao grupo controle, 48 horas após injeção de óleo de milho (grupo controle, em branco), calcitriol (cinza) ou pregnenolona (preto). Diferenças estatísticas em relação ao grupo controle são marcadas com um asterisco (*), $p < 0.05$.

As **figuras 16** e **17** resumem o efeito do calcitriol e pregnenolona, respectivamente, na expressão dos genes estudados no fígado e no intestino. Uma síntese dos resultados encontrados em cada tecido pode ser visualizada na **tabela 4**.

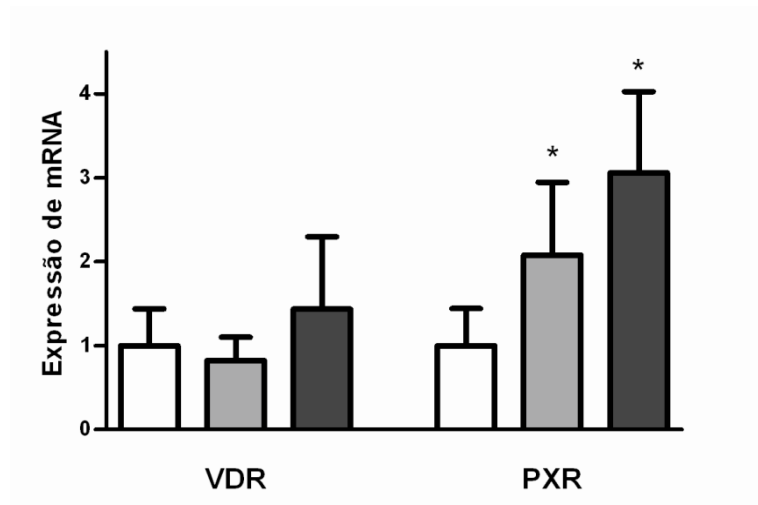


Figura 15. Expressão dos genes *VDRα* e *PXR* no intestino de peixe *D. rerio*, normalizada pela expressão do gene *ACT* e em relação ao grupo controle, 48 horas após injeção de óleo de milho (grupo controle, em branco), calcitriol (cinza) ou pregnenolona (preto). Diferenças estatísticas em relação ao grupo controle são marcadas com um asterisco (*), $p < 0.05$.

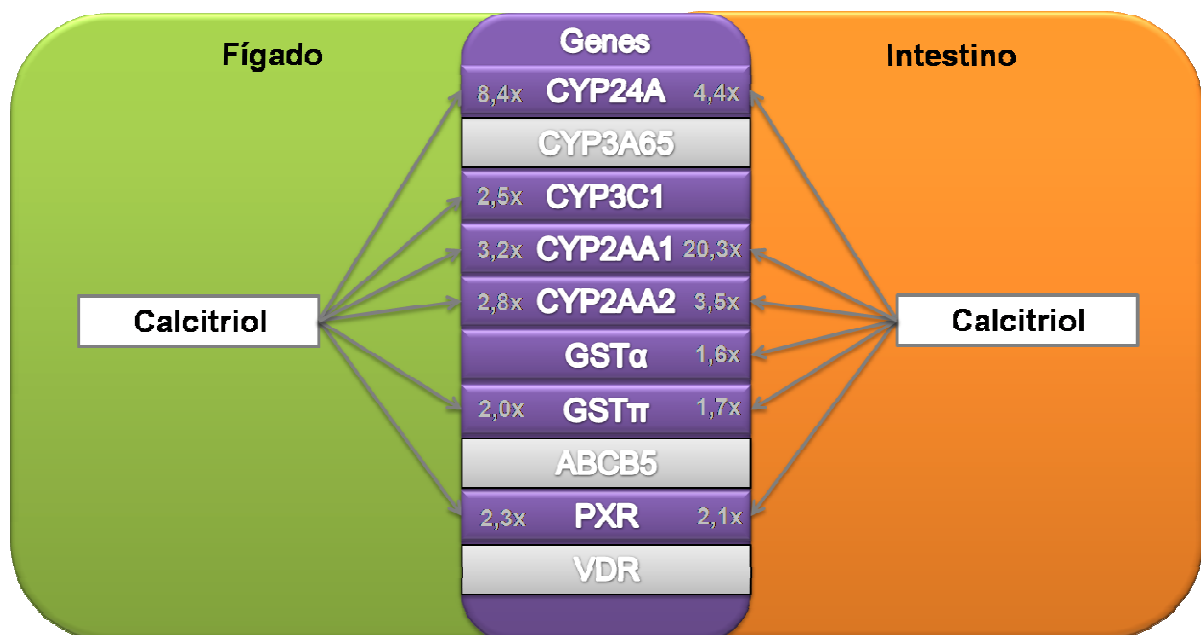


Figura 16. Efeito do calcitriol na expressão de genes no fígado e no intestino de *D. rerio*. Os números que acompanham os genes indicam quantas vezes o gene teve sua expressão aumentada em relação ao controle 48 horas após o tratamento com o hormônio.

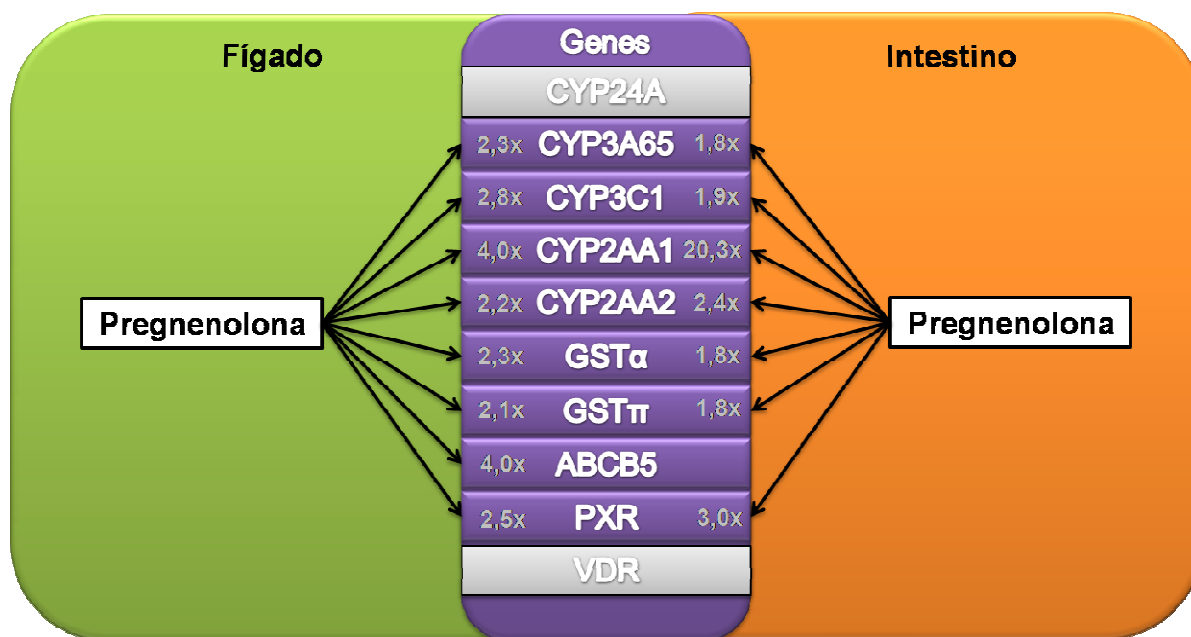


Figura 17. Efeito da pregnenolona na expressão de genes no fígado e no intestino de *D. rerio*. Os números que acompanham os genes indicam quantas vezes o gene teve sua expressão aumentada em relação ao controle 48 horas após o tratamento com o hormônio.

Tabela 4. Expressão de genes no fígado e intestino de peixe da espécie *D. rerio*, 48 horas após tratamento com calcitriol (VD) e pregnenolona (PG). A expressão de cada gene está representada quando ocorreu uma alteração em relação ao grupo controle e os valores de p são referentes ao teste *t* de Student entre grupo tratado e grupo controle. Espaços em branco indicam ausência de diferença estatística entre o grupo tratado e controle.

