

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



**ESPONJAS MARINHAS:  
POTENCIAIS APLICAÇÕES  
BIOTECNOLÓGICAS**

**Ana Isabel dos Santos Esteves**

**DOUTORAMENTO EM BIOQUÍMICA**  
(Especialidade Biotecnologia)

2009

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



**ESPONJAS MARINHAS:  
POTENCIAIS APLICAÇÕES  
BIOTECNOLÓGICAS**

**Ana Isabel dos Santos Esteves**

**DOCTORAMENTO EM BIOQUÍMICA  
(Especialidade Biotecnologia)**

2009

Tese orientada pela Professora Doutora Maria Madalena Humanes, professora auxiliar da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa e co-orientada pelo Professor Doutor João Gonçalves, professor associado da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa.

## I. RESUMO/ABSTRACT

### RESUMO:

O Oceano tem se revelado prolífico em organismos com propriedades únicas em termos de aplicação biotecnológica. Entre estes, as esponjas marinhas estão representadas em cerca de 45% de todos os produtos naturais extraídos de organismos marinhos.

Este trabalho apresenta dois casos de estudo de potenciais aplicações biotecnológicas encontradas em esponjas marinhas: a potente actividade anti-VIH observada na espécie *Erylus discophorus* e a bioacumulação de níquel no género *Cliona*. O primeiro caso poderá ter evidente aplicação na indústria farmacêutica; o segundo poderá eventualmente vir a demonstrar-se útil em termos de bioremediação.

O trabalho desenvolvido no capítulo 2, *Erylus discophorus* e inibição do VIH-1, tinha como objectivos principais a identificação da(s) molécula(s) responsável(eis) por esta inibição, o seu isolamento e elucidação da sua estrutura e mecanismo de inibição. Embora estes objectivos não tenham sido atingidos, devido à impossibilidade de isolamento de uma molécula bioactiva sem conseqüente perda de actividade, observou-se que esta actividade anti-viral é específica para a espécie *Erylus discophorus*, independentemente da sua localização geográfica. Não se exclui a possibilidade de um efeito sinérgico de duas ou mais moléculas. No entanto, determinou-se que a principal molécula responsável pela actividade anti-VIH será de natureza glicídica ou glicoproteica, extremamente hidrofílica, com uma massa molecular acima de 2000 kDa e carga aniónica a pH 6.

No capítulo 3, Família *Clionidae* e bioacumulação de níquel, os objectivos principais focaram o estudo da reprodutibilidade dos elevados teores de níquel, a elucidação do mecanismo e esclarecimento da origem biológica da bioacumulação. Os resultados apontam para a existência de uma bioacumulação de níquel específica para o “complexo *Cliona viridis*”, independente da localização geográfica, da contaminação ambiental e de outras variações sazonais. Estas esponjas acumulam níquel em teores médios de 1300 ppm, na sua forma iónica livre, Ni<sup>2+</sup>, ou associado a uma molécula de massa molecular inferior a 3000 Da. Propõe-se um possível envolvimento de um dinoflagelado do género *Symbiodinium* no mecanismo de bioacumulação.

**PALAVRAS CHAVE:** esponjas marinhas, biotecnologia marinha, anti-VIH, bioacumulação de níquel, *Erylus discophorus*, *Cliona*, *Symbiodinium*

**ABSTRACT:**

The Ocean is prolific in organisms with unique properties in terms of biotechnological applications. Amongst them, marine sponges are represented in around 45% of all natural products extracted from marine organisms.

This work presents two case studies of the potential biotechnological applications of marine sponges: the strong anti-HIV activity observed in the species *Erylus discophorus* and the nickel bioaccumulation in the genus *Cliona*. The first case could have evident application in the pharmaceutical industry; the latter can eventually become useful in bioremediation.

The work developed in chapter 2, *Erylus discophorus* and HIV-1 inhibition, had as main goals the identification of the molecule(s) responsible for this inhibition, its isolation, structural and mechanistic characterization. Although these objectives were not achieved, mainly due to the loss of activity during fractionation, we observed that this antiviral activity is specific for the species *Erylus discophorus*, regardless of its geographical localization. We were not able to exclude the possibility of a synergistic effect of two or more molecules. However, we have determined that the principal molecule responsible for the anti-HIV activity is either a glycid or a glycoprotein, extremely hydrophilic, with a molecular weight over 2000 kDa and anionic at pH 6.

In chapter 3, family *Clionidae* and nickel bioaccumulation, the main goals focused on the study of the reproducibility of the high nickel contents, the mechanism elucidation and biological origin of the bioaccumulation. Results indicate the existence of a nickel bioaccumulation specific for the “*Cliona viridis* complex”, independent of geographic localization, environmental contamination and other seasonal variations. These sponges accumulate nickel in an average concentration of 1300 ppm, in its free ionic form, Ni<sup>2+</sup>, or associated to a low molecular weight molecule (less than 3000 Da). The possible role of a *Symbiodinium spp.* in the bioaccumulation mechanism is hypothesized.

**KEYWORDS:** marine sponges, marine biotechnology, anti-HIV, nickel bioaccumulation, *Erylus discophorus*, *Cliona*, *Symbiodinium*

## **II. AGRADECIMENTOS**

*Primeiro que tudo, tenho que agradecer aos meus pais, por existirem e por lhes dever grande parte do que sou e do que atingi. Ao seu apoio incondicional, mesmo quando não estavam de acordo com as minhas decisões; à sua palavra amiga e abraço reconfortante nos dias de desânimo e desmotivação; a todo o investimento que fizeram para que eu tivesse sempre a melhor formação possível; a todos os esforços que empreenderam ao longo destes 31 anos, a todos os níveis. Espero que se sintam recompensados.*

*À professora Madalena, que me apresentou a este maravilhoso mundo das esponjas marinhas. Agradeço-lhe ter-me acolhido prontamente no seu grupo de investigação, ter acreditado em mim e ter-me feito crescer, tanto em termos científicos como pessoais; a sempre pronta disponibilidade, tanto a nível científico como a nível pessoal; a liberdade que sempre me concedeu em termos de investigação; o apoio e compreensão nos dias mais cinzentos; a partilha da alegria e do entusiasmo em todas as pequenas conquistas e vitórias; a constante motivação do grupo, mesmo quando às vezes era difícil encontrá-la e a consciência de que a ciência não se resume apenas àquilo que se faz no laboratório, que a ciência se faz, não apenas com reagentes e aparelhos, mas acima de tudo com pessoas.*

*Ao João Gonçalves, por ter sempre acreditado nesta imprescindível colaboração, por ter aceite ser co-orientador deste trabalho, pela disponibilidade e simpatia com que me acolheu e por me ter permitido (e ensinado) a trabalhar nas instalações do Centro de Patogénese Molecular da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa.*

*Ao professor Rogério Tenreiro do ICAT/BIOFIG por ter acolhido a nossa proposta com ânimo e disponibilidade, pela preciosa colaboração sem a qual todo o trabalho de biologia molecular não teria sido possível.*

*À Sandra Chaves a quem estas palavras de agradecimento não chegam para demonstrar tudo o que lhe devo. Foi mentora, colega e amiga. Esteve sempre*

*disponível para esclarecer todas as minhas dúvidas científicas, mas acima de tudo, para me dar uma palavra amiga nos dias em que tudo parecia mau.*

*Ao Alberto Reis por se disponibilizar a partilhar comigo o seu conhecimento na cultura de microrganismos marinhos, por oferecer tão prontamente as suas instalações e a sua ajuda, mesmo quando o tempo era escasso.*

*À Liliana Campos pelo tempo e dedicação que empreendeu nos estudos de SQUID. Afinal os físicos também fazem coisas úteis!*

*À Joana Xavier, há-de ser sempre a nossa bióloga de estimação! Obrigada pelos estudos de taxonomia, sem os quais andaríamos totalmente perdidos. Obrigada pelas preciosas amostras de DNA, que acabaram por ser parte importantíssima nos resultados deste trabalho. Obrigada pela alegria e entusiasmo contagiantes! E ainda nos aguardam muitos projectos juntas!*

*Ao Sven Zea, do CECIMAR da Universidade Nacional da Colômbia, ao Jean Vacelet, Centre d'Océanologie de Marseille, Station Marine d'Endoume, e à Emma Cebrian, Centre d'Estudis Avançats de Blanes, pelo envio de amostras de esponjas.*

*A todos os membros do Grupo de Bioquímica Inorgânica Marinha com quem tive o privilégio de partilhar o laboratório, que abandonaram o ninho e andam agora em altos vãos: Marise Almeida, Marisa Nicolai, André Natálio, Rute André. Obrigada pela amizade, pela camaradagem, pelo espírito de equipa sempre presente, pelas valiosas discussões científicas ao final da tarde acompanhadas de um café ou de um chazinho (e quase sempre uma bolachinha marota).  
Vemo-nos na próxima conferência!*

*Finalmente, a todos os meus amigos, pilares maiores desta construção que é uma vida. Ricardo Troncão, Ricardo Lourenço, Ricardo Sequeira, (são muitos os Ricardos da minha vida), Rui Alexandre e família, Bitá e família (incluindo os meus manos Vicky e Katia e, claro, a Tia Nassimi!). Como vos posso agradecer tudo o que representam na minha vida? Obrigada por existirem e estarem sempre lá!*

### **III. ÍNDICE GERAL**

<b>I. <u>RESUMO/ABSTRACT</u></b> .....	i
<b>II. <u>AGRADECIMENTOS</u></b> .....	iii
<b>III. <u>ÍNDICE GERAL</u></b> .....	v
<b>IV. <u>ÍNDICE DE FIGURAS</u></b> .....	xiii
<b>V. <u>ÍNDICE DE TABELAS</u></b> .....	xix
<b>VI. <u>SÍMBOLOS, ACRÓNIMOS E ABREVIATURAS</u></b> .....	xxiii
<b>1. <u>INTRODUÇÃO</u></b> .....	1
<b>1.1. AS ESPONJAS MARINHAS</b> .....	2
<b>1.1.1. <u>Morfologia</u></b> .....	2
<b>1.1.2. <u>História e Taxonomia</u></b> .....	5
<b>1.1.3. <u>Reprodução</u></b> .....	6
<b>1.1.4. <u>Ecologia</u></b> .....	7
<b>1.1.5. <u>Microrganismos Associados</u></b> .....	9
a) <b>Diversidade Microbiológica</b> .....	10
b) <b>Origem Evolucionária ou Ambiental?</b> .....	12
c) <b>Produtos Naturais: Hospedeiro ou Simbionte?</b> .....	14
<b>1.2. BIOTECNOLOGIA MARINHA</b> .....	15
<b>1.2.1. <u>Métodos Dependentes de Cultura</u></b> .....	17
a) <b>Cultivo da esponjas in situ</b> .....	17
b) <b>Cultivo da esponja em aquário</b> .....	18
c) <b>Primorfos</b> .....	19
d) <b>Cultura de células</b> .....	20

e) <b>Cultura de microrganismos</b> .....	21
<b>1.2.2. Métodos Independentes de Cultura</b> .....	21
a) <b>Síntese Química e Biossíntese</b> .....	22
b) <b>Metagenómica</b> .....	23
<b>2. <u>ERYLUS DISCOPHORUS E INIBIÇÃO DO VIH-1</u></b> .....	29
<b>2.1. CONSIDERAÇÕES INTRODUTÓRIAS DO CAPÍTULO 2</b> .....	29
<b>2.1.1. <u>SIDA e VIH</u></b> .....	29
a) <u>A descoberta do VIH</u> .....	31
b) <u>Origem do VIH</u> .....	32
c) <u>Modos de Infecção</u> .....	32
d) <u>Da infecção por VIH até à SIDA</u> .....	33
<b>2.1.1.1. Características gerais e ciclo de infecção do VIH</b> .....	35
a) <u>Estrutura geral do VIH-1</u> .....	35
b) <u>Organização genómica</u> .....	36
c) <u>Ciclo de replicação</u> .....	37
<b>2.1.1.2. Alvos Terapêuticos</b> .....	41
<b>2.1.2. <u>Produtos anti-VIH de origem marinha</u></b> .....	44
<b>2.1.3. <u>A esponja <i>Erylus discophorus</i></u></b> .....	47
<b>2.2. PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	49
<b>2.2.1. <u>Materiais e Métodos</u></b> .....	49
<b>2.2.1.1. Preparação do extracto bruto</b> .....	49
<b>2.2.1.2. Avaliação da actividade anti-VIH</b> .....	50
a) <u>Produção e Manutenção das linhas celulares</u> .....	50
b) <u>Produção da estirpe viral HIV-1 NL4-3</u> .....	51
c) <u>Determinação da Infectividade Viral</u> .....	52
d) <u>Ensaio de Susceptibilidade do VIH</u> .....	52
e) <u>Determinação da Viabilidade Celular</u> .....	53
f) <u>Determinação do Grau de Infecção</u> .....	53



2.2.1.3. Seguimento da actividade de Iodoperoxidase ....	55
2.2.1.4. Concentração de amostras .....	55
2.2.1.5. Métodos de Purificação .....	56
a) <u>Precipitação salina do extracto bruto</u> .....	56
b) <u>Diálise do sobrenadante proveniente da precipitação salina</u> .....	56
c) <u>Precipitação etanólica do extracto bruto</u> .....	57
d) <u>Métodos de extracção de glícidos</u> .....	58
e) <u>Separações Cromatográficas</u> .....	58
2.2.1.6. Doseamentos Colorimétricos .....	62
2.2.2. <b><u>Resultados e Discussão</u></b> .....	62
2.2.2.1. <b>Determinação da actividade anti-VIH do extracto bruto</b> .....	62
2.2.2.2. <b>Discussão dos passos de Precipitação Etanólica</b> .....	63
2.2.2.3. <b>Determinação da actividade anti-VIH dos precipitados glicídicos</b> .....	65
2.2.2.4. <b>Separações Cromatográficas</b> .....	68
a) <u>Fraccionamento do sobrenadante após precipitação salina</u> .....	68
b) <u>Fraccionamento do extracto bruto</u> .....	72
c) <u>Estudo da influência da solução-tampão na separação cromatográfica</u> .....	78
d) <u>Fraccionamento do precipitado glicídico B161(IV)</u> .....	85
2.3. <b>NOTAS CONCLUSIVAS DO CAPÍTULO 2</b> .....	90
3. <b><u>FAMÍLIA CLIONIDAE E BIOACUMULAÇÃO DE NÍQUEL</u></b> .....	95
3.1. <b>CONSIDERAÇÕES INTRODUTÓRIAS DO CAPÍTULO 3</b> .....	97
3.1.1. <b><u>O Níquel</u></b> .....	97
3.1.1.1. <b>Características Gerais</b> .....	97
3.1.1.2. <b>Ciclo Biogeoquímico do Níquel nos Oceanos</b> .....	99

<b>3.1.1.3. Níquel nos sistemas biológicos</b> .....	102
a) <u>O níquel como catalizador da vida primordial</u> .....	102
b) <u>A bioquímica do níquel</u> .....	104
c) <u>Permeases e Sistemas Transportadores de Níquel</u> .....	106
d) <u>Enzimas de Níquel</u> .....	107
i) Urease .....	107
ii) Hidrogenases .....	108
iii) Superóxido Dismutase (NiSOD) .....	111
iv) CO desidrogenase e Acetil-CoA sintase .	113
v) Metil-CoM redutase .....	114
vi) Glioxalase I (Glx I) .....	115
vii) Acireductona dioxigenase .....	117
viii) <i>Cis/trans</i> Isomerase .....	119
e) <u>Metalochaperones</u> .....	119
f) <u>O níquel na regulação dos seus transportadores, metalochaperones e enzimas</u> .....	120
<b>3.1.2. Resistência e Tolerância ao níquel em Sistemas Vivos</b> .....	122
<b>3.1.2.1. Bioconcentração, Bioacumulação e Biomagnificação</b> .....	122
<b>3.1.2.2. Biomonitorização</b> .....	123
<b>3.1.2.3. Regulação das Concentrações Intracelulares de Níquel</b> .....	124
<b>3.1.2.4. Mecanismos de Resistência e Tolerância ao Níquel</b> .....	124
<b>3.1.2.5. Bioacumulação de Metais Pesados</b> .....	126
<b>3.1.3. Família <i>Clionidae</i> e espécie <i>Suberites carnosus</i></b> .....	129
<b>3.1.3.1. <i>Suberites carnosus</i></b> .....	130
<b>3.1.3.2. Família <i>Clionidae</i> e “Complexo <i>Cliona viridis</i>”</b> ..	130
<b>3.1.4. Dinoflagelados <i>Zooxanthellae</i></b> .....	133
<b>3.1.4.1. <i>Symbiodinium spp.</i> – <i>zooxanthellae</i> associados a invertebrados marinhos</b> .....	134
a) <u><i>Symbiodinium spp.</i> em esponjas marinhas</u> .....	137

<b>3.2. PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	139
<b>3.2.1. <u>Materiais e Métodos</u></b> .....	139
<b>3.2.1.1. Detecção qualitativa da presença de iões Ni<sup>2+</sup></b> ....	140
<b>3.2.1.2. Liofilização das esponjas e fracções cromatográficas</b> .....	142
<b>3.2.1.3. Preparação do extracto com choque térmico ('heat shock extract' – h.s.e.)</b> .....	143
a) <u>A partir de esponja congelada</u> .....	143
b) <u>A partir de esponja liofilizada</u> .....	143
<b>3.2.1.4. Separação cromatográfica</b> .....	144
<b>3.2.1.5. Posteriores tentativas de fraccionamento</b> .....	145
a) <u>Extracção orgânica da fracção com níquel</u> .....	145
b) <u>Cromatografias de Troca Iónica</u> .....	145
<b>3.2.1.6. Ensaio de lavagem da esponja</b> .....	146
<b>3.2.1.7. Precipitação salina do extracto bruto</b> .....	147
<b>3.2.1.8. SDS-PAGE</b> .....	148
<b>3.2.1.9. Determinação da Composição Elementar</b> .....	148
<b>3.2.1.10. Doseamentos Colorimétricos</b> .....	151
<b>3.2.1.11. Estudo das Comunidades Microbianas Associadas às Esponjas Bioacumuladoras de Níquel</b> .....	152
a) <u>Métodos dependentes de cultura</u> .....	152
i) Isolamento de bactérias e dinoflagelados por técnicas clássicas de microbiologia ...	152
ii) Isolamento de dinoflagelados por centrifugação em gradiente de Percoll .....	154
b) <u>Métodos Independentes de Cultura</u> .....	155
i) Extracção de ácidos nucleicos .....	156
ii) Amplificação .....	158
iii) Identificação filogenética das comunidades microbianas associadas por TGGE .....	160
<b>3.2.2. <u>Resultados e Discussão</u></b> .....	163

<b>3.2.2.1 Separação cromatográfica da fracção com níquel</b> .....	164
<b>3.2.2.2. Posteriores tentativas de fraccionamento</b> .....	172
a) <u>Extracção orgânica da fracção com níquel</u> .....	172
b) <u>Cromatografias de Troca Iónica</u> .....	173
<b>3.2.2.3. Ensaio de precipitação e extracelularidade</b> .....	176
a) <u>Precipitação salina do extracto bruto</u> .....	176
b) <u>Ensaio de lavagem da esponja</u> .....	177
<b>3.2.2.4. Determinação do conteúdo metálico (Fe, Zn e Ni)</b> .....	178
a) <u>Cálculo da percentagem de redução de massa das esponjas liofilizadas</u> .....	179
b) <u>Análise, Tratamento e Discussão dos Resultados obtidos por ICP-AES</u> .....	180
<b>3.2.2.5. Doseamentos colorimétricos</b> .....	188
<b>3.2.2.6. Estudo dos Consórcios Microbianos – Métodos Dependentes de Cultura</b> .....	192
a) <u>Isolamento de estirpes microbianas heterotróficas</u> .....	192
b) <u>Isolamento de dinoflagelados centrifugação em gradiente de densidade</u> .....	194
<b>3.2.2.7. Estudo dos Consórcios Microbianos – Métodos Independentes de Cultura</b> .....	195
a) <u>Dinoflagelados</u> .....	196
i) <u>Região 28S rRNA</u> .....	196
ii) <u>Região ITS+28S rRNA</u> .....	199
b) <u>Bactérias</u> .....	208
<b>3.3. NOTAS CONCLUSIVAS DO CAPÍTULO 3</b> .....	214
<b>4. <u>CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS</u></b> .....	221

<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	227
<b>6. ANEXOS</b> .....	239
<b>ANEXO I - ESPECIFICAÇÕES DE REAGENTES E CALIBRAÇÕES</b> .....	241
<b>I-A) Especificações e Características das Colunas de Cromatografia</b> .....	241
<b>I-B) Calibração da Coluna S-300</b> .....	243
<b>I-C) Calibração da Coluna Superose 6</b> .....	244
<b>I-D) Calibração da Coluna Superdex 75</b> .....	245
<b>I-E) Calibração de Densidade</b> .....	246
<b>I-F) ‘Primers’ utilizados no estudo das comunidades microbianas associadas às esponjas bioacumuladoras de níquel por métodos independentes de cultura (secção 3.2.1.11.b))</b> .....	247
<b>ANEXO II – MÉTODOS</b> .....	248
<b>II-A) Métodos de extracção de glúcidos</b> .....	248
<b>II-B) Preparação dos géis para SDS-PAGE</b> .....	253
<b>II-C) Coloração de géis de PAGE para proteínas – Método do Azul de Coomassie</b> .....	254
<b>II-D) Coloração de géis de PAGE para proteínas – Método do Nitrato de Prata</b> .....	255
<b>II-E) Coloração de géis de PAGE para actividade de IPO - Método da <i>orto</i>-dianisidina</b> .....	256
<b>ANEXO III – RESULTADOS</b> .....	257
<b>III-A) Cromatogramas correspondentes ao fraccionamento dos extractos com choque térmico por cromatografia de filtração em gel na coluna Superdex 75 (secção 3.2.2.1.)</b> .....	257
<b>III-B) Relatório da Determinação do Conteúdo Metálico por ICP-AES (secção 3.2.2.4)</b> .....	258

<b>III-C) Alinhamentos das sequências de fragmentos de</b> <b><i>Symbiodinium spp.</i> (secção 3.2.2.7.a))</b> .....	259
<b>ANEXO IV – PUBLICAÇÕES</b> .....	263

## **IV. ÍNDICE DE FIGURAS**

### **1. INTRODUÇÃO**

<b>Figura 1.1 -</b>	Painel existente no Aquário Vasco da Gama, Lisboa, Portugal .....	Pag. 1
<b>Figura 1.2 -</b>	Morfologia geral de uma esponja marinha .....	Pag. 3
<b>Figura 1.3 -</b>	Plano morfológico e fluxo de água numa esponja marinha .....	Pag. 4
<b>Figura 1.4 -</b>	Diversidade microbiológica associada às esponjas baseada no número de sequências depositadas na base de dados do ‘National Center for Biotechnology Information’ (NCBI – <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a> ) em Junho de 2008 .....	Pag. 9
<b>Figura 1.5 -</b>	Resumo dos possíveis cenários evolucionários dos consórcios esponja-microrganismo .....	Pag. 13
<b>Figura 1.6 -</b>	Produtos naturais extraídos de organismos marinhos .....	Pag. 15
<b>Figura 1.7 -</b>	Resumo da estratégia global para a obtenção em grande escala de metabolitos de esponjas marinhas .....	Pag. 24

### **2. *ERYLUS DISCOPHORUS* E INIBIÇÃO DO VIH-1**

<b>Figura 2.1 -</b>	Distribuição geográfica de pessoas infectadas por VIH .....	Pag. 30
<b>Figura 2.2 -</b>	Estrutura geral do VIH-1 .....	Pag. 35
<b>Figura 2.3 -</b>	Organização genómica do VIH-1 .....	Pag. 36
<b>Figura 2.4 -</b>	Ciclo de replicação do VIH .....	Pag. 38
<b>Figura 2.5 -</b>	Aspecto característico de uma esponja marinha da espécie <i>Erylus discophorus</i> .....	Pag. 48
<b>Figura 2.6 -</b>	Modo de acção do ensaio ELISA para a determinação do grau de infecção ..	Pag. 54
<b>Figura 2.7 -</b>	Curva de calibração validada da proteína p24 .....	Pag. 66
<b>Figura 2.8 -</b>	Representação gráfica dos resultados obtidos para a determinação da actividade anti-VIH dos precipitados glicídicos .....	Pag. 67
<b>Figura 2.9 -</b>	Cromatograma do sobrenadante obtido após precipitação salina na matriz Superose 6 .....	Pag. 69
<b>Figura 2.10 -</b>	Cromatograma do sobrenadante obtido após precipitação salina na matriz Phenyl Sepharose .....	Pag. 70
<b>Figura 2.11 -</b>	Cromatograma do sobrenadante dialisado na matriz S-300 .....	Pag. 71

<b>Figura 2.12</b> - Cromatograma do extracto bruto B161/EB na matriz Superose 6 .....	Pag. 72
<b>Figura 2.13</b> - Cromatograma do extracto bruto concentrado na matriz MonoQ .....	Pag. 74
<b>Figura 2.14</b> - Cromatograma do extracto bruto concentrado B161/EB conc. na matriz S-300 .....	Pag. 75
<b>Figura 2.15</b> - Cromatograma do extracto bruto concentrado na matriz DEAE .....	Pag. 76
<b>Figura 2.16</b> - SDS-PAGE não-desnaturante dos picos recolhidos na cromatografia do B161/EB conc. na matriz DEAE, após concentração .....	Pag. 77
<b>Figura 2.17</b> - Estudo do pH e amostra injectada na separação cromatográfica em mini-coluna DEAE .....	Pag. 79
<b>Figura 2.18</b> - Cromatograma do precipitado etanólico na matriz DEAE .....	Pag. 80
<b>Figura 2.19</b> - Perfil de eluição da cromatografia graficamente representada na Fig. 2.18 em termos da quantidade de glícidos e proteína presentes em cada uma das fracções recolhidas .....	Pag. 81
<b>Figura 2.20</b> - Perfil de eluição da cromatografia graficamente representada na Fig. 2.18 em termos da actividade como iodoperoxidase .....	Pag. 82
<b>Figura 2.21</b> - SDS-PAGE não-desnaturante das fracções recolhidas e concentradas correspondentes aos picos cromatográficos eluídos na cromatografia do precipitado etanólico na matriz DEAE (Fig. 2.18) .....	Pag. 84
<b>Figura 2.22</b> - Cromatograma do precipitado glicídico B161(IV) na matriz Superose 6 .....	Pag. 86
<b>Figura 2.23</b> - Perfil de eluição da cromatografia graficamente representada na Fig. 2.22 em termos da quantidade de glícidos e proteína presentes em cada uma das fracções recolhidas .....	Pag. 87
<b>Figura 2.24</b> - Cromatograma do precipitado glicídico B161(IV) na matriz S-300 .....	Pag. 88

### **3. FAMÍLIA *CLIONIDAE* E BIOACUMULAÇÃO DE NÍQUEL**

<b>Figura 3.1</b> - Ciclo Biogeoquímico do Níquel .....	Pag. 100
<b>Figura 3.2</b> - Enzimas que contêm níquel e reacções que elas catalizam .....	Pag. 103
<b>Figura 3.3</b> - Regulação intracelular do níquel através de permeases, transportadores, metalochaperones e proteínas reguladoras da transcrição .....	Pag. 105
<b>Figura 3.4</b> - Esquema da esfera de coordenação dos dois átomos de níquel no centro activo do enzima urease .....	Pag. 108
<b>Figura 3.5</b> - Representação esquemática de uma hidrogenase de níquel heterodimérica ..	Pag. 109
<b>Figura 3.6</b> - Mecanismos propostos para o ciclo catalítico das hidrogenases de níquel ....	Pag. 110
<b>Figura 3.7</b> - Reacções que envolvem a formação e metabolização do metilglioxal .....	Pag. 115
<b>Figura 3.8</b> - Reacções do sistema de glioxalases .....	Pag. 117
<b>Figura 3.9</b> - Reacções do enzima aciredutona dioxigenase .....	Pag. 118



<b>Figura 3.10</b> - Interconversão isomérica da ligação prolil catalizada pelo enzima PPIase ....	Pag. 119
<b>Figura 3.11</b> - Aspecto típico de uma esponja da espécie <i>Suberites carnosus</i> .....	Pag. 130
<b>Figura 3.12</b> - Aspecto típico de uma <i>Cliona viridis</i> na forma $\beta$ .....	Pag. 132
<b>Figura 3.13</b> - Relações filogenéticas entre os principais grupos de <i>Symbiodinium spp.</i> .....	Pag. 136
<b>Figura 3.14</b> - Estrutura química do complexo Ni-DMG .....	Pag. 141
<b>Figura 3.15</b> - Perfil do gradiente salino utilizado nas cromatografias de troca iónica em mini-coluna .....	Pag. 146
<b>Figura 3.16</b> - Representação esquemática do procedimento seguido para a extracção de ácidos nucleicos de esponjas marinhas .....	Pag. 157
<b>Figura 3.17</b> - Representação esquemática dos locais de hibridação dos vários 'primers' utilizados para amplificação do gene de rRNA de dinoflagelados .....	Pag. 159
<b>Figura 3.18</b> - Esquema resumido da estratégia seguida para a identificação filogenética das comunidades bacterianas associadas às esponjas .....	Pag. 162
<b>Figura 3.19</b> - Cromatograma típico obtido para o fraccionamento dos extractos com choque térmico DMG(+) na coluna Superdex75 .....	Pag. 165
<b>Figura 3.20</b> - Cromatograma obtido para o fraccionamento cromatográfico, na coluna Superdex75, do extracto com choque térmico da esponja B418 .....	Pag. 167
<b>Figura 3.21</b> - Cromatograma obtido para o fraccionamento cromatográfico, na coluna Superdex75, do extracto com choque térmico da esponja Fe03 .....	Pag. 168
<b>Figura 3.22</b> - Gel SDS-PAGE das fracções com níquel recolhidas após cromatografia de filtração em gel na coluna Superdex 75; coloração pelo método de Nitrato de Prata .....	Pag. 169
<b>Figura 3.23</b> - Gel SDS-PAGE das fracções com níquel recolhidas após cromatografia de filtração em gel na coluna Superdex 75; coloração com DMG .....	Pag. 169
<b>Figura 3.24</b> - Sobreposição dos géis SDS-PAGE corados para proteína (método Azul de Coomassie) e para níquel (método DMG) da fracção da amostra B21 após liofilização e ressuspensão em água MilliQ .....	Pag. 171
<b>Figura 3.25</b> - Géis SDS-PAGE da fase aquosa após extracção orgânica com acetato de etilo da fracção cromatográfica da amostra B21 .....	Pag. 172
<b>Figura 3.26</b> - Cromatografias de troca iónica em mini-coluna .....	Pag. 173
<b>Figura 3.27</b> - Géis SDS-PAGE das fracções 1 a 10 recolhidas na cromatografia mini DEAE Sepharose .....	Pag. 175
<b>Figura 3.28</b> - Representação gráfica dos valores de concentração de proteína e glícidos (em $\mu\text{g/mL}$ de amostra) nos extractos h.s.e. e fracções cromatográficas .....	Pag. 189
<b>Figura 3.29</b> - Representação gráfica das concentrações de proteína e glícidos presentes nos extractos h.s.e., em mg de proteína ou glícidos por g de esponja liofilizada .....	Pag. 190

<b>Figura 3.30</b> - Gel de agarose obtido após separação electroforética dos ácidos nucleicos extraídos das estirpes microbianas isoladas a partir das esponjas Ber07/1, Ber07/2 e Ber07/3 .....	Pag. 193
<b>Figura 3.31</b> - Géis de agarose 1% (p/v) após separação electroforética dos fragmentos 28S rRNA obtidos por amplificação com o par de ‘primers’ LS1.5/LS1.3 ...	Pag. 196
<b>Figura 3.32</b> - Representação esquemática da deleção encontrada nas sequências 28S rDNA obtidas através da amplificação dos DNAs extraídos das amostras C. varians, B179 e Az1206/1 .....	Pag. 197
<b>Figura 3.33</b> - Gel de agarose 1% (p/v) após separação electroforética dos fragmentos 28S rRNA obtidos por amplificação com o par de ‘primers’ LS1.5/LS1.3 e tabela com correspondência poço/amostra .....	Pag. 198
<b>Figura 3.34</b> - Gel de agarose 1% (p/v) após separação electroforética dos fragmentos obtidos por amplificação com o par de ‘primers’ Dino18SF/NL4 .....	Pag. 200
<b>Figura 3.35</b> - Gel de agarose 1% (p/v) após separação electroforética dos fragmentos obtidos por amplificação dos restantes ácidos nucleicos por nós extraídos com o par de ‘primers’ Dino18SF/NL4 e respectiva legenda .....	Pag. 200
<b>Figura 3.36</b> - Géis de agarose 1% (p/v) após separação electroforética dos fragmentos obtidos por amplificação dos ácidos nucleicos enviados por Joana Xavier com o par de ‘primers’ Dino18SF/NL4 e respectiva legenda .....	Pag. 201
<b>Figura 3.37</b> - Representação esquemática da deleção encontrada na sequência do fragmento ITS+28S rDNA mais pequeno obtido através da amplificação da amostra Ber07/2 com o par de ‘primers’ Dino18SF/NL4 .....	Pag. 202
<b>Figura 3.38</b> - Representação esquemática dos alinhamentos entre os fragmentos obtidos após amplificação da amostra Ber07/2 .....	Pag. 203
<b>Figura 3.39</b> - Tabela resumo das sequências obtidas após amplificação de DNA extraído de algumas amostras de esponjas marinhas com ‘primers’ específicos para dinoflagelados e correspondentes homologias com as sequências depositadas na base de dados ‘Genbank’ .....	Pag. 204
<b>Figura 3.40</b> - Gel de TGGE obtido para a análise dos fragmentos resultantes da amplificação do gene 16S rDNA das bactérias associadas às esponjas marinhas .....	Pag. 208
<b>Figura 3.41</b> - Construção filogenética baseada em sequências parciais 16S rDNA de fragmentos clonados isolados a partir de excisão de bandas de TGGE de bactérias associadas a esponjas marinhas .....	Pag. 211

#### 4. CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

<b>Figura 4.1</b> - Carta da Zona Económica Exclusiva Portuguesa .....	Pag. 222
--	----------

#### 6. ANEXOS

<b>Figura 6.1</b> - Curva de calibração para a coluna de cromatografia de filtração em gel S-300, construída a partir valores dos volumes de eluição (Ve) dos marcadores que constam na tabela 6.3 .....	Pag. 243
<b>Figura 6.2</b> - Curva de calibração para a coluna de cromatografia de filtração em gel Superose 6, construída a partir valores dos volumes de eluição (Ve) dos marcadores que constam na tabela 6.4 .....	Pag. 244
<b>Figura 6.3</b> - Curva de calibração para a coluna de cromatografia de filtração em gel Superdex 75, construída a partir valores dos volumes de eluição (Ve) dos marcadores que constam na tabela 6.5 .....	Pag. 245
<b>Figura 6.4</b> - Curva de calibração de densidade do gradiente de Percoll a 90% .....	Pag. 246
<b>Figura 6.5</b> - Representação esquemática do método I de extracção de glúcidos .....	Pag. 248
<b>Figura 6.6</b> - Representação esquemática do método II de extracção de glúcidos .....	Pag. 249
<b>Figura 6.7</b> - Representação esquemática do método III de extracção de glúcidos .....	Pag. 250
<b>Figura 6.8</b> - Representação esquemática do método IV de extracção de glúcidos .....	Pag. 252
<b>Figura 6.9</b> - Cromatogramas do fraccionamento dos h.s.e. das amostras B130, B146, B404, B417, B450, Az05, Az1206/1, Az1206/2, Ber07/1, Ber07/2, Ber07/3, Ber07/100, l'escala, tenaciari, B179, C. varians, B418 e Fe03 .....	Pag. 257
<b>Figura 6.10</b> - Relatório de Análise ICP-AES .....	Pag. 258
<b>Figura 6.11</b> - Alinhamento das sequências dos fragmentos obtidos por amplificação da amostra <i>Cliona varians</i> com o par de 'primers' LS1.5/LS1.3 .....	Pag. 259
<b>Figura 6.12</b> - Alinhamento das sequências Ber07/2-SP6 e Ber07/2-Dino18SF.1 dos fragmentos obtidos por amplificação da amostra Ber07/2 com o par de primers Dino18SF/NL4 .....	Pag. 260
<b>Figura 6.13</b> - Alinhamento das sequências Ber07/2-T7 e Ber07/2-Dino18SF.2 dos fragmentos obtidos por amplificação da amostra Ber07/2 com o par de primers Dino18SF/NL4 .....	Pag. 261