Gene	Fígado				Intestino			
	VD	Valor de p	PG	Valor de p	VD	Valor de p	PG	Valor de p
CYP24	8,4 x	0,0132		0,2175	4,4 x	0,0029		0,1028
CYP3A65		0,0975	2,3 x	0,006		0,7683	1,8 x	0,0451
CYP3C1	2,5 x	0,026	2,8 x	0,0031		0,1568	1,9 x	0,0032
CYP2AA1	3,2 x	0,0012	4,0 x	0,0015	20,3 x	< 0.0001	20,3 x	< 0.0001
CYP2AA2	2,8 x	0,0201	2,2x	0,0344	3,5 x	0,0123	2,4 x	0,05
GSTα		0,9688	2,3 x	0,01	1,6 x	0,0224	1,8 x	0,0378
GSTπ	2,0 x	0,0148	2,1 x	0,0071	1,7 x	0,0143	1,8 x	0,0185
ABCB5		0,3182	4,0 x	0,0077		0,2713		0,96
PXR	2,3 x	0,0248	2,5 x	0,0007	2,1 x	0,007	3,0 x	< 0.0001
VDRα		0,1472		0,1164		0,3517		0,2238

5. DISCUSSÃO

5.1. Padronização da RT-PCR quantitativa

No presente estudo, as eficiências de amplificação das curvas de cDNA de todos os genes estudados estiveram dentro dos critérios para o uso do método de comparativo de Ct (**Tabela 2 e 3**). As curvas de cDNA para o gene do 28S apresentaram eficiência de 0,94 e 0,96 para o fígado e intestino, respectivamente. Apesar de essas eficiências diferirem dos outros genes, elas são próximas e altas o suficiente para serem utilizadas nas análises.

O objetivo do uso de um gene de controle interno é usar sua expressão para normalizar, para cada amostra, a expressão do gene de interesse. Diferentes genes constitutivos, tais como do RNA ribossomal 18S, *Ubiquitina*, β -actina, β -tubulina e *Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH)* têm sido utilizados como controle interno em razão de sua esperada expressão constante e ubíqua. Os genes constitutivos possuem essa denominação porque estão presentes em todas as células eucarióticas, desempenhando importantes funções na sobrevivência celular. Assim, espera-se que a transcrição desses genes apresente somente pequenas oscilações indetectáveis na sua expressão em comparação com os demais genes. No entanto, alguns estudos mostram que até mesmo estes genes podem apresentar uma grande variação transcricional em determinadas condições experimentais (NISHIMURA et al., 2006; JAIN et al., 2006). Isso pode ser parcialmente explicado pelo fato que as proteínas codificadas por esses genes não apenas participam de funções relacionadas com o metabolismo basal, como podem também estar envolvidas com outras funções celulares (THELLIN et al., 1999; ZHONG; SIMONS, 1999). Dessa forma, deve-se certificar que a expressão do gene não varia a cada nova condição experimental antes de defini-lo como constitutivo (SCHMITTGEN; ZAKRAJSEK, 2000).

No fígado, a expressão do gene 28S aumentou no grupo tratado com pregnenolona em relação ao controle e o gene *GAPDH* teve sua expressão reduzida

no grupo tratado com pregnenolona em relação ao controle. Dessa forma, 28S e *GAPDH* não puderam ser utilizados como genes constitutivos na condição analisada. O gene escolhido para normalizar a expressão dos genes de interesse no fígado foi o gene *ACT*, que não apresentou variação estatisticamente significativa na expressão com os tratamentos conferidos aos peixes (**Figura 6**).

As actinas são algumas das proteínas mais abundantes e conservadas nas células eucarióticas. A β -actina é um gene de uma proteína estrutural envolvida na estrutura e mobilidade celular e é intensivamente utilizado como controle interno em estudos de expressão gênica (BRESOLIN; REBELO; BAINY, 2005; RESCHLY et al., 2007).

No intestino, *GAPDH* e *ACT* não apresentaram variação com os tratamentos, dessa forma, ambos poderiam ser selecionados como gene normalizador. Para esse tecido, foi selecionado apenas o gene *ACT* para normalizar os dados, por ser o mesmo gene utilizado para normalizar os dados no fígado (**Figura 7**).

5.2. Expressão de genes do processo de biotransformação

5.2.1. Genes de fase I

A capacidade de xenobióticos modularem a expressão de genes é normalmente investigada *in vitro*, a partir de metodologias que utilizam células transfectadas com esses genes ou por regiões ou domínios específicos dos mesmos, tendo como alvo as mudanças nos níveis de expressão de proteínas ou do RNAm, ou então, em ensaios utilizando-se genes repórteres. Embora os ensaios *in vitro* representem uma ferramenta quantitativa simples na triagem de compostos que possam ser ativadores de genes, os resultados não podem ser seguramente correlacionados aos sistemas biológicos, devido à complexidade desses sistemas. Dessa forma, os sistemas *in vivo* se tornam importantes ferramentas na avaliação de possíveis interações entre sistemas de sinalização, regulação e metabolismo do organismo. O estudo de mecanismos de regulação dos genes estudados no presente trabalho torna-se de grande relevância, levando-se em consideração o

pequeno número de trabalhos *in vivo* incluindo a expressão desses genes em espécies que não sejam mamíferos. No presente estudo, foi escolhida a espécie de peixe-zebra, a qual tem sido apontada como uma proeminente espécie de vertebrado em estudos farmacológicos (GOLDSMITH, 2004).

A expressão dos genes *CYP24*, *CYP3C1*, *CYP3A65*, *CYP2AA1*, *CYP2AA2*, *GSTα*, *GSTπ*, *ABCB5*, *VDRα* e *PXR* foi avaliada no fígado e no intestino de peixes tratados com pregnenolona ou calcitriol, respectivamente agonistas dos receptores nucleares PXR e VDR.

O gene *CYP24* codifica a enzima mitocondrial Vitamina D-24 hidroxilase. Essa enzima catalisa a oxidação da cadeia lateral da 1 α ,25-diidroxivitamina D3 e representa a primeira reação da via de degradação desse hormônio (KATO, 2000). CYP24-Hidroxilase converte 1 α ,25(OH)₂D3 em 1 α ,24,25 (OH)₃D3. Esse produto apresenta atividade hormonal diminuída e é posteriormente convertido em ácido calcitróico, conhecido como o produto final da degradação da Vitamina D, que é excretado pela bile (DUSSO, 2003).

Em mamíferos, a expressão da enzima CYP24A aumenta intensamente na presença de calcitriol (HAUSSLER et al., 1998). Esse efeito é consequência do aumento da expressão do gene, que é regulado positivamente pelo VDR ativado por calcitriol, tanto no intestino quanto no fígado (KATO, 2000; ZHOU et al., 2006). Em camundongos e humanos, a regulação exercida pelo VDR na expressão do gene *CYP24* ocorre através da interação desse receptor com dois elementos de resposta VDRE presentes na região promotora do gene *CYP24* (PASCUSI et al., 2005).

No intestino e fígado de peixes *D. rerio* tratados com calcitriol ocorreu um aumento na expressão de *CYP24* (**Figuras 8 e 12**). Se o mesmo padrão de regulação na expressão de *CYP24* que ocorre em mamíferos ocorrer nos peixes *D. rerio*, é possível que esse aumento na expressão seja devido à ativação do VDR pelo calcitriol.

Em peixes injetados com pregnenolona, não foi observado alteração na expressão do gene *CYP24* em ambos tecidos analisados (**Figuras 8 e 12**). Foi demonstrado que o PXR de humanos não apresenta a capacidade de modular a expressão de *CYP24* *in vitro* e *in vivo* no intestino e no fígado (ZHOU et al., 2006). Além disso, esse receptor não transativa o promotor de *CYP24* (ZHOU et al., 2006). Em camundongos alimentados com PCN, um ativador de PXR, a expressão de *CYP24* não foi alterada no intestino e fígado, indicando que possivelmente o PXR

não está envolvido na regulação da expressão de *CYP24* nesta espécie (ZHOU; VERMA; BLUMBERG, 2009). No entanto, esses resultados contradizem com o trabalho de Pascussi e colaboradores (2005), que demonstraram que o PXR apresenta a capacidade de se ligar a elementos de resposta do tipo VDRE na região promotora do gene *CYP24A* e ativar a transcrição desse gene em humanos e camundongos.

As seqüências de aminoácidos deduzidas de *CYP3* de *D. rerio*, *CYP3C1* e *CYP3A65*, possuem uma identidade de 53%. Diferenças quanto à atividade, preferência de substrato e expressão em diferentes tecidos ainda não foram demonstradas para essas enzimas (CORLEY-SMITH et al., 2006; TSENG et al., 2005).

Em mamíferos, a família *CYP3* é um dos mais importantes grupos da superfamília de citocromo p450, pois é responsável pelo metabolismo de mais de 50% das drogas usadas clinicamente e muitos químicos xenobióticos (GUENGERICH, 1999).

A expressão de *CYP3A* em mamíferos é mediada pelo receptor nuclear PXR, que pode ser ativado por esteróides e xenobióticos (WILSON; KLIEWER, 2002). Similar aos mamíferos, alguns xenobióticos e compostos endógenos podem induzir a expressão de *CYP3A* em peixes. A indução na expressão de *CYP3A* por químicos foi demonstrada em bacalhau por alquilfenóis (HASSELBERG et al., 2004), em salmão do Atlântico por 4-nonilfenol (MEUCCI; ARUKWE, 2006) e em truta arco-íris e peixe do canal (*killifish*) por cetoconazol (HEGELUND et al., 2004).