## V. ÍNDICE DE TABELAS

### 2. ERYLUS DISCOPHORUS E INIBIÇÃO DO VIH-1

<b>Tabela 2.1</b> - Compostos com actividade anti-VIH isolados a partir de esponjas .....	Pag. 46
<b>Tabela 2.2</b> - Resumo dos resultados obtidos para a primeira precipitação etanólica do extracto bruto .....	Pag. 63
<b>Tabela 2.3</b> - Quantidades totais para cada uma das amostras obtidas após a primeira precipitação etanólica do extracto bruto .....	Pag. 64
<b>Tabela 2.4</b> - Resumo dos resultados obtidos para a segunda precipitação etanólica do extracto bruto .....	Pag. 65
<b>Tabela 2.5</b> - Determinação da actividade anti-VIH dos precipitados glicídicos .....	Pag. 66
<b>Tabela 2.6</b> - Resumo dos resultados obtidos para as amostras da cromatografia B161 sob SA na matriz Superose 6 .....	Pag. 69
<b>Tabela 2.7</b> - Resumo dos resultados obtidos para as amostras da cromatografia B161/EB na matriz Superose 6 .....	Pag. 73
<b>Tabela 2.8</b> - Resumo dos resultados obtidos para as amostras da cromatografia B161/EB conc. na coluna S-300 .....	Pag. 75
<b>Tabela 2.9</b> - Resumo dos resultados obtidos para as amostras da cromatografia B161/EB conc. na matriz DEAE .....	Pag. 76
<b>Tabela 2.10</b> - Resumo dos resultados obtidos para doseamento de proteínas, glícidos e actividade de iodoperoxidase das fracções recolhidas na cromatografia representada na figura 2.18 .....	Pag. 81
<b>Tabela 2.11</b> - Resumo dos resultados obtidos para as fracções recolhidas na cromatografia do precipitado etanólico na matriz DEAE (Fig. 2.18) .....	Pag. 83
<b>Tabela 2.12</b> - Quantidades de proteína e glícidos totais na amostra e fracções recolhidas na separação cromatográfica do precipitado glicídico B161(VI) na matriz Superose 6 .....	Pag. 86

### 3. FAMÍLIA CLIONIDAE E BIOACUMULAÇÃO DE NÍQUEL

<b>Tabela 3.1</b> - Listagem das esponjas utilizadas no trabalho que consta no capítulo 3 da presente dissertação .....	Pag. 139
---	----------

<b>Tabela 3.2</b> - Especificações do aparelho e condições de operação utilizadas para a determinação da composição elementar de várias amostras por ICP-AES ....	Pag. 149
<b>Tabela 3.3</b> - Quantidades utilizadas na preparação das amostras para determinação do conteúdo em Zn, Fe e Ni por ICP-AES .....	Pag. 150
<b>Tabela 3.4</b> - Listagem das amostras de DNA enviadas por Joana Xavier .....	Pag. 158
<b>Tabela 3.5</b> - Dados relativos aos extractos com choque térmico e respectivos fraccionamentos cromatográficos .....	Pag. 166
<b>Tabela 3.6</b> - Resultados da determinação do conteúdo metálico por ICP das amostras do ensaio de lavagem da esponja .....	Pag. 177
<b>Tabela 3.7</b> - Dados do ensaio de liofilização das esponjas e cálculo das respectivas percentagens de redução de massa .....	Pag. 179
<b>Tabela 3.8</b> - Resumo dos resultados obtidos para a determinação do conteúdo metálico em Ni, Fe e Zn por ICP-AES .....	Pag. 181
<b>Tabela 3.9</b> - Concentrações de ferro, níquel e zinco vulgarmente encontradas no ambiente e no organismo humano .....	Pag. 184
<b>Tabela 3.10</b> - Cálculo da percentagem do conteúdo metálico ao longo do processo de fraccionamento .....	Pag. 186
<b>Tabela 3.11</b> - Concentração proteica e glicídica (em µg/mL de amostra) de extractos h.s.e. e fracções cromatográficas .....	Pag. 189
<b>Tabela 3.12</b> - Descrição e características das estirpes microbianas isoladas por métodos dependentes de cultura a partir das amostras Ber07/1, Ber07/2 e Ber07/3, segundo o procedimento descrito na secção 3.2.1.11.a) i) .....	Pag. 192
<b>Tabela 3.13</b> - Zonas de densidade e respectivas características obtidas na separação por centrifugação em gradiente de Percoll a 90% através do Método 2 .....	Pag. 195

## **6. ANEXOS**

<b>Tabela 6.1</b> - Características das colunas utilizadas nos vários fraccionamentos cromatográficos realizados no decurso deste trabalho .....	Pag. 241
<b>Tabela 6.2</b> - Mini-colunas de cromatografia iónica – ‘HiTrap™ IEX Selection Kit’ (Amersham Biosciences) .....	Pag. 242
<b>Tabela 6.3</b> - Marcadores de massa molecular utilizados na calibração da coluna de filtração em gel S-300 .....	Pag. 243
<b>Tabela 6.4</b> - Marcadores de massa molecular utilizados na calibração da coluna de filtração em gel Superose 6 .....	Pag. 244
<b>Tabela 6.5</b> - Marcadores de massa molecular utilizados na calibração da coluna de filtração em gel Superdex 75 .....	Pag. 245

<b>Tabela 6.6</b> - Marcadores de densidade utilizados para a calibração do gradiente de Percoll 90% .....	Pag. 246
<b>Tabela 6.7</b> - Características dos ‘primers’ utilizados na amplificação dos ácidos nucleicos extraídos de esponjas marinhas .....	Pag. 247
<b>Tabela 6.8</b> - Composição das soluções utilizadas em PAGE .....	Pag. 253
<b>Tabela 6.9</b> - Composição das soluções para preparação dos géis para PAGE .....	Pag. 254
<b>Tabela 6.10</b> - Composição das soluções utilizadas no método de coloração de géis de PAGE com Azul de Coomassie .....	Pag. 254
<b>Tabela 6.11</b> - Soluções e procedimento utilizados no método de coloração de géis de PAGE com nitrato de prata .....	Pag. 255
<b>Tabela 6.12</b> - Soluções utilizadas no método de coloração de géis de PAGE para actividade de IPO pelo método da <i>orto</i> -dianisidina .....	Pag. 256





## **VI. SÍMBOLOS, ACRÓNIMOS E ABREVIATURAS**

Sempre que possível utilizaram-se os termos em português. No entanto, algumas abreviaturas foram utilizadas na sua forma original, provenientes do termo em inglês, por serem a forma utilizada vulgarmente na literatura científica, mesmo na língua portuguesa. Neste caso inserem-se abreviaturas como DNA, RNA, PCR, etc. Todas as expressões escritas em língua estrangeira estão colocadas entre ‘ ‘ seguidas da sua tradução em português (sempre que haja tradução possível) e em itálico apresentam-se os termos científicos provenientes do latim.

% (p/v) – percentagem peso/volume

% (v/v) – percentagem volume/volume

(células) HEK – do inglês ‘Human Embryonic Kidney’ que significa células embrionárias do rim humano

[X] – concentração de X

µg – micrograma

µL – microlitro

µm – micrómetro

µmol – micromol

A – adenina

A.C. – antes de Cristo

Abs – absorvância

ACS- Acetil-CoA sintase

ATP – Adenosina Tri-Fosfato

AU – do inglês ‘Absorbance Units’, que significa unidades de absorvância

AZT – zidovudine

B161/EB – extracto bruto preparado a partir da amostra B161

Bis-Tris - Bis(2-hidroxietil)amino-tris(hidroximetil)metano

bp – do inglês ‘base pairs’, que significa pares de bases

BSA – do inglês ‘Bovine Serum Albumine’, que significa albumina do soro bovino

C – citosina

cm – centímetro

CMFASW – do inglês ‘calcium magnesium free artificial sea water’ que significa água do mar sintética isenta de cálcio e magnésio

CoA – Coenzima A

CoB – Coenzima B

CODH – Monóxido de carbono desidrogenase

CoM – Coenzima M

Conc. – concentração ou concentrado

CPC – do inglês ‘cetyl-pyridinium chloride’ que significa cloreto de cetilpiridínio

CPI – Complexo de Pré-Integração

CSTEE – do francês ‘Comité Scientifique de Toxicologie, Ecotoxicologie et l’Environnement’ que significa Comité Científico de Toxicologia, Ecotoxicologia e do Ambiente

CuSOD – Superóxido Dismutase com centro de Cobre

Da – Dalton

ddH<sub>2</sub>O – água bidestilada

DEAE – Dietilaminoetil

DGGE - do inglês ‘Denaturing Gradient Gel Electrophoresis’, que significa electroforese em gel de gradiente desnaturante

DMEM – do inglês ‘Dulbecco's Modified Eagle Medium’

DMG – dimetilglioxima

DMG(-) – negativo para o teste com dimetilglioxima

DMG(+) – positivo para o teste com dimetilglioxima

DNA – do inglês ‘DeoxyriboNucleic Acid’, que significa ácido desoxiribonucleico

dNTP – di-nucleósido tri-fosfato

DTNB - 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoato

e<sup>-</sup> - electrão

EB – extracto bruto

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

ELISA – do inglês ‘Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay’

et al. – entre outros

EtOH – etanol

FBP – do inglês ‘Fructose Bi-phosphate’ que significa Bis-fosfato de frutose

FDA – do inglês ‘Food and Drug Administration’

FeSOD – Superóxido Dismutase com centro de Ferro

FF – do inglês ‘Fast Flow’ que significa fluxo rápido

Fig. – Figura

FISH - do inglês ‘Fluorescence *In Situ* Hybridization’, que significa fluorescência de hibridização *in situ*

FPLC – do inglês ‘Fast Protein Liquid Chromatography’

g – grama

G – guanina

GABA - do inglês ‘Gamma-AminoButyric Acid’, que significa ácido gama-aminobutírico

Glx – Glioxalase

GSH – glutationo

GTP – Guanosina Tri-Fosfato

h.s.e. – do inglês ‘heat shock extract’ que significa extracto com choque térmico

HAART – do inglês ‘Highly Active Anti-Retroviral Therapy’, que significa terapia anti-retroviral altamente activa

HPO – Haloperoxidase

HR – do inglês ‘High Resolution’ que significa alta resolução

HRPO – do inglês ‘Horseradish Peroxidase’, que significa peroxidase de rábano

ICP – termo abreviado utilizado para referir ICP-AES

ICP-AES – do inglês ‘Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy’

IEX – do inglês ‘Ionic Exchange’ que significa troca iónica

IPO – Iodoperoxidase

ITS – do inglês ‘internal transcribed spacer’ que significa espaçador interno transcrito

kb –  $10^3$  bases

kDa – quiloDalton

kg – quilograma

km – quilómetro

kW – quilowatt

L – litro

liof. – liofilizada

LSU – do inglês ‘large subunit’ que significa subunidade grande

LTR – do inglês ‘Long Terminal Repeats’

- M – molar, mol/L, mol/dm<sup>3</sup>
- m.a. – milhões de anos
- MG – Metilglioxal
- mg – miligrama
- MHz – megahertz
- min – minuto
- mL – mililitro
- MM – massa molecular
- mm – milímetro
- mM – milimolar
- MnSOD – Superóxido Dismutase com centro de Manganês
- mRNA – RNA mensageiro
- MS – meio simples
- n.a. – não se aplica
- n.c. – não conclusivo
- n.d. – não determinado
- NC – Nucleocápside
- NCBI – do inglês ‘National Center for Biotechnology Information’
- NCI – do inglês ‘National Cancer Institute’
- NiSOD – Superóxido Dismutase com centro de Níquel
- nm – nanometros
- NOBA - 3-nitrosobenzamida
- °C – graus centígrados ou Celsius
- pb – pares de bases
- PCR - do inglês ‘Polymerase Chain Reaction’, que significa reacção em cadeia da polimerase
- pg – picograma
- pH – potencial de Hidrogénio
- pmol – picomoles
- PPIase - peptidil-prolil-*cis/trans* isomerase
- ppm – partes por milhão
- prep grade – grau preparativo
- PVDF – do inglês ‘polyvinylidene fluoride’ que significa fluoreto de polivinilideno

RNA – do inglês ‘RiboNucleic Acid’, que significa ácido ribonucleico

rRNA – RNA ribossomal

RT – do inglês ‘Reverse Transcriptase’, que significa transcriptase reversa

SDS-PAGE – do inglês ‘Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis’, que significa electroforese em gel de poliacrilamida e dodecil-sulfato de sódio

SIDA – Síndrome da ImunoDeficiência Adquirida

SIV - do inglês ‘Simian Immunodeficiency Virus’, que significa Vírus da Imunodeficiência em Símios

sob EtOH liof – sobrenadante proveniente da precipitação com etanol após liofilização

sob EtOH rv – sobrenadante proveniente da precipitação com etanol após evaporação

sob vácuo (rotavapor)

Sob SA – sobrenadante proveniente da precipitação com sulfato de amónio

SOD – Superóxido Dismutase

T – timina

T<sup>a</sup> amb – temperatura ambiente

TAE – Tris-acetato-EDTA

TBS – do inglês ‘Tris-buffered saline’ que significa solução salina tamponada de Tris

TBSAS – do inglês ‘Tris-buffered sorbitol artificial saline’ que significa solução salina artificial tamponada de Tris-sorbitol

TBSPS – do inglês ‘Tris-buffered sorbitol Percoll saline’ que significa solução salina tamponada de Tris-sorbitol com Percoll

TCID – do inglês ‘Tissue Culture Infective Dose’

TE – Tris-EDTA

TEM – do inglês ‘transmission electron microscopy’ que significa microscopia electrónica de transmissão

TGGE - do inglês ‘Temperature Gradient Gel Electrophoresis’, que significa electroforese em gel de gradiente de temperatura

TIM – fosfato de triose isomerase

TNB - 5-tio-2-nitrobenzoato

Tris – Tris-(hidroximetil)-aminometano

U – unidade de actividade enzimática

u.m.a. – unidades de massa atómica

UV- ultravioleta

V – volume

V<sub>0</sub> – volume de vazio

V<sub>e</sub> – volume de eluição

VIH – Vírus da Imunodeficiência Humana

VIH-1 - Vírus da Imunodeficiência Humana Tipo 1

VIH-2 - Vírus da Imunodeficiência Humana Tipo 2

V<sub>t</sub> – volume total

ZEE – Zona Económica Exclusiva

$\epsilon_M$  – absorvidade molar

*'Billions of years ago, deep under the ocean, the pores and pockets in minerals that surrounded warm, alkaline springs catalyzed the beginning of life.'*

(Russel 2006)





# **1. INTRODUÇÃO**

---



# 1. INTRODUÇÃO

Estima-se que o planeta Terra tenha cerca de 4600 milhões de anos (m. a.), embora as rochas mais antigas datem de cerca de 3900 milhões de anos pois a superfície da Terra, nos seus primórdios, entrou em fusão, como resultado do bombardeamento de grandes quantidades de detritos cósmicos e do calor gerado pelo decaimento radioactivo de isótopos instáveis (Gould 1994).

As primeiras formas de vida – bactérias e cianófitas – surgiram há cerca de 3800 milhões de anos (Kutschera e Niklas 2004). A vida permaneceu quase exclusivamente unicelular durante os primeiros cinco sextos da sua história. Criaturas mais complexas surgiram após este início procariota – primeiro a célula eucariota, talvez há cerca de 2000 milhões de anos, depois os animais multicelulares (Gould 1994).



Figura 1.1 – Painel existente no Aquário Vasco da Gama, Lisboa, Portugal (fotografia pessoal)

Há mais de 600 milhões de anos, o progenitor multicelular dos animais actuais evoluiu a partir de um flagelado marinho unicelular. A partir de um começo tão modesto divergiu toda a diversidade dos metazoários: desde as esponjas marinhas, aos insectos, anfíbios e humanos (King 2004).

## 1.1. AS ESPONJAS MARINHAS

As esponjas, ou poríferos – proveniente do latim, que significa “com poros” - são animais sedentários, essencialmente filtradores, que vivem fixos a um substrato bentónico durante a maior parte da sua vida.

As esponjas sobreviveram até aos dias de hoje basicamente inalteradas a nível morfológico, desde o período Câmbrico Superior (há 509 m.a.) (Hooper e Soest 2002) e representam, actualmente, a forma de vida multicelular mais simples, semelhante, em termos evolutivos, à vida multicelular primordial (Misevic, Ripoll et al. 2007). São os animais mais primitivos existentes nos nossos dias e, por isso, são consideradas fósseis vivos (Li, Chen et al. 1998).

### 1.1.1. Morfologia

As esponjas não possuem diferenciação celular nem verdadeiros tecidos ou órgãos. Os seus sistemas nervoso e imunitário são rudimentares; elas não possuem neurónios mas são capazes de responder a estímulos externos através de receptores GABA (do inglês ‘Gamma-AminoButyric Acid’, que significa ácido gama-aminobutírico) e conseguem distinguir entre alogénico e autogénico através de complexos sistemas moleculares – semelhantes às vias de transdução de sinal e interferões conhecidos nos eucariotas superiores (Müller, Wiens et al. 2004) e gliconectinas que permitem o reconhecimento e adesão celular (Misevic, Ripoll et al. 2007). O seu movimento está reduzido ao movimento celular, uma vez que também não possuem músculos.

A superfície exterior da esponja – **ectossoma** – está rodeada por uma camada unicelular – **exopinacoderme** – composta por células epiteliais – **pinacócitos**. Algumas destas células epiteliais formam pequenos poros externos – **óstios** ou poros inalantes – através dos quais a água é inalada; outras formam poros maiores – **ósculos** ou poros exalantes – através dos quais a água é expelida.

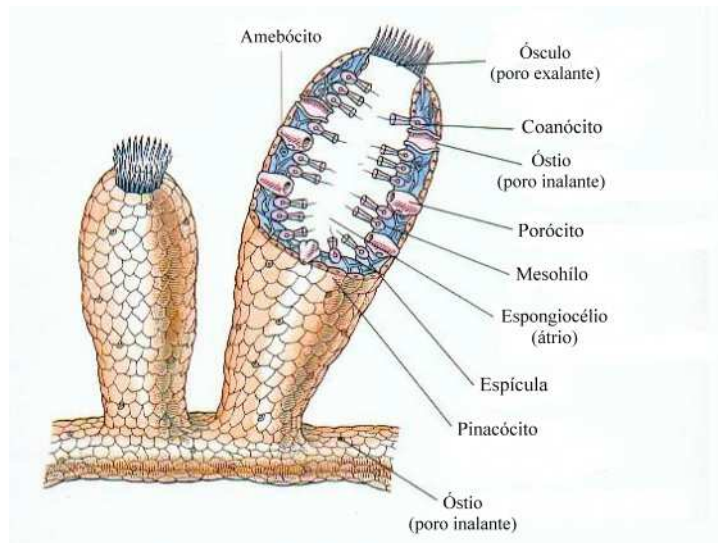


Figura 1.2 – Morfologia geral de uma esponja marinha  
(adaptado de <<http://universe-review.ca/I10-82-sponge2.jpg>>)

O interior da esponja, denominado **coanossoma**, é vasculado por canais de água e é limitado por uma única camada de células – **porócitos** – formando a **endopinacoderme**. O bombeamento da água através dos canais é executado pelos **coanócitos** – células flageladas existentes exclusivamente nas esponjas.

O tecido da esponja, rodeado pela pinacoderme, designa-se por **mesohílo**. Este é composto por colagénio, um esqueleto orgânico de fibras de espongina e/ou um esqueleto inorgânico formado por espículas minerais, que podem ser de carbonato de cálcio ou sílica. Embebidas no mesohílo encontram-se células totipotentes, capazes de alterar a sua função de acordo com as necessidades do animal. Dentro destas incluem-se células amebóides designadas por **arqueócitos**, bem como muitos outros tipos de células que se especializaram em determinadas funções, como produzir fibras – **colanócitos** – secretar espículas - **esclerócitos** – executar a contracção em redor dos poros exalantes – **miócitos** – etc. (Hooper 1995)

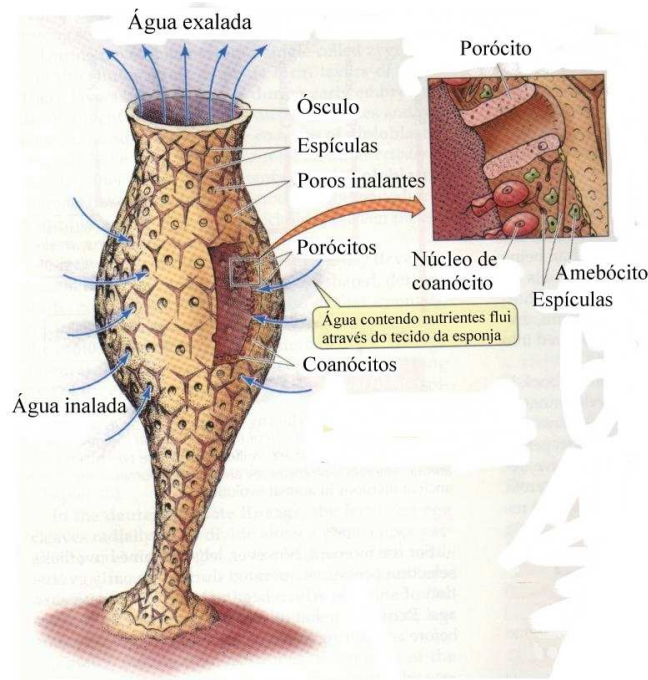


Figura 1.3 – Plano morfológico e fluxo de água numa esponja marinha  
(adaptado de (Purves, Orians et al. 1998))

As esponjas alimentam-se por filtração, extraíndo, da água que entra e circula nos seus canais, nutrientes e oxigénio. Os arqueócitos, movendo-se livremente pelo mesohílo, capturam partículas orgânicas existentes na corrente de água inalante (incluindo células intactas de microrganismos), digerem-nas no interior de vacúolos fagocíticos e libertam os produtos não digeridos na corrente exalante (Reiswig 1971).

A organização genómica das esponjas demonstrou ser extremamente complexa e inesperadamente muito superior, em termos de densidade génica, a todas as expectativas. Estima-se que as esponjas tenham cerca de 300000 genes, distribuídos num genoma de tamanho total de  $1670 \times 10^6$  bases, perfazendo uma densidade genómica de cerca de 5000 nucleótidos por gene. Como termo de comparação, o genoma humano possui 8000 genes distribuídos num total de  $3000 \times 10^6$  bases. O número de intrões – ou sequências não codificantes – é surpreendentemente baixo e estima-se que cerca de 60% dos intrões tenham entre 0,1 e 0,5 kb (Breter, Grebenjuk et al. 2003).

### 1.1.2. História e Taxonomia

Já na Grécia antiga as esponjas marinhas eram conhecidas e utilizadas como utensílios domésticos, para o banho e para almofadar armaduras. Aristóteles parece ter sido o primeiro a descrever as esponjas marinhas como objecto de estudo científico. Terá sido ele o primeiro autor a reconhecer as esponjas como animais, em contradição com Plínio, que defendia que as esponjas eram intermediários entre os reinos animal e vegetal (Hooper e Soest 2002).

Ainda hoje a taxonomia de esponjas é um assunto controverso, embora as ferramentas de biologia molecular disponíveis tenham permitido grandes avanços neste campo (Boury-Esnault e Solé-Cava 2004).

O Filo Porifera, totalmente dedicado às esponjas, encontra-se entre os mais diversos e bem sucedidos filos de invertebrados marinhos. Existem mais de 7000 espécies descritas, com representantes em todos os tipos de habitats aquáticos – desde locais de água doce até às fossas abissais (Hooper e Soest 2002), várias condições de temperatura, profundidade, salinidade e luminosidade (Rützler 2004). Este facto demonstra a elevada capacidade das esponjas sobreviverem e se adaptarem a condições de vida extremas.

Dentro do seu filo, as esponjas subdividem-se em três classes: *Demospongia*, *Hexactinellida* e *Calcarea*. Os critérios taxonómicos utilizados para a identificação das esponjas a nível de espécie são vastos e, por vezes, curiosos. Eles incluem: forma, tamanho, cor, textura, produção de muco e cheiro, ornamentação superficial, presença, forma e natureza química de espículas, etc. (Hooper 1995). Mais recentemente, a resolução taxonomica destes animais tem-se baseado também em critérios filogenéticos e encontra-se em desenvolvimento um projecto para a atribuição de um “código de barras” fiável que permita distinguir facilmente as várias esponjas a nível de espécie (<http://www.spongebarcoding.org>) (Wörheide, Erpenbeck et al. 2007).

A classe *Calcarea* compreende apenas cerca de 5% das espécies vivas; é facilmente identificável pela presença de espículas de carbonato de cálcio e uma verdadeira organização celular. A classe *Hexactinellida*, ou esponjas de vidro, como são também conhecidas, possuem um esqueleto inteiramente composto por espículas siliciosas, dispostas em arranjos hexagonais, possuem sincícios em vez de verdadeiras

células e são essencialmente esponjas de altas profundidades. A classe *Demospongia* engloba esponjas com e sem esqueleto mineral silicioso embebido numa matriz de fibras de espongina e/ou colagénio e representa cerca de 85% das espécies de esponjas existentes actualmente (Hooper 1995; Hooper e Soest 2002; Leys, Rohksar et al. 2005).

### **1.1.3. Reprodução**

Uma vez que as esponjas não possuem diferenciação celular, elas não são dotadas de um sistema reprodutor definido, tendo, no entanto, uma série de diferentes estratégias reprodutivas.

No Filo Porifera a reprodução pode ser sexuada ou assexuada. Assexuadamente, as esponjas podem reproduzir-se por gemulação e/ou por partenogénese. Por gemulação, um pequeno fragmento da esponja – gema - dá origem a um novo animal, que será geneticamente idêntico ao progenitor. Por partenogénese, o progenitor produz um ovo que não necessita ser fecundado para originar um novo animal.

Na reprodução sexuada, os gâmetas são produzidos por células estaminais existentes no adulto. Algumas esponjas são hermafroditas, produzindo tanto gâmetas femininos como masculinos, mas expulsam-nos em alturas diferentes, para impedir a auto-fecundação. Algumas espécies são ovíparas, lançando os seus gâmetas para a água. Muitas vezes esta libertação é tão intensa que se formam nuvens em redor das esponjas. Contudo, a maioria das esponjas é vivípara, cuidando do desenvolvimento do seu embrião até que se forme uma larva ciliada que se desprende do progenitor e nada livremente durante alguns dias até se fixar a um substrato e formar uma nova esponja (Purves, Orians et al. 1998; Leys, Rohksar et al. 2005).



#### **1.1.4. Ecologia**

As esponjas são animais extremamente sociais; elas estão inseridas em ecossistemas dinâmicos, estabelecendo e estando sujeitas a relações de simbiose, comensalismo, parasitismo, competição e predação (Rützler 2004).

Entre os predadores das esponjas incluem-se algumas espécies de moluscos, equinodermes, peixes e tartarugas marinhas. Algumas esponjas adoptaram estratégias físicas de defesa anti-predação adquirindo características estruturais ou morfológicas específicas, como seja uma elevada densidade e tamanho de espículas nos tecidos – o que diminui o valor nutritivo da esponja e a torna mais difícil de digerir – uma elevada taxa de crescimento e regeneração da esponja - que lhe permite superar os danos físicos causados pelos predadores - ou fixação e crescimento em locais inacessíveis aos seus predadores.

Mas a mais importante linha defensiva das esponjas consiste numa estratégia química de defesa. As esponjas sintetizam compostos tóxicos, antibióticos e/ou antidegustantes como forma de dissuadir os predadores. Podem ainda ser sintetizados pela esponja outros compostos que promovem o crescimento de diferentes organismos à sua superfície e/ou ao seu redor, conferindo-lhe uma maior protecção (Pawlik 2002).

Também nas relações de competição estes compostos desempenham funções essenciais. As esponjas são ferozes competidoras espaciais contra outras esponjas, corais e outros organismos bentónicos, sintetizando, para o efeito, substâncias inibidoras de crescimento que lançam para a água ou que actuam por contacto directo (Nishiyama, Bakus et al. 2004; Voogd, Becking et al. 2004).

As esponjas são organismos extremamente ricos em endofauna. É comum encontrar, embebidos no tecido da esponja ou à sua superfície, organismos como pequenos crustáceos, peixes, poliquetas, algas, bivalves, etc ou até outras esponjas, bem como uma panóplia de microrganismos (Weinberg, Glyzina et al. 2004; Ávila, Carballo et al. 2007). É difícil distinguir o tipo de relações que estes organismos estabelecem, podendo abranger desde o parasitismo a verdadeiras relações de simbiose. Estas

interacções são geralmente muito complexas e pouco se conhece sobre elas na maioria das esponjas, sendo difícil determinar a sua relevância ecológica e o organismo alvo. As esponjas empregam várias defesas químicas simultaneamente contra vários organismos e em diferentes escalas, assim como os seus metabolitos podem actuar contra várias ameaças, constituindo verdadeiras ferramentas multi-funcionais (Thoms e Schupp 2007).

Porém, nos dias de hoje, a maior ameaça contra as esponjas é de natureza antropológica. Como acontece com muitos outros organismos no nosso planeta, o Homem é o seu maior predador. A destruição dos ecossistemas marinhos, devido à sobre-exploração marítima, às pescas por arrastão, à contaminação ambiental, e também às alterações climáticas, são assuntos que merecem uma reflexão profunda e uma abordagem séria por parte das autoridades e do cidadão comum.

As alterações climáticas, que se pensa serem as maiores responsáveis pelo aumento da temperatura das águas oceânicas e pelo crescente número de tempestades, começam já a demonstrar os seus efeitos e a fazer vítimas entre os frágeis ecossistemas marinhos. Um desses efeitos, denominado 'bleaching' ou lixiviação, consiste na perda dos microrganismos associados ao animal. Este fenómeno foi inicialmente observado em corais (Ostrander, Armstrong et al. 2000) mas estudos posteriores provaram a sua existência também em esponjas (Webster, Cobb et al. 2008). O nome lixiviação deve-se ao facto de o animal perder os organismos fotossintéticos (entre outros) que lhe estão associados e que lhe conferiam cor. O primeiro sintoma é, então, a perda ou alteração dramática da cor do animal. A comunidade microbiana associada à esponja altera-se drasticamente, passando esta a ser colonizada por agentes patogénicos que levam à necrose dos seus tecidos e conseqüente morte. É um processo rápido embora nalguns casos seja reversível e a esponja consiga recuperar. Em grande escala, este fenómeno leva à perturbação do equilíbrio dinâmico do ecossistema, uma alteração dramática da comunidade bentónica e à proliferação de espécies invasoras, com a conseqüente perda de outras espécies (Ostrander, Armstrong et al. 2000; Webster, Cobb et al. 2008).

### 1.1.5. Microrganismos Associados

De entre todos os consórcios que se conhecem, estabelecidos entre esponjas e outros organismos, aqueles que envolvem microrganismos são os que têm obtido maior atenção e relevância nos últimos anos. Existe, de facto, um mundo microbiano desconhecido no interior das esponjas (Vogel 2008). A comunidade microbiana associada às esponjas pode perfazer até cerca de 40% do seu biovolume, variando de espécie para espécie. Estes microrganismos – bactérias, cianobactérias, archaea, fungos e microalgas - podem distribuir-se extracelularmente no mesohílo da esponja ou habitar intracelularmente os arqueócitos, em vacúolos ou até mesmo no núcleo da célula (Vacelet e Donadey 1977; Wilkinson 1978c; Friedrich, Merkert et al. 1999).

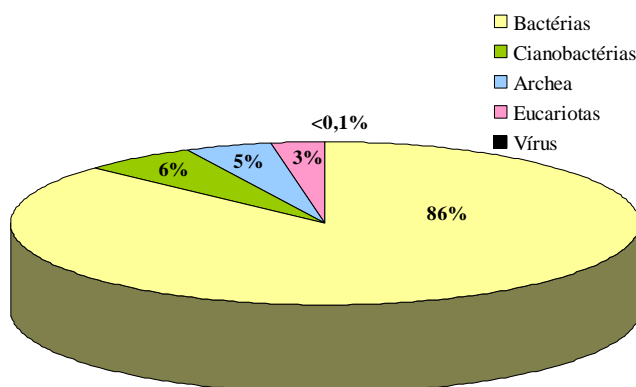


Figura 1.4 – Diversidade microbiológica associada às esponjas baseada no número de sequências depositadas na base de dados do ‘National Center for Biotechnology Information’ (NCBI – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) em Junho de 2008

As relações que as esponjas mantêm com estes microrganismos são complexas e, na maioria dos casos, não existem evidências concretas de que se estabeleçam verdadeiras relações simbióticas. Daí eles serem referidos como consórcios ou microrganismos associados, em detrimento do termo simbiontes.

As primeiras pistas da existência destes consórcios surgiram na década de 70, através de estudos de microbiologia clássica e microscopia electrónica, revelando uma grande quantidade de microrganismos, embora a diversidade fenotípica e morfológica fosse reduzida (Wilkinson 1978a; Wilkinson 1978b; Wilkinson 1978c; Wilkinson, Garrone et al. 1984). Mas, limitações associadas a estas técnicas, protelaram durante

vários anos um conhecimento mais profundo acerca destas associações, até ao aparecimento e uso corrente de ferramentas de biologia molecular.

Embora as observações microscópicas tenham fornecido informação preciosa quanto à presença e localização dos microrganismos, a sua limitada variabilidade de características morfológicas impediu a sua identificação taxonómica ao nível de espécie. Também os métodos clássicos de cultivo microbiológico representaram um entrave, uma vez que a maioria destes organismos não são facilmente cultiváveis, se cultiváveis de todo. Recentemente, com a introdução de técnicas correntes de biologia molecular – a construção de bases de dados filogenéticas para os genes 18S rRNA (para eucariotas) e 16S rRNA (para procariotas), PCR (do inglês ‘Polymerase Chain Reaction’), DGGE (do inglês ‘Denaturing Gradient Gel Electrophoresis’), TGGE (do inglês ‘Temperature Gradient Gel Electrophoresis’) e FISH (do inglês ‘Fluorescence *In Situ* Hybridization’)-, esta área ganhou um novo fôlego (Imhoff e Stöhr 2003). No entanto, restam ainda muitas lacunas no conhecimento destas associações enigmáticas; a fisiologia destas relações permanece obscura e não existe uma visão clara da diversidade microbiana e dos factores que a influenciam (Taylor, Radax et al. 2007).

#### **a) Diversidade Microbiológica**

As esponjas são capazes de filtrar até 24000 litros de água por kg de tecido (Taylor, Radax et al. 2007), funcionando como verdadeiros concentradores de microrganismos (Hentschel, Usher et al. 2006). A eficiência da capacidade de filtração da esponja relaciona-se directamente com o tamanho dos óstios e comprimento e complexidade do sistema aquífero. O número de bactérias presentes no tecido da esponja é proporcional à densidade do seu mesohílo (Wilkinson 1978a) e, neste aspecto, há que distinguir entre esponjas com baixa densidade microbiológica e bacteriosponjas – esponjas com elevada abundância de microrganismos. Nestas últimas, a densidade populacional bacteriana pode atingir  $10^8$  a  $10^{10}$  bactérias por grama de esponja, excedendo a concentração bacteriana da coluna de água em 2 a 4 ordens de grandeza (Hentschel, Usher et al. 2006).

Sabe-se que as esponjas são capazes de se alimentar de pequenas partículas e até de células inteiras existentes na corrente de água inalante (Reiswig 1971). Este facto

parece contradizer a existência de células metabolicamente activas no interior do tecido da esponja, mas pensa-se existir um mecanismo de distinção entre as bactérias “alimentares” e as bactérias comensais ou simbióticas (Wilkinson, Garrone et al. 1984). Esta situação enigmática pode ser explicada de duas formas: (1) a esponja é capaz de reconhecer e distinguir especificamente os simbiosites das bactérias alimentares ou (2) os simbiosites possuem paredes celulares espessas e resistentes que lhes permitem evadir-se das células fagocíticas da esponja.

Como se pode ver na figura 1.4, os microrganismos mais abundantes nas esponjas são as bactérias, nas quais se incluem as cianobactérias e as arqueobactérias, que perfazem cerca de 97% dos consórcios conhecidos. Como representantes dos eucariotas, podemos encontrar microalgas (zooxanthellae e diatomáceas) e fungos; estes últimos, curiosamente, são extremamente aparentados com fungos terrestres (Taylor, Radax et al. 2007). Pouco se sabe sobre partículas virais associadas às esponjas. Na base de dados do NCBI foram depositadas apenas duas sequências de citofagos associados a esponjas e na literatura existe apenas uma referência a esta associação (Vacelet e Gallissian 1978). No entanto, estas partículas podem simplesmente constituir um agente patológico da esponja.

Estão documentadas espécies bacterianas associadas às esponjas representantes de 14 filos diferentes: *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Deinococcus-Thermus*, *Cyanobacteria*, *Firmicutes*, *Gemmatimonadetes*, *Nitrospira*, *Planctomycetes*, *Proteobacteria* (*alfa*, *beta*, *delta* e *gama*), *spirochaetes* e *Verrucomicrobia* (Taylor, Radax et al. 2007). Mais recentemente foi proposto um novo filo de bactérias extremamente específicas e filogeneticamente complexas, que parecem ser exclusivas às esponjas – *Poribacteria* (Fieseler, Horn et al. 2004). Estas bactérias são compartimentalizadas, possuindo um nucleóide, característica extremamente invulgar nas células procariotas, com a excepção das espécies pertencentes ao filo *Planctomycetes*. As *Poribacteria* fazem parte de uma “assinatura microbiana”, de cerca de 100 espécies (Vogel 2008), que aparece consistentemente em todas as esponjas, independentemente da espécie e da localização geográfica (com algumas excepções, que podem ser atribuídas ao facto dessas esponjas serem espécies de baixa densidade microbiológica). Até agora não foi reportada a presença destas bactérias noutros organismos marinhos ou até mesmo na coluna de água, embora neste último caso se

possa tratar apenas de um problema de concentração. As sequências 16S rRNA recolhidas destas bactérias formam uma nova linhagem evolucionária e propõe-se que esta seja uma associação evolucionariamente antiga (Fieseler, Horn et al. 2004).