Em larvas de *D. rerio*, o tratamento com ativadores do PXR, rifampina e dexametaxona, aumentou a expressão de *CYP3A65* no intestino posterior (TSENG et al., 2005), indicando que a regulação da expressão do gene nessa espécie de peixe também possa ocorrer via PXR. Este resultado corrobora com o encontrado nesse trabalho, em que a expressão de *CYP3A65* aumentou no intestino e no fígado dos peixes tratados com ativador do PXR, pregnenolona, e juntos eles sugerem que a modulação desse gene em peixes-zebra seja pelo PXR (**Figuras 8 e 12**).

O VDR apresenta a capacidade de regular a expressão do gene *CYP3A4* de humanos e *CYP3A1* de camundongos. Em células intestinais humanas, o complexo $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -VDR ativa a transcrição de *CYP3A4*. Esse processo é realizado pela formação do heterodímero VDR-RXR que reconhece o elemento de resposta ER6 na região promotora do gene, um elemento de resposta geralmente associado ao

PXR (THUMMEL et al., 2001). O VDR pode se ligar também a elementos resposta VDRE na região promotora de *CYP3A4* e ativar a transcrição desse gene (THOMPSON et al., 2002).

A regulação da expressão de *CYP3A4* pelo VDR também foi demonstrada em células hepáticas humanas. Assim como no intestino, o mecanismo envolvido nessa regulação ocorre através da interação do receptor VDR com elementos de regulação *cis* da região promotora do gene que são denominados PXRE (DROCOURT et al., 2002).

No presente trabalho, não foi observada alteração na expressão de *CYP3A65* no fígado e no intestino dos peixes tratados com calcitriol (**Figuras 8 e 12**).

Makashima et al. (2002) demonstrou que o ácido litocólico, um ácido biliar de elevada toxicidade, ativa o VDR aumentando a expressão do gene *CYP3A4* em enterócitos humanos. Esse processo tem sido considerado um mecanismo de defesa contra compostos tóxicos no intestino de mamíferos. Este metabólito da bile humana e outros metabólitos biliares, incluindo os de peixes, não apresentam a capacidade de ativar o VDR de *D. rerio* em concentrações fisiológicas (RESCHLY et al., 2007). Somados aos resultados encontrados neste trabalho, em que o ativador do VDR não apresentou a capacidade de induzir a expressão de *CYP3A65*, sugere-se que o papel de xenosensor ativado por metabólitos biliares e posterior modulação na expressão de *CYP3A*, não seja executada pelo VDR de peixes.

Além da expressão de *CYP3A65*, no presente trabalho foi analisada a expressão do gene *CYP3C1*. Previamente em nosso laboratório, foi demonstrada a indução dos genes *CYP3C1*, *ABCB5* e *PXR* em fígado de *D. rerio* tratados através de injeção intraperitoneal com PCN (pregnenolona-16 α -carbonitrila) (BRESOLIN; REBELO; BAINY, 2005). O PCN é um dos maiores ativadores do PXR em camundongos (EKINS et al., 2008). Os resultados encontrados no presente trabalho demonstraram um aumento na expressão desses mesmos genes no fígado de peixes tratados com pregnenolona (**Figuras 8 e 12**). A pregnenolona ativa o PXR do peixe *D. rerio* em experimentos com células transfectadas (EKINS et al., 2008).

Esses dois ativadores do PXR, pregnenolona e PCN, apresentam a capacidade de regular a expressão de *CYP3C1*, *ABCB5* e *PXR* no fígado dos peixes *D. rerio*. Juntos, esses resultados suportam a hipótese de que a indução desses genes *in vivo* nessa espécie de peixe pode ser atribuída ao controle exercido pelo

PXR, demonstrando um sistema de controle da expressão dos genes conservada entre peixes e mamíferos.

Além disso, o aumento da expressão de *CYP3C1* e *PXR* no intestino dos peixes injetados com pregnenolona sugere que o mecanismo de regulação desses genes no intestino também seja via PXR (**Figuras 8 e 12**). A diferença na expressão do receptor nuclear e proteínas co-reguladoras entre os dois tecidos podem explicar diferenças na expressão do *ABCB5* que não apresentou um aumento na sua expressão no intestino (GUREVICH; FLORES; ANESKIEVICH, 2007).

Larvas de peixe-zebra tratadas com dexametasona e rifampicina, ativadores de PXR em mamíferos, não desencadearam um aumento na expressão de *CYP3C1* (CORLEY-SMITH et al., 2006), o que sugere uma diferença na regulação da expressão desse gene relacionada com o estágio de desenvolvimento.

O calcitriol aumentou a expressão de *CYP3C1* no fígado de *D. rerio* (**Figura 8**). Devido à importância da família CYP3 no metabolismo de xenobióticos no fígado, o aumento da expressão desse gene na presença de calcitriol, sugere o possível papel do VDR como modulador da resposta de detoxificação em peixes. Além disso, nesse tecido, *CYP3C1* teve sua expressão aumentada na presença de ambos os ativadores de PXR e VDR, o que sugere que a regulação desse gene pode ser intermediada pelos dois receptores nos peixes.

Interessantemente, ambos os genes da família CYP3 estudados nesse trabalho (*CYP3C1* e *CYP3A65*) aparentemente foram modulados no fígado e no intestino após o tratamento com o agonista do PXR, sugerindo um padrão semelhante ao observado em mamíferos.

As seqüências de aminoácidos deduzidas de *CYP2AA1* e *CYP2AA2* apresentam identidade de 83%. As enzimas *CYP2AA1* e *CYP2AA2* ainda não foram caracterizadas funcionalmente, mas baseado no padrão de expressão destes genes nos tecidos de *D. rerio*, possivelmente *CYP2AA1* está envolvido no metabolismo de xenobióticos e *CYP2AA2* no metabolismo de xenobióticos e compostos endógenos (BAINY et al., 2005).

Os resultados encontrados neste trabalho demonstraram um aumento na expressão de *CYP2AA1* e *CYP2AA2* em ambos os tecidos na presença da pregnenolona (**Figuras 9 e 13**), sugerindo que estes genes possam ser modulados por PXR.

Em mamíferos, a regulação da expressão dos genes da família *CYP2* é atribuída principalmente ao receptor nuclear CAR (WEI et al., 2002; MAGLICH et al., 2002). PXR e CAR são membros proximamente relacionados na família dos receptores nucleares e dividem a função de mediação da resposta de detoxificação (KRETSCHMER; BALDWIN, 2005).

Interessantemente, esse receptor não está presente em peixes. CAR originou-se tardiamente na evolução dos tetrápodes. Supõe-se que um único gene ancestral similar ao *PXR* duplicou e divergiu no começo da evolução dos mamíferos, dando origem aos genes *PXR* e *CAR* encontrados nos mamíferos modernos. Supõe-se que o produto do gene ancestral executava a função que hoje é dividida pelos dois receptores (EKINS et al., 2008).

Baseado na hipótese de que PXR e CAR originaram-se de um único gene ancestral representado pelo PXR em peixes, supõe-se que a indução dos genes *CYP2AAs* em *D. rerio* na presença de pregnenolona seja intermediada pelo PXR. Além disso, os resultados encontrados nesse trabalho corroboram com a hipótese de que o gene ancestral, que deu origem a PXR e CAR em mamíferos, executava as funções que em mamíferos é dividida por ambos receptores (RESCHLY; KRASOWSKI, 2006).

Ativadores do PXR em mamíferos, TCPOBOP e fenobarbital, não alteram a expressão dos genes *CYP2AA1* e *CYP2AA2* nos peixes-zebra (BAINY et al., 2005). Entretanto, o TCPOBOP não ativa o PXR desta espécie de peixe e a eficácia de ativação do fenobarbital é pequena (5% em relação a pregnenolona) (EKINS et al., 2008). A inativação ou baixa ativação do receptor PXR em peixe-zebra pode explicar a ausência de modulação desses químicos na expressão de *CYP2AA1* e *CYP2AA2* nesta espécie.

O aumento da expressão dos genes *CYP2AA1* e *CYP2AA2* na presença de calcitriol sugere que o receptor nuclear VDR também esteja envolvido na regulação da expressão desses genes (**Figuras 9 e 13**).

Apesar de não haver trabalhos caracterizando as enzimas *CYP2AA1* e *CYP2AA2*, o aumento de mais de 20 vezes na expressão do gene *CYP2AA1* no intestino dos peixes tratados com pregnenolona e calcitriol aponta para um possível papel de *CYP2AA1* na detoxificação de compostos tóxicos provenientes da dieta.

5.2.2. Genes de fase II e III

O PXR regula genes que codificam várias enzimas de fase II do processo de biotransformação em mamíferos, como GSTs, Glucuronosiltransferases e Sulfotransferases. Além disso, este receptor regula a expressão de genes de proteínas transportadoras, como MDR1 e MDR2 (MAGLICH et al., 2002).

As enzimas da família Glutathione S-transferase estão envolvidas na detoxificação celular de xenobióticos eletrofílicos como drogas anti-câncer, herbicidas, pesticidas, carcinógenos químicos e poluentes ambientais (HAYES; FLANAGAN; JOWSEY, 2005). Essa família de enzimas catalisa a conjugação do tripeptídeo glutathione com substratos hidrofóbicos eletrofílicos, protegendo a célula de danos causados por esses compostos (BOARD et al., 2000).

Em peixes, a modulação de GST por xenobióticos foi relatada em *Poecilia vivipara* expostos a fração solúvel de óleo diesel (MATTOS et al., 2009) e em *Sparus auratus* e truta arco-íris (*Onchorhynchus mykiss*) na presença de nonilfenol (CARRERA et al., 2007; UGUZ et al., 2003). No entanto, não há estudos associando o PXR com a modulação da expressão de genes da família GST em peixes.

Em camundongos, a regulação de GSTs pelo PXR parece ser tecido-, isoenzima- e sexo-específico (GONG et al., 2006).

O PXR regula a expressão do gene *GST α* no fígado e intestino de mamíferos (MAGLICH et al., 2002; GONG et al., 2006) e no presente estudo, a expressão do gene *GST α* aumentou na presença de pregnenolona, no intestino e no fígado de peixes-zebra (**Figuras 10 e 14**). Em camundongos transgênicos expressando o PXR humano, *GST α* teve a expressão regulada por esse receptor no intestino (GONG et al., 2006) e em camundongos com expressão constitutiva de PXR, *GST α* teve sua expressão aumentada no fígado (ROSENFELD et al., 2003). Em experimentos *in vitro* com hepatócitos de camundongo, ligantes de PXR apresentaram a capacidade de regular a expressão da *GSTA2*. Nesta espécie, o PXR regula a expressão de *GSTA2* interagindo com outros fatores de transcrição que se associam ao elemento de resposta a antioxidantes (ARE), presente na região promotora desse gene (FALKNER et al., 2001).

O tratamento com calcitriol aumentou a expressão de *GST α* no intestino dos peixes-zebra (**Figura 14**). Em intestino de camundongos, o tratamento com calcitriol causou um aumento na expressão do gene *GST α* . É possível que o efeito desencadeado pelo calcitriol na expressão deste gene seja devido a ativação do VDR (KUTUZOVA; DELUCA, 2006).

A expressão de *GST π* aumentou com o tratamento de pregnenolona em ambos tecidos analisados (**Figuras 10 e 14**). Além da *GST α* , os genes *GST π* e *GST μ* são também regulados pelo PXR em camundongos. Nesta espécie, o controle da expressão de *GST π* pelo PXR parece ser sexo específico, uma vez que a expressão desse gene foi induzida no fígado de fêmeas e suprimida em machos (GONG et al., 2006). Em fígado de camundongos machos com expressão constitutiva de PXR, a expressão do gene *GST π* também reduziu (ROSENFELD et al., 2003). Em hepatócitos humanos, a expressão desse gene aumentou com o tratamento de rifampicina (RAE et al., 2001). No presente trabalho, não foi feita a identificação do sexo dos animais, o que torna inviável correlacionar o sexo dos animais e a expressão desse gene.

O tratamento com calcitriol também aumentou a expressão do gene *GST π* em fígado e intestino de peixe-zebra (**Figuras 10 e 14**). A expressão desse gene reduziu 3 horas após administração de calcitriol no intestino de camundongos machos, o que sugere novamente que o controle da expressão desse gene nesta espécie seja sexo específico (KUTUZOVA; DELUCA, 2006). Em fígado e intestino do peixe *Poecilia vivipara*, ocorreu um aumento na atividade de GST total 48 horas após o tratamento com calcitriol, sugerindo um papel desse hormônio na modulação dessa enzima em peixes, que pode ser em nível de transcrição gênica, o que corroboraria com os resultados encontrados no presente trabalho (SIEBERT et al., em preparação).

A proteína transportadora de membrana ABCB5 é o terceiro membro da família das glicoproteínas-P (PgP) próxima aos seus parálogos estruturais ABCB1 e ABCB4 em humanos. Estudos mostram que ABCB5, assim como ABCB1, age no efluxo de drogas, utilizando como fonte de energia o ATP (FRANK et al., 2005).

Em animais aquáticos, a excreção de xenobióticos pelas proteínas transportadoras do tipo *ATP-binding cassetes* (ABC- *ATP-binding cassetes*) são um passo crucial do processo de detoxificação. Proteínas do tipo ABC transportam uma ampla gama de metabólitos e xenobióticos através da membrana celular pela

hidrólise de um ATP, resultando em uma redução intracelular da concentração de xenobióticos e redução do potencial tóxico (CAMINADA et al., 2008).

Em humanos, o gene *MDR1*, que codifica a proteínas ABCB1, tem sua expressão regulada pelo receptor nuclear PXR (GEICK; EICHELBAUM; BURK, 2001). Essa regulação é positiva no intestino e no fígado dessa espécie. No presente trabalho, foi encontrado um aumento na expressão do gene *ABCB5* no fígado de peixe *D. rerio* (**Figura 10**). Como citado anteriormente, esse resultado corrobora com os dados de Bresolin, Rebelo e Bainy (2005) que encontraram um aumento na expressão de *ABCB5* no fígado de *D. rerio* tratados com PCN.

Além disso, a expressão desse gene aumentou em fígado de peixes-zebra tratados com o sal biliar 5 α -ciprinol 27-sulfato. *In vitro*, esse sal biliar apresenta a capacidade de ativar o PXR de *D. rerio* em concentrações superiores a 10 μ M (RESCHLY et al., 2007).

O hormônio calcitriol não alterou a expressão do gene *ABCB5* em peixes-zebra. Em cultura de células intestinais humanas, o calcitriol aumentou a expressão do gene *MDR1* (FAN et al., 2009). Elementos de resposta funcionais ao receptor VDR na região promotora desse gene foram identificados (SAEKI et al., 2008), demonstrando que o receptor nuclear VDR está diretamente relacionado com a regulação na expressão desse gene em humanos.

A co-indução dos genes *CYP3A4* e *MDR1* em mamíferos é um resultado comumente observado após a ativação do PXR. O aumento concomitante de genes da família CYP3 (*CYP3A65* e *CYP3C1*) e de um gene de uma proteína transportadora (*ABCB5*) no fígado de peixes tratados com pregnenolona sugere uma intrínseca associação entre esses três genes na espécie de peixe-zebra. Além disso, sugere que o PXR possivelmente regula a expressão dos genes *CYP3A65*, *CYP3C1* e *ABCB5* em peixes, assim como previamente demonstrado em mamíferos, indicando a existência de uma conservação evolutiva deste mecanismo.

5.2.3. Genes de receptores nucleares

Foi demonstrado que a expressão do gene *PXR* em humanos é negativamente controlada pelo PXR, ou seja, o PXR pode agir em retroalimentação

negativa, regulando a expressão de seu gene, o que evita a superexpressão de PXR e seus genes alvos. Nessa mesma espécie, o VDR não possui controle direto na expressão do gene *PXR* (AOUABDI; GIBSON; PLANT, 2006).

No presente trabalho, em ambos os tecidos estudados, ocorreu um aumento na expressão do gene *PXR* na presença dos ativadores de PXR e VDR (**Figuras 11 e 15**). Como já citado, foi demonstrado um aumento na expressão de *PXR* em fígado de peixes-zebra tratados com PCN, suportando a hipótese de que nesta espécie, o gene *PXR* seja positivamente modulado pelo próprio receptor nuclear PXR (BRESOLIN; REBELO; BAINY, 2005). Supondo que o gene *PXR* transcrito seja traduzido em proteína, esses resultados sugerem que VDR e PXR podem potencializar a resposta a xenobióticos através do aumento da transcrição do gene *PXR*, que culminaria com uma maior expressão da proteína e sua resposta no controle da expressão de genes envolvidos no processo de detoxificação.

A expressão do gene *VDR α* não foi alterada nos dois tecidos estudados e na presença dos dois ligantes utilizados (**Figuras 11 e 15**). O gene *VDR* de humanos não possui o elemento de resposta a PXR na região promotora, sugerindo que este receptor nuclear não participe diretamente na regulação da expressão de *VDR* (MIYAMOTO et al., 1997).

Estudos sobre a relação do VDR na regulação do gene *VDR* demonstraram a capacidade do calcitriol em induzir a expressão do gene *VDR* em diversos tipos celulares em mamíferos (ZELLA et al., 2006; WIETZKE et al., 2005). Apesar de Miyamoto e colaboradores (1997) sugerirem que o efeito de calcitriol ser indireto na regulação de *VDR*, foi demonstrado que este gene é regulado em nível transcricional diretamente pelo VDR ativado pelo calcitriol em humanos (WIETZKE et al., 2005). Além disso, a regulação direta do calcitriol na expressão do gene *VDR* foi demonstrada em camundongos. Nesta espécie, a regulação ocorre através da interação do VDR com *enhancers* localizado em regiões intrônicas desse gene (ZELLA et al., 2006).