As esponjas constituem verdadeiros reservatórios de microrganismos que, de outro modo, seriam inacessíveis (Hentschel, Usher et al. 2006). A variedade morfológica e metabólica destes consórcios é extensa, abrangendo organismos procariotas e eucariotas, autotróficos, heterotróficos, aeróbios e anaeróbios (obrigatórios ou facultativos), fotossintéticos, metanogénicos, nitrificantes, redutores de sulfato e desalogenadores (Taylor, Radax et al. 2007). Na maioria dos casos não estão provadas verdadeiras relações simbióticas entre a esponja e os seus “inquilinos”, mas pensa-se que, provavelmente, existirão trocas de metabolitos entre o hospedeiro e os seus comensais. Estas trocas poderão beneficiar nutricionalmente a esponja e/ou o microrganismo ou conferir-lhe defesas químicas, ao mesmo tempo que o tecido do hospedeiro constitui um local de protecção para os seus simbiosites. No entanto, não existem provas concretas de que estes processos ocorram realmente nas esponjas, constituindo, estas ideias, uma especulação baseada em fenómenos já conhecidos na natureza envolvendo outros organismos (Vogel 2008).

#### **b) Origem Evolucionária ou Ambiental?**

O panorama geral do estudo destes consórcios microbiológicos aponta para a existência de uma mistura de microrganismos generalistas e especialistas, com comunidades microbianas que podem ser estáveis no tempo e no espaço (Taylor, Radax et al. 2007) ou que podem ser apenas transientes e resultantes da sua presença no meio ambiente. A questão que se impõe a cada um dos putativos simbiosites descobertos nas esponjas é: existe realmente uma relação simbiótica, evolucionariamente antiga, ou trata-se apenas de contaminação ambiental?

Alguns autores defendem que as esponjas terão adquirido os seus simbiosites há 600 milhões de anos atrás, durante o período pré-Câmbrico, antes da divergência evolucionária das esponjas, o que constituiria a associação metazoário-microrganismo

mais primitiva no nosso planeta. O ancestral primitivo das esponjas terá sido colonizado por um ou vários microrganismos existentes nos oceanos naquela era e terá co-evoluído com o seu hospedeiro de um modo tão específico que é impossível a sua sobrevivência, hoje em dia, fora do hospedeiro. Este mecanismo pressupõe a co-evolução dos simbiontes, a existência de simbiontes obrigatórios na esponja e a transmissão vertical dos simbiontes, quer de forma assexuada (estando já presentes nas células-mãe) quer de forma sexuada (havendo passagem dos microrganismos nos gâmetas) (Vacelet e Donadey 1977; Wilkinson 1978c; Wilkinson, Garrone et al. 1984; Schmitt, Wehrl et al. 2007; Sharp, Eam et al. 2007; Taylor, Radax et al. 2007).

Há também a considerar a hipótese de que a aquisição destes organismos terá sido puramente ambiental, mas que se manteve devido às vantagens nutricionais e/ou ecológicas que esta associação terá trazido para um ou ambos os membros. Outros estudos sugerem que a herança microbiana das esponjas será resultante de ambos os processos: transmissão ambiental e parental (Taylor, Radax et al. 2007).

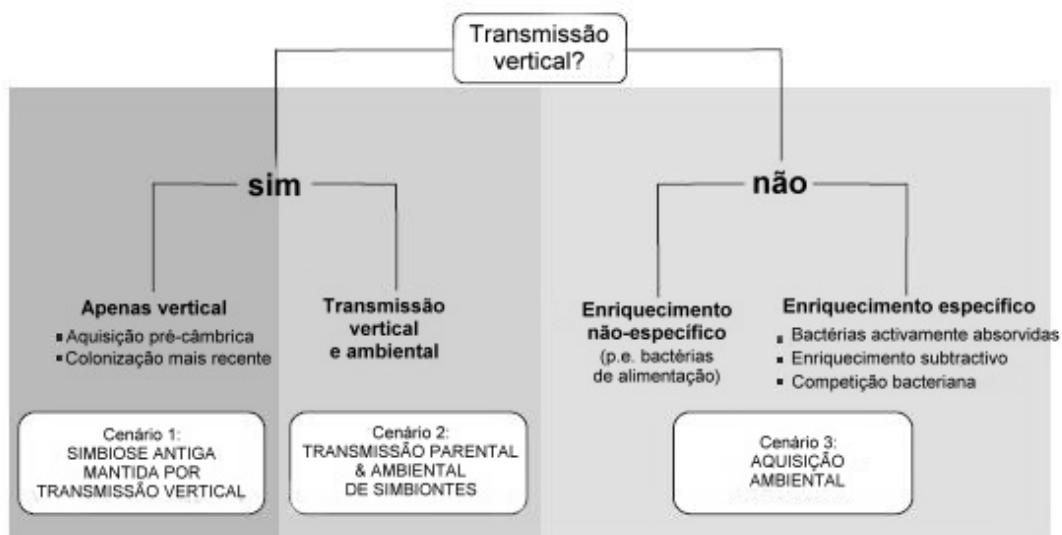


Figura 1.5 – Resumo dos possíveis cenários evolucionários dos consórcios esponja-microrganismo (adaptado de (Taylor, Radax et al. 2007))

### c) **Produtos Naturais: Hospedeiro ou Simbionte?**

Já desde há alguns anos, as esponjas são reconhecidas como fontes importantes de metabolitos com estruturas intrincadas e altamente invulgares, que apresentam actividades bioactivas de extrema importância a nível biotecnológico e/ou farmacêutico. Com a descoberta de cada vez mais microrganismos, alguns deles exclusivos às esponjas e até então desconhecidos, a questão da origem biológica destes compostos torna-se crucial para o prosseguimento destas linhas de investigação.

De facto, para o composto manzamine A, que foi isolado inicialmente de uma esponja marinha e que demonstrou possuir uma potente actividade anti-malária - ainda mais eficiente que os fármacos já existentes no mercado – esclareceu-se recentemente que este é produzido por uma bactéria associada à esponja e não pela própria esponja (Vogel 2008). Outros exemplos incluem um péptido com actividade antibacteriana produzido por uma *Vibrio sp.* associada à esponja *Hyatella sp.*; um glicerolípido com actividade antitumoral, proveniente de uma *Microbacterium sp.* associada à esponja *Halichondria panicea*; várias quinolonas com actividades antimicrobiana e citotóxica, isoladas a partir de uma *Pseudomonas* que cohabita a esponja *Homophymia sp.* (Taylor, Radax et al. 2007); das esponjas *Aplysina aerophoba* e *Aplysina cavernicola* foram isoladas várias estirpes bacterianas que revelaram possuir actividade antimicrobiana (Hentschel, Schmid et al. 2001); num estudo que incluiu várias esponjas existentes na costa australiana foi encontrada também uma estirpe bacteriana com uma potente actividade antibiótica (Dey, Aravena-Roman et al. 2004).

Estes consórcios esponja-microrganismos prometem mudar o modo como olhamos para as bactérias. Consideradas pelo público em geral como agentes patogénicos, elas demonstram agora serem capazes de vir a salvar muitas vidas, através do combate a epidemias globais que nos afectam actualmente.



## 1.2. BIOTECNOLOGIA MARINHA

A Biotecnologia Marinha é a ciência na qual os organismos marinhos são utilizados, total ou parcialmente, para obter ou transformar produtos, otimizar plantas ou animais, ou para desenvolver microrganismos para usos específicos (Jha e Zi-rong 2004).

Os produtos naturais são usados desde há muito em alimentos, fragrâncias, pigmentos, insecticidas, medicamentos, cosméticos, etc. Devido à sua fácil acessibilidade, as plantas terrestres constituíram a maior fonte de produtos biologicamente activos. Com o desenvolvimento de novas técnicas de submersão, robots submarinos, etc., é possível, hoje em dia, recolher amostras marinhas anteriormente inacessíveis. Na última década, mais de 5000 novos compostos foram isolados de organismos marinhos, em habitats que abrangem desde zonas costeiras e águas pouco profundas até às fossas abissais oceânicas, a mais de 900 m de profundidade (Jha e Zi-rong 2004).

De entre todos os organismos marinhos, as esponjas são os mais prolíficos produtores de novos compostos, sendo reportados mais de 200 novos metabolitos por ano (Taylor, Radax et al. 2007).

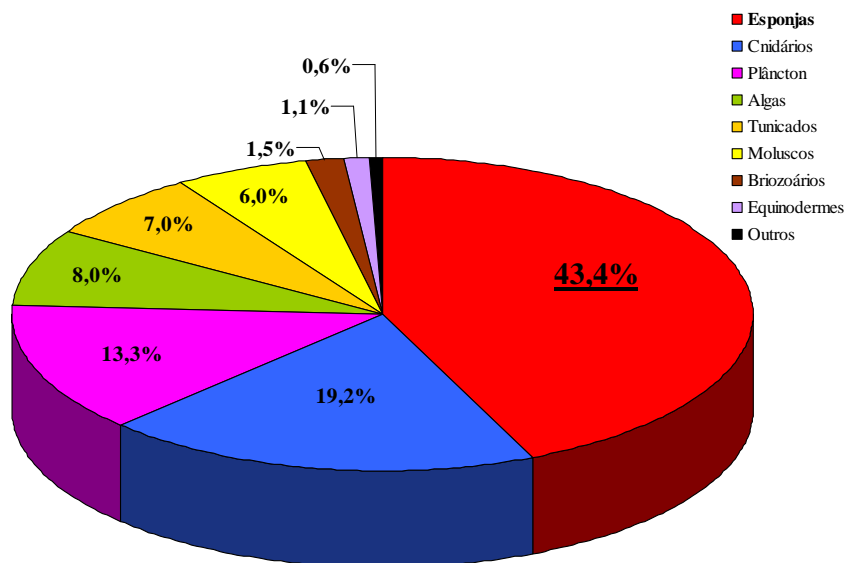


Figura 1.6 – Produtos naturais extraídos de organismos marinhos (adaptado de (Faulkner 2001))

Estes produtos têm actividades muito variadas que vão desde potenciais aplicações farmacêuticas ou biomédicas – antivirais, antitumorais, antibióticas, analgésicas, anti-inflamatórias, etc – a aplicações tecnológicas como anti-‘fouling’, biomateriais (Ehrlich e Worch 2007) e bioremediação. No entanto, a correlação entre a descoberta destes compostos e a sua passagem à fase de testes pré-clínicos não é directa. Embora muitos destes novos produtos apresentem actividades muitas vezes mais potentes que os fármacos já existentes no mercado, poucos conseguem chegar à fase de comercialização. As excepções honrosas a este facto são os compostos Ara-A e Ara-C, comercializados como agentes antiviral e anticancerígeno, respectivamente (Taylor, Radax et al. 2007).

Estes produtos naturais biologicamente activos são muitas vezes produzidos em quantidades diminutas e por organismos raros. É necessário, então, desenvolver técnicas para a produção sustentável destes compostos que permitam um ‘scale-up’, essencial para a sua aplicação em grande escala (Brümmer e Nickel 2003; Taylor, Radax et al. 2007; Vogel 2008).

O desenvolvimento de tecnologias que permitem o ‘screening’ de múltiplas actividades biológicas em várias amostras simultaneamente, de uma forma rápida e eficiente, tem permitido a descoberta de cada vez mais substâncias com potencial aplicação biotecnológica. O fraccionamento, acompanhado de ensaios de actividade biológica, com vista ao isolamento (total ou parcial) e subsequente caracterização da natureza química do composto de interesse deverá ser o primeiro passo no desenvolvimento de uma linha de investigação lógica e racional. Seguidamente, é essencial a escolha do método mais indicado que vise a obtenção do produto de interesse de uma forma economicamente viável e sustentada e em quantidades que permitam a sua produção à escala industrial.

### **1.2.1. Métodos Dependentes de Cultura**

Antes de se optar por qualquer método de cultura, é crucial esclarecer a origem biológica do produto em questão: esponja ou microrganismo. Métodos como a citometria de fluxo, a centrifugação por gradiente, o uso de anticorpos ou de microscopia de fluorescência, consistem técnicas de localização do metabolito de interesse, embora não permitam a sua recolha em grandes quantidades (Taylor, Radax et al. 2007).

Importa também esclarecer se a produção do metabolito por parte do organismo é sazonal ou se é uma produção temporal e espacialmente estável. Há ainda a ter em conta que alguns compostos são produzidos exclusivamente pelo consórcio hospedeiro-simbionte ou até que essa produção depende de um ‘in-take’ nutricional (ou seja, a biossíntese do produto bioactivo requer a presença de um metabolito primário que é fornecido naturalmente na dieta do organismo).

#### **a) Cultivo da esponja *in situ***

Já desde há um século que se pratica, com sucesso, o cultivo de esponjas em regime aberto – ou maricultura - nas zonas costeiras do Oeste mediterrânico para utilização como esponjas de banho naturais. A técnica consiste em transplantar pequenos segmentos da esponja para zonas delimitadas e protegidas, fixá-las em cordas ou mechas que permitam a sua fixação ao substrato e crescimento.

A colecta pode ser feita cortando pequenos pedaços de tecido em zonas cujo dano seja mínimo para o animal e permitam a sua total regeneração ou então a excisão do animal inteiro seguida de transplantação de novos indivíduos.

Esta técnica tem como vantagem a mimetização do ambiente natural do animal, permitindo uma adaptação mais fácil e rápida, sem interferir drasticamente no metabolismo e possíveis relações simbióticas do organismo. Os parâmetros a ter em conta são a natureza do substrato, profundidade, temperatura e luminosidade. No entanto, nem todas as espécies se revelaram cultiváveis deste modo, tendo uma baixa taxa de sobrevivência ou um crescimento reduzido.

Como desvantagens podemos apontar a dificuldade de controlar os parâmetros e condições de cultivo e a exposição e vulnerabilidade a condições ambientais, tais como tempestades e contaminação da coluna de água. (Brümmer e Nickel 2003; Alcolado, Grovas-Hernández et al. 2004; Duckworth, Wolff et al. 2007; Taylor, Radax et al. 2007)

### **b) Cultivo da esponja em aquário**

O cultivo de esponjas *ex situ* consiste no transplante de esponjas do seu habitat natural para reservatórios fechados, com sistemas de circulação de água. Até agora não foram desenvolvidos métodos de cultivo em aquário de esponjas desde o seu estado larvar até ao seu estado adulto e tal não se adivinha próximo de conseguir. Embora este sistema permita o total controlo das condições de cultivo, muito poucas são as espécies cultivadas com sucesso através deste método. A grande maioria das esponjas não resiste mais que alguns meses neste tipo de sistema, pelo que não constitui alternativa para a manutenção a longo prazo destes animais.

São muitas as dificuldades inerentes a este método de cultura. Desde logo a alimentação do animal, que pode necessitar de suplementação específica com determinados elementos como sejam o ferro ou outros iões. Também o facto das esponjas serem filtradores altamente eficientes, requer tanques de elevadíssima capacidade e com potentes sistemas de recirculação de água. Requer também a optimização de uma série de parâmetros como a salinidade, a luminosidade, a temperatura, a corrente, etc. Para tal é indispensável um profundo conhecimento sobre as condições do seu habitat natural. (Brümmer e Nickel 2003; Sipkema, Osinga et al. 2005; Osinga e Kotterman 2007)

Devido às dificuldades de cultivo e aos exigentes requisitos tecnológicos que este método comporta, muito poucos são os trabalhos realizados nesta área e até agora este não é considerado um método sustentável para cultivar esponjas a longo prazo.

### c) **Primorfos**

Os primorfos são agregados multicelulares tridimensionais organizados, obtidos através da dissociação do tecido da esponja em água do mar sintética ou natural, nos quais a proliferação celular se mantém. As células dissociadas reagregam-se, na presença de antibióticos, originando agregados esféricos cobertos por uma camada epidérmica (Sipkema, Osinga et al. 2005). Até hoje, conseguiram obter-se primorfos de 25 espécies diferentes de esponjas, constituindo este o método mais promissor de cultivo (Valisano, Arillo et al. 2007).

Os primorfos resistem durante longos períodos de tempo, mantendo a proliferação celular e um normal metabolismo, podem conservar-se a 4°C durante alguns dias sem que a sua viabilidade fique comprometida e a sua criopreservação encontra-se actualmente a ser optimizada (Müller, Wiens et al. 1999).

Nas primeiras experiências de cultivo de primorfos, estes eram cultivados apenas em água do mar e antibióticos. O facto de estas células serem capazes de proliferar sem qualquer adição de nutrientes era surpreendente. Descobriu-se, mais tarde, que algumas das células morriam e os seus fragmentos eram fagocitados pelas células que sobreviviam. No entanto, a adição de alguns nutrientes ao meio de cultura, como silicato e ferro ou factores de crescimento, demonstrou estimular actividades metabólicas, como a espiculogénese, e o crescimento e diferenciação celular. Ao fim de algumas semanas de cultura, era possível observar-se o início de formação de canais no interior da massa primórfica (Müller, Wiens et al. 1999; Schröder, Brümmer et al. 2003).

Outra das vantagens deste método é a manutenção das relações simbióticas, uma vez que durante a reagregação celular, as células são capazes de reconhecer e distinguir entre o próprio e o não-próprio, voltando a associar-se espontaneamente com os seus simbiontes. Também a síntese dos metabolitos de interesse revelou ser mantida, embora a sua produção possa ser estimulada de modo a aumentar a sua rentabilidade. Existem estudos no sentido de se conseguir “espremer” os compostos bioactivos dos primorfos sem os danificar, de um modo semelhante a uma ordenha (Müller, Wiens et al. 1999; Sipkema, Osinga et al. 2005).

Os primorfos revelaram também constituir excelentes modelos para o estudo e compreensão dos mecanismos básicos de proliferação e morte celulares e também como bioindicadores (Müller, Wiens et al. 1999; Müller, Wiens et al. 2004).

#### **d) Cultura de células**

Até hoje não se conseguiu estabelecer uma única linha celular de invertebrados marinhos e, concretamente, de esponjas. Este facto parece ser contraditório, uma vez que as células de esponjas demonstraram ter elevada totipotencia (Rinkevich 2005).

Até agora, a produção de uma linha de células em suspensão ou aderentes em monocamadas revelou ser impraticável. As células entram num estado de dormência, perdendo a capacidade proliferativa, ou morrem por apoptose, não tendo sido conseguido manter uma linha celular durante mais que um mês (Müller, Wiens et al. 1999). Pensa-se que a interacção dos receptores das células com moléculas da matriz extracelular seja essencial para a sua proliferação (Müller, Wiens et al. 2004). Para além disso, pode ser necessário suplementar o meio com factores de crescimento específicos da esponja ou até mimetizar o ambiente do mesohilo da esponja, que é diferente do da coluna de água circundante (Sipkema, Osinga et al. 2005). Estas observações ressaltam o quão pouco ainda se sabe sobre as necessidades celulares dos invertebrados, a sua fisiologia e os seus parâmetros bioquímicos (Rinkevich 2005).

Para além disso, a cultura de células de esponja isoladas é incompatível com as potenciais associações simbióticas do animal. No caso de metabolitos que são produzidos exclusivamente em associação, esta estratégia não seria uma alternativa viável para a sua obtenção em grande escala (Taylor, Radax et al. 2007).