5.3. Os ligantes dos receptores nucleares VDR e PXR

O calcitriol ou 1 α ,25-diidroxitamina D3 é o ativador mais eficaz do VDR em vertebrados, incluindo o peixe *D. rerio* (RESCHLY et al., 2007). Essa molécula possui a capacidade de ativar o receptor VDR/PXR (igualmente relacionado a ambos receptores) em *Ciona intestinalis*. Além do calcitriol, outros metabólitos da Vitamina D3 ativaram o receptor de *D. rerio* em ensaios *in vitro*. Entre esses compostos estão: 1 α -hidroxivitamina D2, 1 α -hidroxivitamina D3, 25-hidroxivitamina D3 e 24(R),25-(OH)₂-vitamina D3 (RESCHLY et al., 2007). Além disso, o calcitriol possui alta especificidade de ligação pelo VDR, não possuindo a capacidade de ativar outros receptores nucleares, entre eles PXR e FXR (KRASOWSKI et al., 2005; MAKASHIMA et al., 2002).

A capacidade de ativação do VDR de peixe-zebra por 76 compostos ligantes de receptores nucleares foi testada *in vitro*. Além do calcitriol, nenhum dos compostos testados apresentou a capacidade de ativar esse receptor. Entre os compostos havia ativadores do receptor Farnesóide X e Receptor X de Fígado α e β (RESCHLY et al., 2007).

Juntos, esses dados demonstram a especificidade da interação entre VDR e calcitriol, pois outras moléculas ativadoras de receptores nucleares não possuem a capacidade de ativar esse receptor, além disso, o calcitriol possui alta especificidade de ligação pelo VDR e não apresenta a capacidade de ativar outros receptores nucleares. Baseado nisso, a alteração na expressão gênica encontrada no presente trabalho no fígado e no intestino dos peixes da espécie *D. rerio* tratados com calcitriol pode ser atribuída à ativação do VDR e regulação exercida por este na expressão dos genes estudados.

A descrição encontrada na literatura científica quanto à especificidade de ligação para o PXR é oposta ao VDR. Enquanto o VDR é caracterizado por uma ligação específica com o seu ligante, o PXR é caracterizado pela promiscuidade de ligação (MATIC et al., 2007).

O composto utilizado no presente trabalho como ligante do PXR, a pregnenolona, foi capaz de ativar o PXR de *D. rerio* e induzir a transcrição de um gene repórter em culturas de células (EKINS et al., 2008).

Para estudos *in vivo*, a escolha de uma molécula ativadora do PXR é uma questão que exige atenção, pois a molécula escolhida possivelmente será metabolizada pelas enzimas da superfamília p450 (reguladas pelo PXR) e os produtos formados poderão ser ativadores do próprio PXR ou de outros receptores nucleares.

A pregnenolona dá origem a diversos outros hormônios, entre eles os mineralocorticóides: aldosterona e corticosterona; o glicocorticóide cortisol e os andrógenos: diidrotestosterona, progesterona e estradiol (NORMAN; LITWACK, 1997). Destes metabólitos da pregnenolona, os seguintes apresentam a capacidade de ativar o PXR do peixe *D. rerio* em uma concentração inferior a 10µM: metabólitos da progesterona, testosterona e metabólitos, androstenediona, diidrotestosterona e estradiol (EKINS et al., 2008). A ativação do PXR por metabólitos da pregnenolona, e não pela pregnenolona em si, não acarreta em erros de interpretação da hipótese de ativação do PXR. Dessa forma, a alteração na expressão gênica encontrada no presente trabalho nos peixes tratados com pregnenolona poderia ser atribuída a ativação do PXR e regulação exercida por este na expressão dos genes estudados.

Entretanto, os hormônios originados a partir da pregnenolona podem ativar outros receptores nucleares. Dentre os hormônios que são originados a partir da pregnenolona há ativadores dos seguintes receptores nucleares: Receptor de Mineralocorticóide, Receptor de Glicocorticóides, Receptor de Andrógenos, Receptor de Estradiol e Receptor de Progesterona (MANGELSDORF et al., 1995).

Alguns dos genes estudados podem ser regulados por esses receptores nucleares. Em humanos, o Receptor de Glicocorticóides pode regular o *CYP3A4*, *CYP3A5* (PASCUSI et al., 2003) e *MDR1* (SÉRÉÉ et al., 1998) e Receptor de Estradiol regula o gene *PXR* (AOUABDI; GIBSON; PLANT, 2006). Não foram encontrados referências na literatura relacionando os genes estudados com os receptores de progesterona, androgênios e mineralocorticóides.

Os vários receptores que coexistem com sua especificidade ou promiscuidade podem atuar simultaneamente aumentando ou reduzindo a ação dos mesmos genes, fenômeno conhecido como sinalização cruzada. Assim, não se pode descartar a possibilidade de que metabólitos da pregnenolona injetada poderiam ativar outros receptores nucleares e que estes poderiam estar envolvidos na modulação dos genes estudados de maneira direta ou indireta, principalmente os

receptores de Glicocorticóide e Estradiol. Dessa forma, o resultado na variação da expressão gênica encontrado não seria consequência apenas da ativação do PXR.

5.4. VDR e PXR: origem e função

PXR e *VDR* possivelmente se originaram da duplicação de um gene ancestral (KRASOWSKI et al., 2005). Uma possível origem em comum desses receptores instiga a questão sobre a função do receptor ancestral de *VDR* e *PXR*. Uma das funções propostas para o receptor ancestral é de mediação da resposta de detoxificação. Assumindo-se essa hipótese, a função de modulação compartilhada por *PXR* e *VDR* na expressão de alguns genes em mamíferos seria um resquício evolutivo de uma origem comum e não uma característica adquirida posteriormente. Os resultados encontrados no presente trabalho sugerem que *PXR* e *VDR* regulam genes da fase I, II e III do processo de biotransformação de xenobióticos em peixes. A possibilidade de *VDR* e *PXR* compartilharem a modulação da resposta de detoxificação em peixes suporta a hipótese de que a mediação da detoxificação poderia ser a função, ou uma das funções, desempenhada pelo receptor ancestral de *PXR* e *VDR*. No entanto, a ausência de informações correlacionando a expressão de genes de biotransformação e os receptores nucleares *PXR* e *VDR* em grupos de vertebrados, além de mamíferos, impossibilita uma análise mais profunda sobre essa questão.

Em mamíferos, o *VDR* parece ser especializado na regulação da absorção de cálcio no intestino e crescimento de pêlos em animais terrestres (WHITFIELD et al., 2005). Essas características parecem ligadas a adaptação ao ambiente terrestre, pois a absorção de cálcio pelo intestino permite a mineralização do esqueleto para a locomoção em um ambiente com escassez de cálcio e o crescimento de pêlos protege contra a radiação UV do sol. Além disso, o *VDR* parece ter retido a habilidade do *PXR* de efetivar a detoxificação de xenobióticos via ativação da transcrição de genes de enzimas de biotransformação. Dessa forma, nesse grupo de animais, o *VDR* parece complementar a função do *PXR* de mediar a resposta de detoxificação (WHITFIELD et al., 2005).

No ambiente aquático, o cálcio não representa um fator limitante e em peixes essa molécula é absorvida pelas brânquias e não pelo intestino, como nos mamíferos. Além disso, peixes cartilaginosos também apresentam VDR (WHITFIELD et al., 2003). Dessa forma, as funções especializadas do VDR em mamíferos na absorção de cálcio e crescimento de pêlos não podem ser extrapoladas para os peixes, o que sugere que a função de mediador da detoxificação seja ainda mais importante nesse grupo de animais e o papel do VDR na mediação da detoxificação em peixes se mostra uma questão interessante para futuras pesquisas.

Os resultados encontrados no presente trabalho demonstraram que ativadores do PXR e do VDR possuem a habilidade de induzir genes da fase I, II e III do processo de biotransformação em peixes-zebra, no intestino e no fígado. Se assumirmos que os ligantes calcitriol e pregnenolona estão ativando VDR e PXR, respectivamente, esses resultados suportam a hipótese de que os dois receptores da subfamília NR1I, PXR e VDR, dividem a função de mediadores da detoxificação em peixes, assim como previamente demonstrado em mamíferos.

6. CONCLUSÕES

Neste trabalho, foi demonstrado que agonistas dos receptores nucleares PXR e VDR aumentam a expressão dos genes da fase I, II e III do processo de biotransformação no intestino e no fígado de peixes *D. rerio*.