Estudos com vista à imortalização das células de esponja – através de agentes genotóxicos e/ou radiação - como forma de conseguir manter uma linha celular obtiveram resultados falhados, que podem ser explicados pela observação já anterior de que as esponjas possuem sistemas de reparação de DNA extremamente eficientes. A transfecção seria outra técnica de transformação com vista à imortalização celular, mas pouco se sabe sobre vírus em esponjas (Schröder, Brümmer et al. 2003).

De qualquer modo, ultrapassados os obstáculos que agora se impõem - que passará pelo desenvolvimento de meios e condições de cultura mais apropriados -, a

cultura de linhas celulares será, provavelmente, o meio mais rentável de produção de compostos bioactivos, devido à elevada taxa de crescimento e total controlo sobre as condições de cultura associados à cultura de linhas celulares em geral (Sipkema, Osinga et al. 2005).

#### **e) Cultura de microrganismos**

As técnicas de microbiologia clássica oferecem formas de isolamento e cultivo de microrganismos que são já conhecidas e estão bem estabelecidas. No entanto, apenas 10% (nos estudos mais optimistas) dos microrganismos associados às esponjas se revelaram cultiváveis (Hentschel, Fieseler et al. 2003; Wang 2006; Taylor, Radax et al. 2007). O cultivo, com sucesso, de microrganismos com vista à obtenção de produtos bioactivos passa pela optimização de meios e condições de cultivo e até à suplementação dos meios com extractos da esponja da qual eles provêm.

Como já foi referido no ponto 1.1.5.c), são vários os exemplos de compostos com interesse biotecnológico que se descobriram serem sintetizados por microrganismos associados às esponjas. Nestes casos, a estratégia mais eficiente será, de facto, conseguir cultivar os microrganismos em grandes fermentadores industriais, após a optimização dos parâmetros de fermentação.

O ‘screening’ de actividades biológicas de microrganismos em vários meios e condições de cultivo diferentes pode também constituir uma estratégia para a descoberta de novas potencialidades biotecnológicas que poderão, depois, ser desenvolvidas em grande escala.

#### **1.2.2. Métodos Independentes de Cultura**

Como já vimos no ponto anterior, os problemas associados ao cultivo quer da esponja quer dos microrganismos que lhe estão associados podem tornar esta tarefa extremamente tediosa e sem garantias de sucesso. A baixa percentagem de microrganismos cultiváveis, as especificidades das potenciais associações simbióticas, a síntese exclusiva de determinados compostos apenas quando esponja e microrganismos

estão em associação e os entraves inerentes ao cultivo da própria esponja – quer em sistema de maricultura, em aquário, em monocamadas celulares ou em aglomerados - podem até tornar o projecto inviável. Os métodos independentes de cultura, sempre que aplicáveis, poderão representar alternativas para a obtenção dos compostos bioactivos em estudo.

#### **a) Síntese Química e Biossíntese**

Muitas vezes a natureza serviu de inspiração aos químicos orgânicos na síntese de compostos que demonstraram possuir actividades extremamente interessantes do ponto de vista biomédico e/ou biotecnológico. São vários os compostos isolados inicialmente em esponjas que já foram sintetizados, total ou parcialmente, com sucesso (Taylor, Radax et al. 2007). No entanto, em alguns casos, as moléculas possuem estruturas tão intrincadas que a sua síntese não é possível ou envolve tantos passos de síntese com rendimentos tão baixos que a sua aplicação à escala industrial não é economicamente favorável.

A biossíntese utiliza vias metabólicas bem conhecidas e estudadas ou apenas reacções enzimáticas isoladas como forma de obter um determinado composto de interesse a partir de um metabolito primário. Esta biossíntese pode ocorrer *in vivo* ou *in vitro* e pressupõe um profundo conhecimento das reacções metabólicas envolvidas, a nível de metabolitos primários, cofactores, produtos secundários e regulação bioquímica. Poderá ser uma alternativa quando o produto bioactivo é demasiado complexo ou demasiado grande para a síntese química pura ou até quando a síntese seja possível mas a biossíntese seja de mais fácil aplicação à escala industrial ou economicamente mais viável. Podem também adoptar-se sistemas híbridos de síntese que englobem síntese química e biossíntese em passos reaccionais diferentes.



## **b) Metagenómica**

A metagenómica consiste no estudo de fragmentos do genoma de complexas comunidades microbianas e a repescagem de genes de vias metabólicas inteiras de organismos não cultiváveis que possam ser clonadas e expressas em vectores apropriados, cuja fermentação à escala industrial, possibilite a obtenção de compostos bioactivos. O maior entrave à aplicação desta estratégia está premente em vias metabólicas cujos genes não estão no mesmo ‘cluster’. Outros potenciais problemas incluem o uso de vectores de expressão inapropriados e a impossibilidade de conseguir clonar com sucesso ‘clusters’ de genes muito grandes. Para além disso, se o organismo produtor do composto de interesse estiver em minoria em relação a outros, o seu genoma pode ser camuflado por organismos existentes em maior quantidade. Alguns destes problemas poderão ser ultrapassados incluindo um passo anterior de separação celular (por citometria de fluxo, por exemplo) ou aplicando estudos de metagenómica às larvas da esponja em vez de utilizar o indivíduo adulto, implicando este último, obviamente, uma maior complexidade (Taylor, Radax et al. 2007).

Embora a área da metagenómica esteja ainda na sua infância, ela representa para a biotecnologia um enorme potencial dada a sua capacidade de estudo de enormes comunidades microbianas com relativa rapidez e elevada eficiência. Ela promete também um conhecimento mais profundo das relações complexas que os ecossistemas marinhos já provaram possuir.

Neste sub-capítulo dedicado à biotecnologia marinha vimos várias estratégias que podem ser aplicadas para a produção em grande escala de compostos naturais com interesse biomédico e/ou biotecnológico, que podem ser resumidas na seguinte figura:

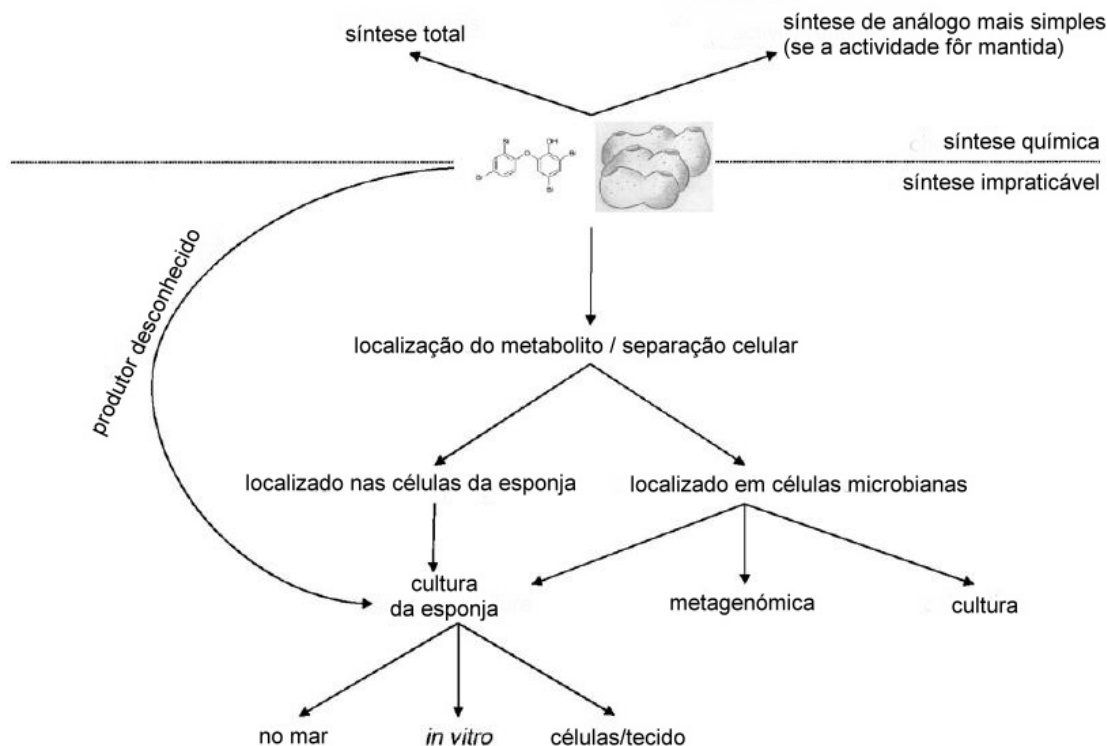


Figura 1.7 – Resumo da estratégia global para a obtenção em grande escala de metabolitos de esponjas marinhas (adaptado de (Taylor, Radax et al. 2007))

De facto, embora as esponjas sejam o grupo de organismos marinhos produtores de compostos com maior potencial de aplicação na industria farmacêutica e biotecnológica, o problema da obtenção desses produtos à escala industrial está ainda por resolver e, até agora, este tem sido o maior entrave à sua comercialização.

As esponjas são ricas em compostos com uma panóplia de actividades de aplicação biomédica; outros são inibidores de ‘quorum-sensing’ de bactérias produtoras de biofilmes, podendo ser utilizados em tintas, como compostos anti-‘fouling’, e em produtos de higiene oral, para impedir a formação de cáries dentárias; as espículas siliciosas das esponjas revelaram possuir propriedades ópticas incomparáveis em relação a outros materiais, aliadas a uma grande estabilidade estrutural, bem como uma vasta aplicabilidade nanobiotecnológica no campo dos biomateriais (Ehrlich e Worch 2007; Schröder, Krasko et al. 2007).

As esponjas inspiram e inspirarão muitos cientistas nas mais diferentes áreas, com vista à obtenção de fármacos que combatam epidemias, de compostos que resolvam problemas tecnológicos e no desenvolvimento de novos materiais. Contudo, ainda muitos obstáculos se impõem; uma maior cooperação entre microbiologistas, químicos, geneticistas, zoólogos, engenheiros e especialistas de aquacultura é essencial para o desenvolvimento desta área tão promissora que é a biotecnologia marinha e, concretamente, em esponjas.



## **2. *ERYLUS DISCOPHORUS* E INIBIÇÃO DO VIH-1**

---



## **2. *ERYLUS DISCOPHORUS* E INIBIÇÃO DO VIH-1**

Este capítulo fundamenta-se no trabalho realizado entre 2004 e 2006, com o objectivo de isolar e caracterizar a(s) molécula(s) responsável(is) pela actividade de inibição do Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 1 (VIH-1) que extractos brutos da esponja pertencente à espécie *Erylus discophorus* demonstraram, em trabalhos anteriores (Pina 2000), possuir consistentemente em todos os espécimens analisados.

Este capítulo subdivide-se em Considerações Introdutórias, Parte Experimental e Notas Conclusivas. Na primeira parte, pretende-se dar uma visão geral do conhecimento actual sobre SIDA (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) e VIH (ou HIV, do inglês ‘Human Immunodeficiency Virus’), sobre os produtos naturais conhecidos com aplicação nesta área e, por fim, explicar brevemente as características gerais da esponja em estudo. Na Parte Experimental apresentam-se os materiais e métodos aplicados, os resultados obtidos e a discussão destes no âmbito da biotecnologia marinha, focando aspectos de ciência básica como também a sua potencial aplicação biomédica.

### **2.1. CONSIDERAÇÕES INTRODUTÓRIAS DO CAPÍTULO 2**

#### **2.1.1. SIDA e VIH**

Actualmente, cerca de 33 milhões de pessoas estão infectadas com o VIH e, desde 1990, já se perderam cerca de 24 milhões de vidas devido a esta infecção (UNAIDS 2007), o que corresponde a cerca de duas vezes e meia a actual população portuguesa. A SIDA – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida – é uma epidemia à escala mundial; afecta todos os cidadãos, de todas as idades, de todos os países, de todos os continentes, do mundo inteiro.

## Estimativa de adultos e crianças a viver com VIH, 2007

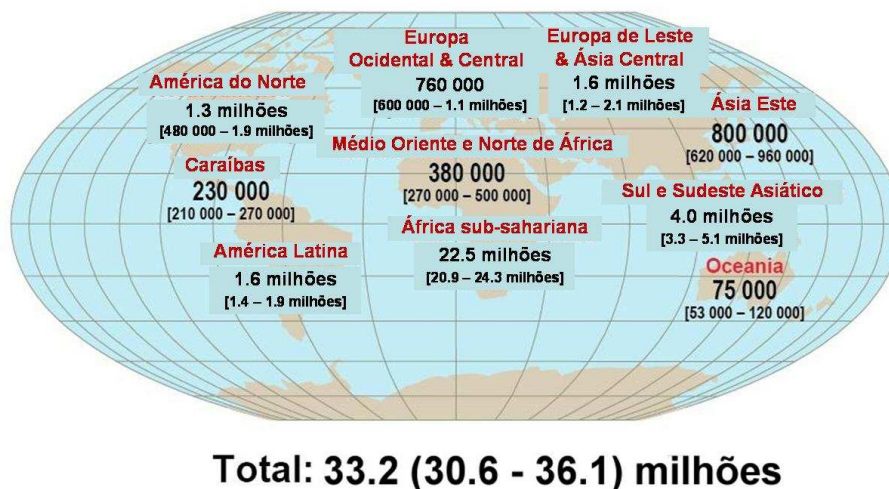


Figura 2.1 – Distribuição geográfica de pessoas infectadas por VIH (adaptado de (UNAIDS 2007))

Por dia, mais de 6800 pessoas são infectadas e 5700 morrem (UNAIDS 2007), ou seja, a cada 12 segundos há uma nova infecção e a cada 15 segundos perde-se mais uma vida. Estes são os números chocantes desta batalha que se tem vindo a travar contra uma das mais graves pandemias do século XX, que promete arrastar-se durante longos anos no século XXI.

A África Sub-Sahariana compreende cerca de 70% dos infectados, facto que se prende com uma série de factores sócio-económicos como carências nos cuidados básicos de saúde, falta de acesso a medicamentos e métodos de profilaxia (como o preservativo), relações sexuais desprotegidas e transmissão vertical (da mãe para o feto).

Na América do Norte e Europa Ocidental e Central, o número de infectados tem vindo a aumentar. Pensa-se que seja devido, principalmente, ao aumento da esperança de vida proporcionado pelos tratamentos anti-retrovirais mas também a relações sexuais desprotegidas. Na Europa, o sexo heterossexual foi a maior causa das novas infecções, tendo diminuído a incidência entre homens homossexuais e utilizadores de drogas injectáveis. Estes factos deitam por terra os preconceitos de que a infecção por VIH e a SIDA estão exclusivamente associados à homossexualidade e à toxicoddependência. Em todo o mundo, cerca de metade das novas infecções são em mulheres, o que é especialmente preocupante devido à transmissão vertical do vírus.



A vitória nesta batalha contra o VIH depende de uma consciencialização global, a nível social, político, económico e científico; passa por uma mudança de comportamentos – protelar o início da vida sexual, diminuir o número de parceiros sexuais e uma utilização mais consistente do preservativo -, acesso global a tratamentos anti-retrovirais especialmente às populações mais carenciadas, campanhas generalizadas de informação e o financiamento sério e sustentado para a pesquisa e descoberta de novos compostos bioactivos cujas actividades sejam mais potentes que as dos fármacos já existentes no mercado ou que explorem vias alternativas para a inibição do vírus, no sentido da progressão para a obtenção de uma cura definitiva e/ou uma vacina contra o VIH.

a) A Descoberta do VIH

O primeiro caso documentado de infecção por VIH-1 terá ocorrido em 1959 na África Central (Zhu, Korber et al. 1998; Cock 2001). Obviamente, na altura a doença não era conhecida mas os seus órgãos terão sido conservados e, mais tarde, analisados, comprovando a infecção por VIH-1. Em Junho de 1981, vários médicos em Nova Iorque e na Califórnia, reportavam o aparecimento de várias doenças involuntárias concomitantes em homossexuais anteriormente saudáveis (Fauci 2008). A doença foi identificada como uma desordem do foro imunitário caracterizada por um declínio da função imune e do número de células T CD4 (Gallo 2006). Em 1982, Robert Gallo especula que este novo síndrome, denominado SIDA, era provocado por um retrovírus (Gallo 2006). Em 1983, Luc Montagnier, um investigador francês que desenvolvia as suas actividades de investigação em Paris, e Robert Gallo, nos Estados Unidos, publicam, na revista ‘Science’, os primeiros artigos científicos que fornecem evidências concretas de que o agente causador da SIDA é, de facto, um retrovírus (Barre-Sinoussi, Chermann et al. 1983; Gallo, Sarin et al. 1983; Fauci 2008). A relação causal entre VIH e SIDA foi aceite pela comunidade médica e científica em 1984 (Gallo e Montagnier 2003). Em 1985, fruto de uma cooperação luso-francesa, foi detectada e caracterizada uma nova estirpe de VIH, o VIH-2, oriunda da Costa Ocidental Africana (Pereira e Tavares 2002).

A 6 de Outubro de 2008, Françoise Barré-Sinoussi e Luc Montagnier foram laureados com o prémio Nobel da Medicina pelo seu trabalho realizado no âmbito da descoberta do Vírus da Imunodeficiência Humana VIH-1 (Nobelprize.org 2008).

b) Origem do VIH

Até hoje não se sabe concretamente a origem do VIH. A hipótese mais aceite dentro da comunidade científica é a de que o vírus terá entrado em contacto com humanos através de transferência inter-espécies, que terá acontecido naturalmente como consequência da exposição humana a sangue ou secreções de outros primatas (Cock 2001; McCutchan 2006). No entanto, existem algumas referências a uma hipótese alternativa e mais específica. Esta teoria afirma que, no final dos anos 50, em África, as preparações para a obtenção da vacina oral contra a poliomielite eram feitas em culturas de tecidos de primatas que se encontravam contaminadas com dois tipos de Vírus da Imunodeficiência em Símios (ou SIV, do inglês ‘Simian Immunodeficiency Virus’), originando vacinas que estariam, elas próprias, contaminadas. Estas vacinas foram distribuídas e administradas a centenas de milhares de pessoas em diferentes partes da África e assim se estabeleceram as infecções humanas por VIH-1 e VIH-2 que, mais tarde, levariam à pandemia actual da SIDA (Cock 2001).

c) Modos de infecção

A infecção por VIH dá-se essencialmente por contacto com sangue ou os seus subprodutos e com secreções sexuais. As principais vias de infecção são relações sexuais desprotegidas, transmissão vertical, reutilização dos utensílios usados no consumo de drogas injectáveis (seringas e agulhas) e transfusões sanguíneas (embora nos países desenvolvidos esta via de infecção seja actualmente desprezável).

A via sexual é o modo principal de infecção em todo o mundo, através da transmissão de linfócitos infectados ou de vírus livres existentes no esperma ou nas secreções vaginais.

O contacto com sangue infectado por partilha de agulhas ou seringas contaminadas constitui uma das situações de risco entre a comunidade toxicodépendente. Antes de o vírus ter sido identificado, algumas pessoas foram acidentalmente contaminadas através de transfusões sanguíneas ou da administração de sub-produtos contaminados. Actualmente, nos países desenvolvidos, a esterilização e a escolha criteriosa dos dadores de sangue permitiram a eliminação deste risco.

A transmissão do VIH da mãe infectada para o seu filho ocorre em cerca de 20% dos casos. Não se conhece bem o modo de infecção mas três hipóteses são propostas: transmissão intra-uterina, transmissão parturiana (que ocorre durante o parto) e transmissão durante a amamentação. Para reduzir o risco de contaminação da criança, é comum adoptarem-se medidas como a administração de terapia anti-retroviral à mãe durante a gravidez, parto por cesariana e amamentação artificial. Os casos de infecção de bebés são extremamente graves e rápidos, sendo o período de incubação do vírus, nestes casos, de apenas 2 anos (Dimmock, Easton et al. 2001).

#### d) Da Infecção por VIH até à SIDA

A infecção por VIH não significa que automaticamente o indivíduo sofre de SIDA. A evolução da infecção passa por 4 fases principais: fase aguda ou infecção primária, fase assintomática ou de latência clínica, fase sintomática precoce ou pré-SIDA e, finalmente, fase sintomática ou fase de SIDA. No entanto, desde o momento da infecção primária, o infectado torna-se susceptível de infectar outros indivíduos.

A infecção primária é, geralmente, assintomática ou com sintomas ligeiros semelhantes aos de uma pequena constipação. Esta fase é acompanhada por uma elevada carga viral e uma rápida depleção das células T CD4<sup>+</sup>. No entanto, o organismo recupera rapidamente devido à supressão da virémia efectuada pela resposta imunitária das células T CD8<sup>+</sup>. Nesta altura, ocorre também a seroconversão, com o aparecimento de anticorpos específicos contra a proteína p24 da cápside do VIH. Estes anticorpos mantêm-se ao longo de todo o decurso da infecção mas não possuem eficácia neutralizante.

A fase de latência acontece imediatamente a seguir à fase de infecção primária, com a recuperação dos níveis de células T CD4<sup>+</sup> até níveis considerados normais e um declínio na carga viral circulante. Durante esta fase não há sintomas clínicos ou são muito ligeiros, como uma linfadenopatia generalizada e estabelecem-se reservatórios virais nos tecidos linfóides. A duração desta fase depende de vários factores como o estado nutricional do doente, o seu estado de saúde antes da infecção e a carga viral inicial de infecção. O tempo médio de duração da fase de latência é cerca de 10 anos. Parece existir um equilíbrio entre os factores que induzem a replicação do vírus e factores que a suprimem. Os medicamentos existentes actualmente e as estratégias farmacológicas de administração conjunta de mais do que um medicamento antiretroviral (designada por HAART – ‘Highly Active Anti-Retroviral Therapy’), acessíveis nos países desenvolvidos e que funcionam no sentido de manter a carga viral sob controlo e a níveis tão baixos quanto possível, conseguiram prolongar a fase de latência até 20 ou 30 anos, tornando possível encarar a infecção por VIH quase como uma doença crónica.

Na fase pré-SIDA, começa a haver uma deterioração do tecido linfático com consequente libertação de viriões na corrente sanguínea. A concentração de células T CD4<sup>+</sup> vai gradualmente diminuindo e começam a aparecer os primeiros sintomas e infecções oportunistas. Febre, diarreias persistentes, perda de peso são os sintomas mais comuns.

O critério para a identificação da fase de SIDA é uma contagem de células T CD4<sup>+</sup> inferior a 200 células/ $\mu$ L. Nesta fase o sistema imunitário está seriamente e irreversivelmente comprometido, com o consequente aparecimento de outras infecções graves (como tuberculose, pneumonia), perda de peso e neoplasia. A morte dos infectados por VIH dá-se, não devido ao VIH mas devido a infecções e/ou doenças neoplásicas entretanto estabelecidas durante a fase de SIDA, como consequência da debilitação generalizada do sistema imunitário do paciente.

### 2.1.1.1. Características Gerais e Ciclo de Infecção do VIH

O Vírus da Imunodeficiência Humana – VIH – é um retrovírus do género lentivírus (família *Retroviridae*, género *Lentivirus*). Os retrovírus são vírus cuja informação genética está codificada sob a forma de RNA (do inglês ‘RiboNucleic Acid’) – e são capazes de realizar transcrição reversa. Os lentivírus possuem a capacidade de originar doenças de evolução crónica com longos períodos de incubação, virémia persistente, instabilidade genética – com aparecimento de múltiplas estirpes variantes resultantes de mutação genética – bem como uma resposta imunitária caracterizada por ausência ou inoperacionalidade de anticorpos neutralizantes da infecciosidade do vírus (Pereira e Tavares 2002).

#### a) Estrutura Geral do VIH-1

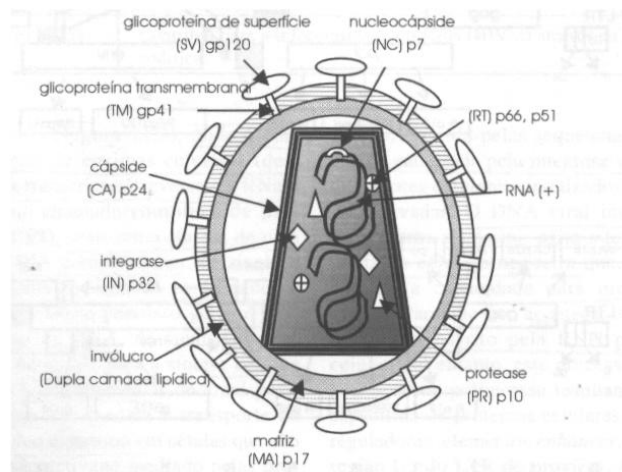


Figura 2.2 – Estrutura geral do VIH-1 (Pereira e Tavares 2002)

A superfície do viriã está envolvida por um invólucro de natureza lipídica onde se inserem as glicoproteínas que mediam o processo de fusão do invólucro viral com a membrana citoplasmática da célula hospedeira: a **gp120**, glicoproteína de superfície que é sustentada pela glicoproteína transmembranar **gp41**. A face interna do invólucro viral é revestida pela proteína de matriz **p17**, que é vital para a integridade do viriã e parece estar envolvida na incorporação das glicoproteínas nas partículas maduras. A cápside é constituída pela proteína **p24** e, no seu interior, encontram-se duas cópias idênticas de

RNA genómico, a transcriptase reversa, a integrase, a protease e as proteínas reguladoras Vpr e Vif (Pereira e Tavares 2002).

b) Organização Genómica

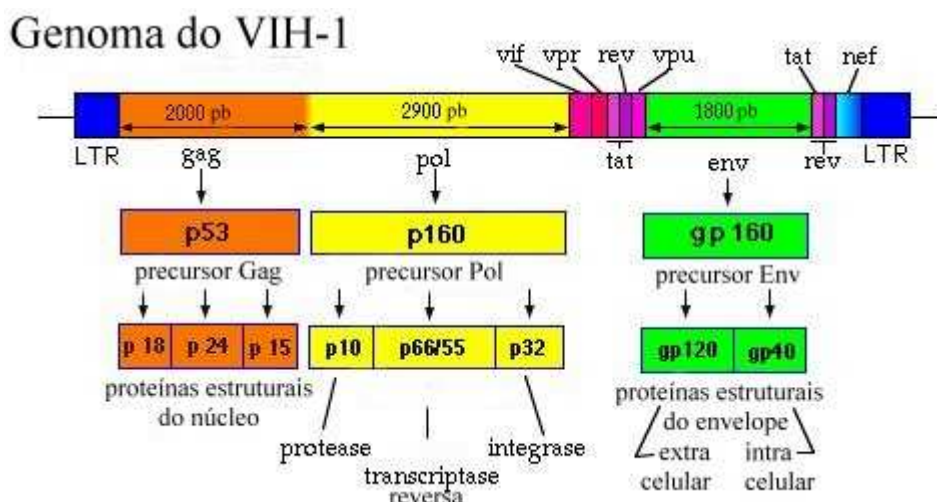


Figura 2.3 – Organização genómica do VIH-1

(adaptado de <<http://www.yale.edu/bio243/HIV/genome.html>>)

O VIH partilha, com os outros retrovírus, o mesmo tipo de organização genómica caracterizada pela ordem 5'-gag-pol-env-3', flanqueada pelas sequências LTR – ‘Long Terminal Repeats’. Para além destes, o VIH possui ainda 6 genes acessórios – *vif*, *vpr*, *rev*, *vpu*, *tat* e *nef* – que codificam as respectivas proteínas cuja função é de regulação durante o processo de replicação do vírus (Dimmock, Easton et al. 2001). Ao todo, o seu genoma possui cerca de 10 kb.

O VIH-2 apresenta apenas 50% de homologia genómica com o VIH-1. A sua organização genética é um pouco diferente da do VIH-1 e não possui o gene *vpu*, estando este substituído pelo gene *vpx* cuja proteína para a qual codifica contribui para a infecciosidade do vírus. A gravidade da infeção por esta estirpe é geralmente inferior à do VIH-1 e o período de latência que antecede a progressão para SIDA é geralmente mais longo (Pereira e Tavares 2002).

O VIH-1 subdivide-se em 3 grupos: M, O e N. Pensa-se que cada um destes grupos tenha provindo de um novo foco de transmissão inter-espécies. O VIH-1 grupo M é o mais disseminado e causador da maior parte das infeções; os grupos O e N são

muito raros e estão essencialmente limitados à África Central. No indivíduo infectado, o VIH possui uma grande variedade de genomas virais aparentados mas diferentes, denominados “quasispécies”, que são o resultado da elevada taxa de mutação do vírus (McCutchan 2006).

Um outro sistema de classificação distingue as estirpes virais de acordo com o tipo de co-receptor que este utiliza durante a etapa de fusão. As estirpes de VIH-1 que são vulgarmente responsáveis pela transmissão e predominam durante a fase assintomática estão geralmente restritas à utilização do co-receptor CCR5 e designam-se por estirpes R5. No decurso da infecção, começam a surgir estirpes “promíscuas” que, embora mantendo a capacidade de utilizar o co-receptor CCR5, utilizam também o co-receptor CXCR4 ou outros co-receptores menores como CCR2b, CCR3, CCR8, CX<sub>3</sub>CR1, CXCR6, D6 e RDC1. Às variantes capazes de utilizar ambos os co-receptores dá-se o nome de variantes R5X4. Na fase terminal da doença, estas estirpes promíscuas tendem a desaparecer, sendo substituídas por variantes que utilizam exclusivamente o receptor CXCR4, designando-se por variantes X4 puras. Esta elevada variabilidade fenotípica do VIH-1 é devida à elevada taxa de mutação exibida pela VIH que se prende com o facto da sua transcriptase não possuir um sistema de reparação de DNA e também com a grande capacidade de replicação do vírus (Lusso 2006).

c) Ciclo de Replicação (Dimmock, Easton et al. 2001; Pereira e Tavares 2002; Tözser 2003; Simon, Ho et al. 2006)

O VIH infecta principalmente as células do sistema imunitário do hospedeiro que expressam, à sua superfície, o receptor CD4 – células CD4<sup>+</sup> - como linfócitos T e macrófagos. No entanto, o VIH demonstrou ser capaz de utilizar células CD4<sup>-</sup> - como células dendríticas e de Langerhans, existentes nas mucosas - utilizando, para tal, outros receptores à superfície da célula. Pensa-se que o VIH se liga à superfície destas células mas não entra na célula nem a infecta. A célula dendrítica migra para os nódulos linfáticos onde o vírus é então transferido para células T CD4<sup>+</sup> (activadas ou não), infectando-as.

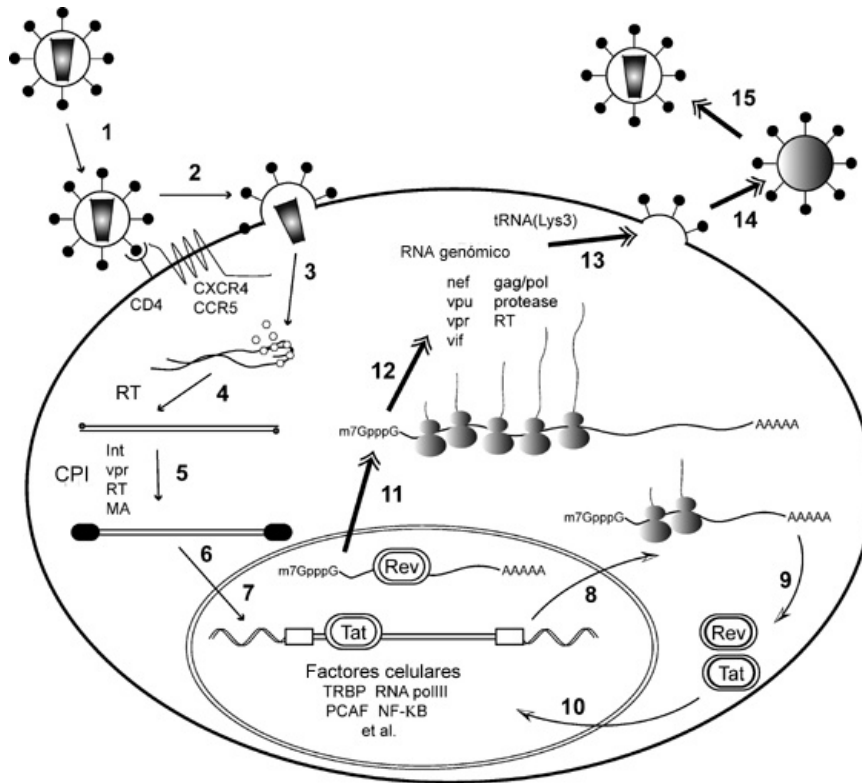


Figura 2.4 – Ciclo de replicação do VIH. Setas pequenas – fase inicial, da entrada do vírus à integração; Setas curvas – replicação inicial; Setas duplas – fase tardia. (1) Adsorção ao receptor CD4 e ao co-receptor CCR5 ou CXCR4. (2) Fusão. (3) Exposição do dímero genómico de RNA viral. (4) Transcrição Reversa (RT – transcriptase reversa). (5) Formação do Complexo Pré-Integração (CPI ou PIC do inglês ‘pre-integration complex’). (6) Entrada do CPI no núcleo. (7) Integração do DNA proviral no genoma da célula hospedeira. (8) Transcrição inicial de mRNA processado. (9) Tradução das proteínas reguladoras Tat e Rev. (10) Entrada no núcleo da Tat e Rev. A Tat induz a transcrição dos mRNAs virais. (11) A Rev media a exportação de mRNAs virais com e sem ‘splicing’. (12) Tradução das proteínas estruturais virais. (13) Junção do RNA genómico viral, proteínas e factores celulares junto à membrana plasmática. (14) Gemulação ou ‘Budding’ viral. (15) Maturação viral. RNA polIII, TRBP, NF-kB e PCAF são factores celulares envolvidos na transcrição do vírus (adaptado de (Scherer, Rossi et al. 2007)).

O ciclo de replicação do VIH é constituído por duas fases – fase inicial e fase tardia - e 6 etapas fundamentais: fusão, transcrição reversa, integração, síntese de novas partículas virais, gemulação e maturação. A fase inicial engloba a fusão do vírus com a célula hospedeira, evento que marca o início da infecção, a transcrição reversa das cadeias de RNA virais em DNA e a integração destas no genoma da célula. Após a activação da célula, inicia-se a fase tardia do ciclo de replicação do VIH que engloba as etapas de síntese de novas partículas virais, gemulação e maturação dos novos viriões.



O primeiro passo na replicação do VIH em células T CD4<sup>+</sup> é a ligação do vírus à membrana da célula. A ligação da gp120 ao receptor CD4 conduz a alterações conformacionais que levam à exposição do local de ligação ao co-receptor CCR5 ou CXCR4 (Fig. 2.4 passo 1). Estes são receptores expressos constitucionalmente à superfície da célula, utilizados normalmente como receptores de quimiocinas, da família das proteínas G com sete domínios transmembranares. Após a ligação da gp120 ao receptor e co-receptor, a zona hidrófoba N-terminal da proteína gp41, denominada péptido de fusão, interage com a membrana citoplasmática, destabilizando a sua estrutura. A membrana do vírus funde-se com a membrana citoplasmática e o conteúdo viral é libertado no citoplasma da célula hospedeira. Assim se dá a primeira etapa de infecção – a fusão (Fig. 2.4 passo 2).

Já no citoplasma da célula, a cápside viral é degradada por enzimas celulares, num processo conhecido por descapsidação. A transcriptase reversa viral possui três actividades enzimáticas distintas: actividade de polimerase de DNA dependente de RNA, que sintetiza uma cadeia linear de DNA tendo por molde uma das cadeias de RNA viral; actividade de ribonuclease H, que degrada as cadeias de RNA depois de serem transcritas; e actividade de polimerase de DNA dependente de DNA, que sintetiza uma segunda cadeia de DNA complementar à primeira. É assim sintetizada uma cadeia dupla de DNA (Fig. 2.4 passo 4) que, em conjunto com a integrase, a transcriptase reversa, a proteína Vpr e a proteína da nucleocápside (NC), forma o Complexo de Pré-Integração - CPI ou PIC (Fig. 2.4 passo 5). O transporte do CPI para o núcleo (Fig. 2.4 passo 6) dá-se mesmo em células não activadas, devido à sua capacidade intrínseca de transporte nuclear, fornecida pelas proteínas Vpr e NC.

Uma vez no núcleo, o DNA proviral é integrado no genoma da célula hospedeira numa reacção catalizada pela Integrase (fig. 2.4 passo 7). Pensa-se que a integração ocorre num local aleatório da cadeia de DNA da célula hospedeira embora se tenha observado a existência de alguns ‘hot spots’. No primeiro passo da integração são removidos dois nucleótidos de cada um dos terminais 3’ do DNA viral. No passo seguinte, há a clivagem do DNA da célula hospedeira, mediada pela integrase e o DNA viral é ligado ao DNA hospedeiro através dos grupos 3’-hidroxilo formados anteriormente, numa reacção designada por transferência de cadeia. O DNA viral passa,

a partir deste momento, a fazer parte do genoma da célula hospedeira, marcando, a etapa de integração, o ponto de não retorno da transformação irreversível da célula numa potencial “fábrica” de novos vírus. Termina assim a fase inicial do ciclo de replicação do VIH, que permanece “adormecido” até que a célula hospedeira seja estimulada.