A pregnenolona aumentou a expressão de *CYP3A65*, *CYP3C1*, *CYP2AA1*, *CYP2AA2*, *GST α* , *GST π* , *ABCB5* e *PXR* no fígado e *CYP3A65*, *CYP3C1*, *CYP2AA1*, *CYP2AA2*, *GST α* , *GST π* e *PXR* no intestino dos peixes tratados com pregnenolona, o que sugere um importante papel do PXR como mediador da biotransformação em peixes desta espécie.

O calcitriol aumentou a expressão dos genes *CYP24*, *CYP3C1*, *CYP2AA1*, *CYP2AA2*, *GST π* e *PXR* no fígado e *CYP24*, *CYP2AA1*, *CYP2AA2*, *GST α* , *GST π* e *PXR* no intestino de peixes tratados com esse hormônio, o que demonstra o efeito do hormônio calcitriol na transcrição de genes envolvidos no processo de biotransformação em peixes.

Em peixe-zebra, ligantes de PXR e VDR podem ativar em comum a transcrição de *CYP3C1*, *CYP2AA1*, *CYP2AA2*, *GST π* e *PXR* no fígado e *CYP2AA1*, *CYP2AA2*, *GST α* , *GST π* e *PXR* no intestino.

Os resultados encontrados nesse trabalho suportam a hipótese de que os dois receptores da família NR1I, PXR e VDR, compartilham a mediação na resposta de detoxificação em peixes, assim como em mamíferos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADACHI, R. et al. Structural Determinants for Vitamin D Receptor Response to Endocrine and Xenobiotic Signals. **Molecular Endocrinology**, v. 18, pp. 43–52, 2004.

AOUABDI, S.; GIBSON G.; PLANT, N. Transcriptional Regulation of the *PXR* Gene: Identification and Characterization of a Functional Peroxisome Proliferator-Activated Receptor a Binding Site Within the Proximal Promoter of *PXR*. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 34, pp. 138-144, 2006.

ARANDA, A.; PASCUAL, A. Nuclear Hormone Receptors and Gene Expression. **Physiological Reviews**, v. 81, pp. 1269-1304, 2001.

BAINY, A.C.D.; STEGEMAN, J.J. Cloning and Identification of a Full Length Pregnane X Receptor and Expression *in vivo* in Zebrafish (*Danio rerio*). **Marine Environmental Research**, v. 58, n. 2, pp. 133-134, 2004.

BAINY, A.C.D. et al. Cloning and Expression of Two New Cytochrome P450 Genes (CYP2AA1 and CYP2AA2) in Zebrafish (*Danio rerio*). **13th Symposium on Pollutant Response in Marine Organisms (PRIMO 13)**, 2005.

BARD, S.M. Multixenobiotic Resistance as a Cellular Defense Mechanism in Aquatic Organisms. **Aquatic Toxicology**, v. 48, n. 4, pp. 357-389, 2000.

BERTRAND, S. et al. Evolutionary Genomics of Nuclear Receptors: From Twenty-Five Ancestral Genes to Derived Endocrine Systems. **Molecular Biology and Evolution**, v. 21, p. 1923-1937, 2004.

BLONDIN, G.A.; KULKARNI B.D.; NES, W.R. Concerning the Nonphotochemical Biosynthesis of Vitamin D₃ in Fish. **Journal of the American Chemical Society**, v. 86, pp. 2528–2529, 1964.

BLUMBERG, B. et al. BXR, an Embryonic Orphan Nuclear Receptor Actiated by a Novel Class of Endogenous Benzoate Metabolites. **Genes Development**, v. 12, pp. 1269-1277, 1998.

BOARD, P.G. et al. Identification, Characterization and Crystal Structure of the Omega Class Glutathione Transferases. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 32, pp. 24798-24806, 2000.

BRESOLIN, T.; REBELO, M.F.; BAINY, A.C.D. Expression of PXR, CYP3A and MDR1 Genes in Liver of Zebrafish. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 40, pp. 402-407, 2005.

BUSTIN, S. Absolute Quantification of mRNA Using Real-Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Assays. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 25, pp. 169–193, 2000.

CAMINADA, D. et al. Human Pharmaceuticals Modulate P-gp1 (ABCB1) Transport Activity in the Fish Cell Line PLHC-1. **Aquatic Toxicology**, v. 90, pp. 214-222, 2008.

CARRERA, E.P. et al. Effects of 17 β -Estradiol and 4-Nonylphenol on Osmoregulation and Hepatic Enzymes in Gilthead Sea Bream (*Sparus auratus*). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 145, pp. 210–217, 2007.

CIESIELSKI, F. et al. Structural Investigation of the Ligand Binding Domain of the Zebrafish VDR in Complexes With 1 α ,25(OH)₂D₃ and Gemini: Purification, Crystallization and Preliminary X-Ray Diffraction Analysis. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v. 89, pp. 55–59, 2004.

CORLEY-SMITH, G.E. et al. CYP3C1, the First Member of a New Cytochrome P450 Subfamily Found in Zebrafish (*Danio rerio*). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 340, pp. 1039–1046, 2006.

DROCOURT, L. et al. Expression of *CYP3A4*, *CYP2B6* and *CYP2C9* is Regulated by the Vitamin D Receptor Pathway in Primary Human Hepatocytes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 28, pp. 25125-2513, 2002.

DUSSAULT, I. et al. Peptide Mimetic HIV Protease Inhibitors Are Ligands for the Orphan Receptor SXR. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, pp. 33309-33312, 2001.

DUSSO, A. S. Vitamin D Receptor: Mechanisms for Vitamin D Resistance in Renal Failure. **Kidney International**, v. 63, pp. S6–S9, 2003.

EKINS, S. et al. Evolution of Pharmacologic Specificity in the Pregnane X Receptor. **BMC Evolutionary Biology**, v. 8, n. 103, 2008.

FALKNER, K.C. et al. Regulation of the Rat Glutathione S-Transferase A2 Gene by Glucocorticoids: Involvement of both the Glucocorticoid and Pregnane X Receptors. **Molecular Pharmacology**, v. 60, n. 3, pp. 611-619, 2001.

FAN, J. et al. Up-Regulation of Transporters and Enzymes by the Vitamin D Receptor Ligands, 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D3 and Vitamin D Analogs, in the Caco-2 Cell Monolayer. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 330, n. 2, pp. 389–402, 2009.

FRANK, N.Y. et al. ABCB5-Mediated Doxorubicin Transport and Chemoresistance in Human Malignant Melanoma. **Cancer Research**, v. 65, n. 10, pp. 4320-4333, 2005.

GARCION, E. et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 Regulates the Synthesis of γ -Glutamyl Transpeptidase and Glutathione Levels in Rat Primary Astrocytes. **Journal of Neurochemistry**, v. 73, pp. 859-864, 1999.

GEICK, A.; EICHELBAUM, M.; BURK, O. Nuclear Receptor Response Elements Mediate Induction of Intestinal *MDR1* by Rifampin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 18, pp. 14581–14587, 2001.

GERMAIN, P. et al. Overview of Nomenclature of Nuclear Receptors. **Pharmacological Reviews**, v. 58, pp. 965-704, 2006.

GOLDSMITH, P. Zebrafish as a Pharmacological Tool: The How, Why and When. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 4, pp. 504-512, 2004.

GONG, H. et al. Orphan Nuclear Receptor Pregnane X Receptor Sensitizes Oxidative Stress Responses in Transgenic Mice and Cancerous Cells. **Molecular Endocrinology**, v. 20, n. 2, pp. 279–290, 2006.

GONZALEZ, F.J. Role of Cytochromes P450 in Chemical Toxicity and Oxidative Stress: Studies with CYP2E1. **Mutation Research**, v. 569, pp. 101-110, 2005.

GUENGERICH, F. P. Cytochrome P-450 3A4: Regulation and Role in Drug Metabolism. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 39, pp. 1-17, 1999.

GUREVICH, I.; FLORES, A. M.; ANESKIEVICH, B.J. Corepressors of Agonist-Bound Nuclear Receptors. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 223, pp. 288–298, 2007.

HANDSCHIN, C.; PODVINEC, M.; MEYER, U. A. CXR, a Chicken Xenobiotic-Sensing Orphan Nuclear Receptor, is Related to Both Mammalian Pregnane X Receptor (PXR) and Constitutive Androstane Receptor (CAR). **Proceedings in National Academic of Science U.S.A.**, v. 97, pp. 10769-10774, 2000.

HASSELBERG, L. et al. Effects of Alkylphenols on CYP1A and CYP3A Expression in First Spawning Atlantic Cod (*Gadus morhua*). **Aquatic Toxicology**, v. 67, pp. 303–313, 2004.

HAUSSLER, M.R. et al. The Nuclear Vitamin D Receptor: Biological and Molecular Regulatory Properties Revealed. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 13, pp. 324-344, 1998.

HAYES, J.D.; FLANAGAN, J.U.; JOWSEY, I.R. Glutathione Transferases. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 45, pp. 51–88, 2005.

HEGELUND, T. et al. Effects of the Antifungal Imidazole Ketoconazole on CYP1A and CYP3A in Rainbow Trout and Killifish. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 23, n. 5, pp. 1326–1334, 2004.

HOLICK, M. **Vitamin D, Physiology, Molecular Biology and Clinical Applications**. Humam Press, 1999.

HOLICK, M. Evolution and Function of Vitamin D. In: Reichrath, J.; Friedrich, M.; Tilgen, W. **Vitamin D Analog in Cancer Prevention and Therapy**. Berlim: Springer, pp. 3-28, 2003.

HOWARTH, D.L. et al. Paralogous Vitamin D Receptors in Teleosts: Transition of Nuclear Receptor Function. **Endocrinology**, v. 149, n. 5, pp. 2411–2422, 2008.

JAIN, M. et al. Validation of Housekeeping Genes as Internal Control for Studying Gene Expression in Rice by Quantitative Real-Time PCR. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 345, pp. 646-651, 2006.

JONES, S.A. et al. The Pregnane X Receptor: a Promiscuous Xenobiotic Receptor that Has Diverged During Evolution. **Molecular Endocrinology**, v. 14, n. 1, pp. 27-39, 2000.

KALENDAR, R.; LEE, D.; SCHULMAN, A.H. FastPCR Software for PCR Primer and Probe Design and Repeat Search. **Genes, Genomes and Genomics**, v. 3, n. 1, pp. 1-14, 2009.

KARPEN, S.J.; TRAUNER, M. The New Therapeutic Frontier – Nuclear Receptors and the Liver. **Journal of Hepatology**, doi:10.1016/j.jhep.2009.12.002, 2009.

KATO, S. The Function of Vitamin D Receptor in Vitamin D Action. **The Journal of Biochemistry**, v. 127, pp. 717-722, 2000.

KLIEWER, S.A. et al. An Orphan Nuclear Receptor Activated by Pregnanes Defines a Novel Steroid Signaling Pathway. **Cell**, v. 92, pp. 73-82, 1998.

KRASOWSKI, M. et al. Evolutionary Selection Across the Nuclear Hormone Receptor Superfamily with a Focus on the NR1I Subfamily (Vitamin D, Pregnane X, and Constitutive Androstane Receptors). **Nuclear Receptor**, v. 2, 2005.

KRETSCHMER, X.C.; BALDWIN, W. CAR and PXR: Xenosensors of Endocrine Disrupters? **Chemico-Biological Interactions**, v. 55, pp. 111–128, 2005.

KUTUZOVA, G.D.; DELUCA, H.F. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ Regulates Genes Responsible for Detoxification in Intestine. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 218, pp. 37–44, 2006.

LEHMANN, J.M. et al. The Human Orphan Nuclear Receptor PXR is Activated by Compounds That Regulate *CYP3A4* Gene Expression and Cause Drug Interactions. **Journal of Clinical Investigation**, v. 102, pp. 1016-1023, 1998.

LI, Y.C. et al. Cloning and Characterization of the Vitamin D Receptor from *Xenopus laevis*. **Endocrinology**, pp. 2337-2353, 1997.

LIN, R. et al. Expression Profiling in Squamous Carcinoma Cells Reveals Pleiotropic Effects of Vitamin D₃ Analog EB1089 Signaling on Cell Proliferation, Differentiation, and Immune System Regulation. **Molecular Endocrinology**, v. 16, pp. 1243–1256, 2002.

LIN, R.; WHITE, J.H. The Pleiotropic Actions of Vitamin D. **BioEssays**, v. 26, pp. 21–28, 2003.

LIPS, P. Vitamin D Physiology. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 92, pp. 4–8, 2006.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2-DeltaCT Method. **Methods**, v. 25, pp. 402–208, 2001.

LOCK, E.K. et al. The Vitamin D Receptor and its Ligand 1 α ,25 Dihydroxyvitamin D₃ in Atlantic Salmon (*Salmo salar*). **Journal of Endocrinology**, v. 193, pp. 459–471, 2007.

LU, Z.; HANSON, K.; DELUCA, H.F. Cloning and Origin of the Two Forms of Chicken Vitamin D Receptor. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 339, n. 1, pp. 99–106, 1997.

MAGLICH, J.M. et al. Comparison of Complete Nuclear Receptor Sets from Human, *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila* Genomes. **Genome Biology**, v. 2, pp. 1–7, 2001.

MAGLICH, J.M. et al. Nuclear Pregnane X Receptor and Constitutive Androstane Receptor Regulate Overlapping but Distinct Sets of Genes Involved in Xenobiotic Detoxification. **Molecular Pharmacology**, v. 62, n. 3, pp. 638–646, 2002.

MAGLICH, J.M. et al. The First Completed Genome Sequence from a Teleost Fish (*Fugu rubripes*) Adds Significant Diversity to the Nuclear Receptor Superfamily. **Nucleic Acids Research**, v. 31, pp. 4051–4058, 2003.

MAKASHIMA, M. et al. Vitamin D Receptor as an Intestinal Bile Acid Sensor. **Science**, v. 296, pp. 1313–1315, 2002.

MANGELSDORF, D.J. et al. The Nuclear Receptor Superfamily: the Second Decade. **Cell**, v. 83, pp. 835–839, 1995.

MATIC, M. et al. Pregnane X Receptor: Promiscuous Regulator of Detoxification Pathways. **The International Journal of Biochemistry & Cell**, v. 39, pp. 478–283, 2007.

MATTOS, J.J. et al. Efeitos do 17 Alfa-Etinilestradiol em Fígado e Intestino de *Danio rerio*. **X Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia**, v. 1, p. 287, 2008.

MATTOS, J.J. et al. Differential Gene Expression in *Poecilia vivipara* Exposed to Diesel oil Water Accommodated Fraction. **Marine Environmental Research**, doi:10.1016/j.marenvres.2009.11.002., 2009.

McKENNA, N.J.; O'MALLEY, B. Minireview: Nuclear Receptor Coactivators – an Update. **Endocrinology**, v. 143, pp. 2461-2465, 2002.

MÉTIVIER, R.; REID, G.; GANNON, F. Transcription in four dimensions: nuclear receptor-directed initiation of gene expression. **EMBO reports**, n. 7, v. 2, pp. 161–167, 2006.

MEUCCI, V.; ARUKWE, A. The Xenoestrogen 4-Nonylphenol Modulates Hepatic Gene Expression of Pregnane X Receptor, Aryl Hydrocarbon Receptor, CYP3A and CYP1A1 in Juvenile Atlantic Salmon (*Salmo salar*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C, v. 142, pp. 142–150, 2006.

MIKAMO, E. et al. Endocrine Disruptors Induce Cytochrome P450 by Affecting Transcriptional Regulation Via Pregnane X Receptor. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 193, pp. 66–72, 2003.

MILNES, M.R. et al. Activation of Steroid and Xenobiotic Receptor (SXR, NR1I2) and Its Orthologs in Laboratory, Toxicologic, and Genome Model Species. **Environmental Health Perspectives**, v. 16, n. 7, pp. 880-885, 2008.

MIYAMOTO, K. et al. Structural Organization of the Human Vitamin D Receptor Chromosomal Gene and Its Promoter. **Molecular Endocrinology**, v. 11, n. 8, pp. 1165-1179, 1997.

MOORE, J.T.; KLIEWER, S.A. Use of the Nuclear Receptor PXR to Predict Drug Interactions. **Toxicology**, v. 153, pp. 1-10, 2000.

MOORE, L.B. et al. Pregnane X Receptor (PXR), Constitutive Androstane Receptor (CAR), and Benzoate X Receptor (BXR) Define Three Pharmacologically Distinct Classes of Nuclear Receptors. **Molecular Endocrinology**, v. 16, n. 5, pp. 977-986, 2002.

MORRISON, T.B.; WEIS, J.J.; WITTWER, C.T. Quantification of Low-Copy Transcripts by Continuous SYBR Green I Monitoring During Amplification. **Biotechniques**, v. 24, pp. 954–958, 1998.

NISHIMURA, M. et al. Effects Of Prototypical Drug-Metabolizing Enzyme Inducers on mRNA Expression of Housekeeping Genes in Primary Cultures of Human and Rat Hepatocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 346, pp. 1033-1039, 2006.

NORMAN, A.W.; LITWACK, G. Steroid Hormone: Chemistry, Biosynthesis and Metabolism. **Hormones**, pp. 49-86, 1997.

NRNC - NUCLEAR RECEPTORS NOMENCLATURE COMMITTEE. **Cell**, v. 97, pp. 161-163, 1999.

PASCUSSI, J.M. et al. The Expression of CYP2B6, CYP2C9 and CYP3A4 Genes: A Tangle of Networks of Nuclear and Steroid Receptors. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1619, pp. 243– 253, 2003.

PASCUSSI, J.M. et al. Possible Involvement of Pregnane X Receptor–Enhanced CYP24 Expression In Drug-Induced Osteomalacia. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 115, pp. 177–186, 2005.

PEARCE, K. et al. Discovery of Novel Nuclear Receptor Modulating Ligands: An Integral Role for Peptide Interaction Profiling. **Drug Discovery Today**, v. 9, pp. 741-751, 2004.

RAE, J.M. et al. Rifampin Is a Selective, Pleiotropic Inducer of Drug Metabolism Genes in Human Hepatocytes: Studies with cDNA and Oligonucleotide Expression Arrays. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 299, n. 3, pp. 849–857, 2001.

RASTINEJAD, F. Retinoid X Receptor and Its Partners in the Nuclear Receptor Family. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 11, pp. 33-38, 2001.

RESCHLY, E.J.; KRASOWSKI, M.D. Evolution and Function of the NR1I Nuclear Hormone Receptor Subfamily (VDR, PXR, and CAR) with Respect to Metabolism of Xenobiotics and Endogenous Compounds. **Current Drug Metabolism**, v. 7, n. 4, pp. 349–365, 2006.

RESCHLY, E.R. et al. Functional Evolution of the Vitamin D And Pregnane X Receptors. **BMC Evolutionary Biology**, v. 7, 2007.

ROBINSON-RECHAVI, M.; GARCIA, H.E.; LAUDET, V. The Nuclear Receptor Superfamily. **Journal of Cell Science**, v. 116, pp. 585-586, 2003.

ROSENFELD, J. M. et al. Genetic Profiling Defines the Xenobiotic Gene Network Controlled by the Nuclear Receptor Pregnane X Receptor. **Molecular Endocrinology**, v. 17, pp. 1268–1282, 2003.

SAEKI, M. et al. Identification of the Functional Vitamin D Response Elements in the Human MDR1 Gene. **Biochemical Pharmacology**, v. 76, pp. 531-542, 2008.

SCHMITTGEN, T.; ZAKRAJSEK, B. Effect of Experimental Treatment on Housekeeping Gene Expression: Validation by Real-Time, Quantitative RT-PCR. **Journal of biochemical and biophysical methods**, v. 46, pp. 69-81, 2000.

SCHMITTGEN, T.; LIVAK, K. Analyzing Real-Time PCR Data by the Comparative CT Method. **Nature Protocols**, v. 3, n. 6, pp. 1101-1108, 2008.

SCHOTE, A.B. et al. Nuclear Receptors in Human Immune Cells: Expression and Correlations. **Molecular Immunology**, v. 44, pp. 1436–1445, 2007.

SÉRÉE, E. et al. Modulation of MDR1 and CYP3A Expression by Dexamethasone: Evidence for an Inverse Regulation in Adrenals. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 252, pp. 392–395, 1998.

SIEBERT, M.N. et al. Cloning of Vitamin D Receptor from *Poecilia vivipara* - em preparação.

STAUDINGER, J.F. et al. The Nuclear Receptor PXR is a Lithocolic Acid Sensor that Protects Against Liver Toxicity. **Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A.**, v. 86, n. 6, pp. 33-69, 2001.

STEGEMAN, J.J.; HAHN, M.E. **Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives**. Lewis Publishers, CRC Press, pp. 87-206, 1994.

SUGDEN, D.; WINTER, P. **Molecular Biomethods Handbook**. Humana Press: Springer, 2008.

SUTTON, A.L.M.; MACDONALD, P.N. Vitamin D: More Than a “Bone-a-Fide” Hormone. **Molecular Endocrinology**, v. 17, pp. 777-791, 2003.

SUZUKI, T. et al. Identification of cDNAs Encoding Two Subtypes of Vitamin D Receptor in Flounder, *Paralichthys olivaceus*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 270, pp. 40–45, 2000.

SYNOLD, T.W.; DUSSAULT, B.M.; FORMAN, B.M. The Orphan Nuclear SXR Coordinately Regulates Drug Metabolism and Efflux. **Nature Medicine**, v. 7, n. 5, pp. 584-590, 2001.

THELLIN, O. et al. Housekeeping Genes as Internal Standards: Use and Limits. **Journal of Biotechnology**, v. 75, pp. 291-295, 1999.

THOMPSON, P.D. et al. Liganded VDR Induces CYP3A4 in Small Intestinal and Colon Cancer Cells Via DR3 and ER6 Vitamin D Responsive Elements. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 299, pp. 730–738, 2002.

THUMMEL, K. E. et al. Transcriptional Control of Intestinal Cytochrome P-4503A by 1 α ,25-Dihydroxy Vitamin D3. **Molecular Pharmacology**, v. 60, p. 1399-1406, 2001.

TSENG, H.P. et al. Constitutive and Xenobiotics-Induced Expression of a Novel CYP3A Gene from Zebrafish Larva. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 205, pp. 247– 258, 2005

UGUZ, C. et al. The Bioaccumulation of Nonyphenol and its Adverse Effect on the Liver of Rainbowtrout (*Onchorynchus mykiss*). **Environmental Research**, v. 92, pp. 262–270, 2003.

URQUHART, B.L. et al. Implications for Interindividual Variability in Response to Drugs Nuclear Receptors and the Regulation of Drug-Metabolizing Enzymes and Drug Transporters. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 47, pp. 566-578, 2007.

WADA, T.; GAO, J.; XIE, W. PXR and CAR in Energy Metabolism. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 20, pp. 273-279, 2009.

WATKINS, R.E. et al. The Human Nuclear Xenobiotic Receptor PXR: Structural Determinants of Directed Promiscuity. **Science**, v. 292, pp. 2329-2333, 2001.

WEI, P. et al. Specific and Overlapping Functions of the Nuclear Hormone Receptors CAR and PXR in Xenobiotic Response. **The Pharmacogenomics Journal**, v. 2, pp. 117–126, 2002.

WHITFIELD, G.K. et al. Cloning of a Functional Vitamin D Receptor from the Lamprey (*Petromyzon marinus*), an Ancient Vertebrate Lacking a Calcified Skeleton and Teeth. **Endocrinology**, v. 144, pp. 2704 –2716, 2003.

WHITFIELD, G.K. et al. Nuclear Vitamin D Receptor: Structure-Function, Molecular Control of Gene Transcription and Novel Bioactions. **Vitamin D**, segunda edição, 2005.

WIETZKE, J. A. et al. Regulation of the Human Vitamin D³ Receptor Promoter in Breast Cancer Cells is Mediated Through sp1 Sites. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 230, pp. 59-68, 2005.

WILSON, T.M.; KIEWER, S.A. PXR, CAR and Drug Metabolism. **Drug discovery**, v. 1, pp. 259-266, 2002.

XIE, W. et al. Humanized Xenobiotic Response in Mice Expressing Nuclear Receptor SXR. **Nature**, v. 406, pp. 435-439, 2000.

XU, C.; LI, C.Y.; KONG, A.T. Induction of Phase I, II and III Drug Metabolism/Transport by Xenobiotics. **Archives of Pharmaceutical Research**, v. 28, n. 3, pp. 249-268, 2005.

ZAMEK-GLISZCZYNSKI, M.J. et al. Integration of Hepatic Drug Transporters and Phase II Metabolizing Enzymes: Mechanisms of Hepatic Excretion of Sulfate, Glucuronide, and Glutathione Metabolites. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 27, pp. 447–486, 2006.

ZELLA, L.A. et al. Enhancers Located within Two Introns of the Vitamin D Receptor Gene Mediate Transcriptional Autoregulation by 1,25-Dihydroxyvitamin D₃. **Molecular Endocrinology**, v. 20, n. 6, pp. 1231–1247, 2006.

ZHANG, H. et al. Rat Pregnane X Receptor: Molecular Cloning, Tissue Distribution, and Xenobiotic Regulation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 368, n. 1, pp. 14-22, 1998.

ZHONG, H.; SIMONS, J. W. Direct Comparison of Gapdh, β -Actin, Cyclophilin, and 28s rRNA as Internal Standards for Quantifying RNA Levels Under Hypoxia. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 259, pp. 523-526, 1999.

ZHOU, J.; ZHANG, J.; XIE, W. Xenobiotic Nuclear Receptor-Mediated Regulation of UDP-Glucuronosyl-Transferases. **Current Drug Metabolism**, v. 6, pp. 289–298, 2005.

ZHOU, C. et al. Steroid and Xenobiotic Receptor and Vitamin D Receptor Crosstalk Mediates CYP24 Expression and Drug-Induced Osteomalacia. **Journal of Clinical Investigation**, v. 116, pp. 1703–1712, 2006.

ZHOU, C.; VERMA, S.; BLUMBERG, B. The Steroid and Xenobiotic Receptor (SXR), Beyond Xenobiotic Metabolism. **Journal of the Nuclear Receptor Signaling Atlas**, v. 7, e001, 2009.