Sob activação da célula T CD4<sup>+</sup> infectada, através da sua estimulação com o seu respectivo antigénio, inicia-se a fase tardia da replicação do VIH. O vírus utiliza factores celulares resultantes da activação do linfócito para a sua própria transcrição. Os primeiros mRNAs a serem traduzidos pelos ribossomas no citoplasma (Fig. 2.4 passo 8) possuem apenas 2 kb (após terem sido processados por ‘splicing’) e codificam a síntese das proteínas reguladoras acessórias Tat, Rev e Nef (Fig. 2.4 passo 9). A proteína Tat, depois de sintetizada, volta a entrar no núcleo (Fig. 2.4 passo 10) onde actua como activadora da transcrição do provírus, aumentando a actividade do enzima celular RNA polimerase II. A proteína Rev inibe a clivagem do RNA viral resultando na produção de dois novos tipos de RNAs: um com 4,5 kb e outro com 9 kb. O RNA mais pequeno codifica para as proteínas Vif, Vpr e Vpu e para as glicoproteínas do invólucro viral. O RNA de 9 kb contém a informação para a síntese da protease, integrase, transcriptase reversa, proteínas da cápside, nucleocápside e da matriz do virião. A proteína Rev participa, também, no transporte destes RNAs de maiores dimensões do núcleo para o citoplasma da célula (Fig.2.4 passo 11) onde uns serão posteriormente traduzidos (Fig. 2.4 passo 12) e outros constituirão o genoma viral.

A poliproteína transmembranar Env é o produto da tradução do gene *env*, tem cerca de 160 kDa e agrega-se naturalmente em trímeros que são glicosilados no retículo endoplasmático. No aparelho de Golgi, a gp160 é cindida por uma protease celular em duas proteínas: a gp120 e a gp41. Trímeros de gp120/41 são de seguida levados, em vesículas, para a membrana citoplasmática da célula.

Na fase final da replicação viral, as poliproteínas Gag e Gag-Pol reúnem-se às proteínas do envelope viral e a duas cadeias de RNA viral junto ao folheto interno da membrana celular (Fig. 2.4 passo 13). Este conjunto envolve-se numa porção da membrana citoplasmática, formando uma gema que se desprende da célula hospedeira formando uma partícula viral imatura (Fig. 2.4 passo 14).

Na última etapa de replicação do vírus, a maturação (Fig. 2.4 passo 15), a protease viral cliva as poliproteínas virais que sofrem uma série de rearranjos intramoleculares dando origem a um novo virião pronto a infectar novas células. Apenas o virião maduro obtido após os eventos proteolíticos é infeccioso e, portanto, a função da protease viral é crítica para a replicação do vírus.

### **2.1.1.2. Alvos Terapêuticos**

Teoricamente, todos os passos da replicação do VIH serão potenciais alvos para fármacos capazes de inibir a replicação do vírus. No entanto, os medicamentos actualmente existentes no mercado são de quatro tipos: inibidores da fusão, inibidores da transcriptase reversa – que se subdividem em análogos de nucleósidos e não-nucleosídicos – inibidores da integrase e inibidores da protease (Simon, Ho et al. 2006).

Os inibidores da fusão são moléculas que impedem a infecção das células-alvo bloqueando a adsorção e entrada do vírus na célula. Estes compostos podem ligar-se a receptores da célula ou a moléculas existentes à superfície do próprio vírus. O enfuvirtide ou T-20, um péptido sintético comercializado sob o nome de Fuzeon, foi o primeiro fármaco desta categoria aprovado pela ‘Food and Drug Administration’ (FDA) para o tratamento da infecção por VIH. Esta molécula liga-se à gp41 existente no envelope viral, impedindo o processo de fusão antes da célula ser infectada (Simon, Ho et al. 2006). Outros compostos aniónicos – como polisulfatos, polisulfonatos, polifosfatos, polifosfonatos, poliósidos aniónicos - demonstraram serem capazes de bloquear a adsorção da gp120 à membrana da célula (Schols, Pauwels et al. 1990) interagindo com a região catiónica V3 desta glicoproteína, que se pensa ser a região responsável pelos eventos iniciais de adsorção do vírus à célula. Embora estes polianióes possuam uma actividade antiviral de largo espectro e uma baixa indução de resistência do vírus, as suas propriedades farmacológicas pouco específicas resultam numa fraca actividade anti-VIH *in vivo* (Tözsér 2003). No entanto, eles poderão constituir alternativas de uso terapêutico em combinação com outros agentes antivirais ou serem usados em géis de aplicação vaginal que constituam uma barreira primária de

controlo da infecção. Outras moléculas estão a ser desenhadas no sentido de bloquearem o co-receptor utilizado pelo VIH, baseados na descoberta de que, uma mutação existente naturalmente em alguns indivíduos no gene que codifica para o co-receptor CCR5, lhes confere uma imunidade total (no caso de homocigóticos) ou parcial (no caso de heterocigóticos) contra o VIH (Lusso 2006). O MVC ou Maraviroc e o SCH D ou Vicriviroc são exemplos de inibidores do CCR5 (Simon, Ho et al. 2006); o primeiro foi aprovado pela FDA em Agosto de 2007 e o segundo encontra-se actualmente em fase III de ensaios clínicos (Body.Health.Resources.Corporation 2008).

Os inibidores da transcriptase reversa podem ser de dois tipos. Os inibidores análogos de nucleósidos, ao serem incorporados pela transcriptase reversa na cadeia de DNA nascente, interrompem a reacção de polimerização. Isto deve-se ao facto destas moléculas serem desprovidas do radical hidroxilo na posição 3' do núcleo ribose, o que impede que se dê a ligação difosfato com o nucleótido seguinte, formando uma cadeia de DNA truncada (Pereira e Tavares 2002). Existem sete compostos desta categoria já utilizados no tratamento da infecção por VIH: Abacavir, Didanosine, Zidovudine (AZT), Emtricitabine, Lamivudine, Stavudine, Zalcitabine e ainda o análogo de nucleótido Tenofovir (Simon, Ho et al. 2006). Os inibidores da transcriptase reversa não nucleosídicos são moléculas que interagem directamente com o enzima, ligando-se a um centro alostérico diferente do centro activo, inibindo a sua actividade (Tözsér 2003). Fazem parte desta categoria os fármacos Delaviridine, Efavirenz e Nevirapine (Simon, Ho et al. 2006).

Outro potencial alvo terapêutico durante a transcrição reversa e a formação do CPI é a proteína da nucleocápside NC. Esta proteína está envolvida em várias etapas da replicação do vírus, activando a reacção de transferência de cadeia e a concatenação das novas partículas virais na fase final da replicação do vírus. O composto NOBA (3-nitrosobenzamida) e seus derivados demonstraram serem capazes de bloquear a acção desta proteína, constituindo mais uma alternativa ainda em estudo para a obtenção de novos fármacos anti-VIH (Tözsér 2003).

Foi aprovada recentemente a utilização de inibidores da integrase viral para o tratamento de pacientes seropositivos. O composto Raltegravir, aprovado pela FDA no final de 2007, actua inibindo a reacção de transferência de cadeia catalizada pela

integrase viral. O composto Elvitegravir é outro inibidor da integrase e encontra-se actualmente na fase III dos ensaios clínicos (Body.Health.Resources.Corporation 2008).

Os inibidores da protease viral são peptidomiméticos, inibindo a actividade deste enzima por competição com o substrato na ligação ao centro activo. A característica comum a estes compostos inibidores é a presença de um resíduo fenil a meio da molécula (Tözsér 2003). Os compostos (Fos)-Amprenavir, Atazanavir, Darunavir, Indinavir, Nelfinavir, Ritonavir, Saquinavir, Tripanavir e Lopinavir são exemplos de fármacos utilizados correntemente no tratamento do VIH que pertencem à categoria dos inibidores de protease (Simon, Ho et al. 2006).

Com o decorrer do tratamento, o vírus vai adquirindo resistência aos fármacos devido à sua elevada taxa de mutação, mutações essas que lhe vão conferindo características que lhe permitem ultrapassar a acção dos compostos utilizados na terapêutica anti-VIH. Algumas destas mutações levam, por exemplo, à modificação do centro alostérico da transcriptase reversa de modo que o inibidor já não se consiga ligar; o mesmo acontece na aquisição de resistência aos inibidores da protease, em que mutações levam à modificação do centro activo do enzima. Também os efeitos secundários associados à elevada toxicidade de alguns destes compostos – doenças cardiovasculares, deslipidémia, hepatotoxicidade, toxicidade renal, diabetes -, que levam à redução da qualidade de vida do seropositivo, constituem alguns dos insucessos dos medicamentos existentes actualmente. Mais ainda, os elevados custos dos medicamentos são também uma desvantagem, especialmente na aplicação destas terapêuticas em países sub-desenvolvidos. Por isso, é essencial a pesquisa e desenvolvimento de novos compostos com acção anti-retroviral que constituam alternativas aos fármacos já existentes, que possuam actividades mais potentes, que tenham menos efeitos secundários, que atinjam alvos diferentes nas várias etapas de replicação do vírus e que sejam economicamente mais acessíveis. Mais ainda, necessita-se urgentemente de compostos que, mais do que retardarem a doença, consigam curá-la definitivamente.

### **2.1.2. Produtos Anti-VIH de origem marinha**

Os trabalhos pioneiros de Bergmann durante a década de 50, na área de produtos naturais marinhos, resultaram na descoberta de moléculas análogas aos nucleósidos existentes em esponjas marinhas (Bergmann e Feeney 1951; Bergmann e Burke 1955). Estas foram isoladas, pela primeira vez, na esponja *Cryptotethia crypta* e, mais tarde, serviram de inspiração para a síntese do primeiro e mais conhecido composto de acção anti-retroviral: o Zidovudine ou AZT (Gochfeld, Sayed et al. 2003).

No final dos anos 80, o ‘National Cancer Institute’ (NCI) iniciou um estudo sistemático na procura de extractos provenientes de vários organismos, marinhos e terrestres, com actividade inibidora do VIH. Nos anos que se seguiram, foram testados cerca de 40000 extractos aquosos e orgânicos e, surpreendentemente, cerca de 15% demonstraram possuir alguma actividade anti-VIH (Roussis, Tziveleka et al. 2003). Desde então, têm vindo a proliferar os estudos na descoberta e isolamento de novas moléculas com actividade anti-VIH de origem natural. Têm sido reportados compostos com actividade anti-VIH de origens muito diversas - plantas terrestres, algas, microrganismos (bactérias, fungos, cianobactérias), esponjas, equinodermes, tunicados, corais, caranguejos, moluscos, etc. – e também de uma abrangente gama de variedades químicas – péptidos e proteínas, poliósidos (aniónicos, sulfatados), flavonóides, coumarinas, terpenóides, alcalóides, polifenóis, esteróis, sulfolípidos, lactonas (Clercq 2000; Jung, Lee et al. 2000; Gochfeld, Sayed et al. 2003; Roussis, Tziveleka et al. 2003; Asres, Seyoum et al. 2005).

Entre os organismos marinhos, as esponjas revelaram ser um dos mais prolíficos produtores de compostos com actividade anti-VIH, com um amplo espectro de alvos biológicos durante a replicação viral. A seguinte tabela resume os compostos existentes na literatura extraídos de esponjas marinhas que revelaram possuir actividade anti-VIH:

<b>Eponja</b>	<b>Composto</b>	<b>Actividade</b>
<i>Adocia sp.</i>	Adociavirina (proteína) <sup>(a,b)</sup>	Inibidor da fusão
<i>Batzella sp.</i>	Batzelladinas A e B e Isobatzellina C (alcalóides) <sup>(a,c)</sup>	Inibidor da fusão
<i>Callipelta sp.</i>	Calipeltina A (péptido) <sup>(a,c)</sup>	Inibidor da fusão
<i>Clathria sp.</i>	Clathsterol (esterol sulfatado) <sup>(a,c)</sup>	Inibidor da Transcriptase Reversa (RT)
<i>Corticium sp.</i>	Plakinaminas C e D e derivados (alcalóides) <sup>(a,c)</sup>	Inibidor da formação de sincícios
<i>Coscinoderma sp.</i>	Coscinamida (alcalóide) <sup>(a)</sup>	Citoprotector parcial
<i>Dercitus sp.</i>	Dercitina (alcalóide) <sup>(a)</sup>	Actividades anti-tumoral e antiviral de largo espectro (inibe adsorção do vírus à célula e intercala-se no RNA viral)
<i>Dysidea avara</i> <i>Dysidea cinerea</i>	Avarol, avarona e derivados (terpenóides) <sup>(a,c)</sup>	Inibidores da RT
<i>Euryspongia sp.</i>	Frondosina (terpenóide) <sup>(a)</sup>	Anti-citopático parcial
<i>Flascaplysinopsis reticulata</i> <i>Hyrrios cf. erecta</i>	Fascaplisina e Homofascaplisina (terpenóides) <sup>(a,c)</sup>	Inibidores da RT
<i>Halicortex sp.</i>	Dragmacidina (alcalóide) <sub>(a,c)</sub>	Inibidor da formação de sincícios
<i>Hippospongia sp.</i>	Taurospongina (sulfolípido) <sub>(a,c)</sub>	Inibidor da RT
<i>Ircinia sp.</i>	2-hexaprenilhidroquinona <sub>(a,c)</sub> Ircinal (alcalóide) <sup>(c)</sup>	Inibidor da RT do VIH-1 e VIH-2
<i>Mixylla rosacea</i>	Rosacelose (polióside sulfatado) <sup>(a,c)</sup>	Inibidor VIH <i>in vitro</i>
<i>Petrosia sp.</i>	Petrosinol e ácido petrosinólico (poliacetilenos) <sup>(a,c)</sup> , dissulfato de weinbersterol (esteróis sulfatados) <sup>(a,c)</sup> , petrosinas (alcalóides) <sup>(d)</sup>	Inibidores da RT
<i>Phyllospongia lamellosa</i>	Phyllolactonas (terpenóides) <sub>(a,c)</sub>	Inibidor da fusão

<i>Pseudoaxinnissa digitata</i> <i>Xestospongia sp.</i> <i>Topsentia sp.</i>	Sulfato de halistanol, sulfato de ibisterol e derivados (esteróides sulfatados) <sup>(a,c)</sup>	Citoprotector Inibidor da Integrase <sup>(c)</sup>
<i>Sidonops microspinosa</i>	Microspinosamida (péptido) <sup>(a,c)</sup>	citoprotector
<i>Spongia oceania</i> (origem biogénica mista: esponja e microrganismo)	Pokepola éster (diéster fosfato) <sup>(a)</sup>	Actividade anti-VIH moderada
<i>Theonella sp.</i>	Papuamida (péptido) <sup>(a,c)</sup> Swinholida e misakinolida (lactonas) <sup>(c)</sup>	citoprotector
<i>Toxiclona toxius</i>	Toxiusol, shaagrackol, toxicol (hidroquinonas hexaprenóides sulfatadas) <sup>(a,c)</sup>	Inibidores específicos da actividade de DNA polimerase da RT
<i>Trikenrion loeve</i>	Trikendiol (pigmento alcalóide) <sup>(a,c)</sup>	Inibidor da citopaticidade
Ordem Verongida	Vários metabolitos lipídicos bromados <sup>(a,c)</sup>	Potente inibição do VIH sem citotoxicidade
<i>Xestospongia muta</i>	Ácidos poliacetilénicos bromados <sup>(a,c)</sup>	Inibidor da Protease
<i>Aplysina sp.</i> <i>Poecillastra sp.</i> <i>Jaspis sp.</i>	Nucleósidos <sup>(c)</sup>	Inibidor da RT
<i>Jaspis sp.</i>	Jaspamida (péptido) <sup>(c)</sup>	Actividade anti-VIH mais potente, elevada citotoxicidade
<i>Niphates erecta</i>	Niphatevirina (glicoproteína) <sup>(c,e)</sup>	Inibidor da fusão
<i>Asteropus sarasinusum</i>	Sarasinósido C1 (esteróide glicosilado) <sup>(c)</sup>	Actividade anti-VIH
<i>Hippiospongia metachromia</i>	Ilimaquinona (terpenóide) <sup>(c)</sup>	Inibidor específico da actividade de RNase H da RT
<i>Sarcotragus sp.</i>	Hidroquinona sulfatada <sup>(c)</sup>	Inibidor da RT do VIH-1 e VIH-2

Tabela 2.1 – Compostos com actividade anti-VIH isolados a partir de esponjas; Referências: <sup>(a)</sup> (Roussis, Tziveleka et al. 2003), <sup>(b)</sup> (O'Keefe, Erim et al. 1998), <sup>(c)</sup> (Gochfeld, Sayed et al. 2003), <sup>(d)</sup> (Goud, Reddy et al. 2003), <sup>(e)</sup> (O'Keefe, Beutler et al. 1997).



Embora muitos destes compostos possuam actividades antivirais extremamente promissoras – algumas tão ou mais potentes que os fármacos já actualmente comercializados - até agora nenhum destes compostos encontrou uma via de introdução no mercado. A sua elevada citotoxicidade e a baixa especificidade são algumas das razões da não continuidade dos estudos de desenvolvimento destes compostos como potenciais fármacos anti-VIH, muito embora a introdução de pequenas alterações químicas a estas moléculas possa levar à diminuição da citotoxicidade e a uma actividade mais potente. Discute-se também o papel dos compostos citotóxicos como destruidores dos reservatórios celulares do vírus que existem nos órgãos linfáticos. No entanto, o maior entrave ao desenvolvimento destes compostos até chegarem à fase de comercialização continua a ser o problema de escassez. Muitos destes compostos existem em espécies de esponjas raras e em concentrações muito baixas, que não permitem estudos em grande escala. Este aspecto foi já discutido neste trabalho na secção 1.2.

### **2.1.3. A esponja *Erylus discophorus***

A esponja *Erylus discophorus* pertence à classe *Demospongia*, ordem *Astrophorida*, família *Geodiidae* (Hooper 1995). É uma esponja de forma massiva, com 2 a 5 cm de espessura, podendo formar “almofadas” circulares com um diâmetro até 20 cm. Apresenta uma superfície lisa, de cor cinzenta a negro, e branco a creme por dentro, consistência dura e sem elasticidade. Os ósculos são bem visíveis, medem entre 1 a 3 mm de diâmetro e aparecem geralmente organizados em fiadas. Possuem sete tipos diferentes de espículas siliciosas que se distribuem diferencialmente no ectossoma e no coanossoma (Boury-Esnault e Lopes 1985).



Figura 2.5 – Aspecto característico de uma esponja marinha da espécie *Erylus discophorus* (fotografia pertencente à colecção do álbum de recolhas do Laboratório de Bioquímica Inorgânica Marinha da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa)

Num trabalho anterior, foi realizado um rastreio de actividade anti-VIH à população de espongiários da Reserva Natural da Berlenga. Foram analisados 42 extractos de 15 espécies diferentes de esponjas, tendo sido detectada actividade anti-VIH em 5 extractos, todos pertencentes à espécie *Erylus discophorus* mas recolhidas em locais diferentes (Pina 2000). No entanto, não foi possível isolar a molécula responsável por esta actividade de inibição nem determinar a sua natureza química.

O actual trabalho visou prosseguir os estudos anteriores, na tentativa de isolar e caracterizar a molécula responsável pela actividade anti-VIH encontrada consistentemente em extractos aquosos de todos os espécimens da espécie *Erylus discophorus* estudados.

Noutro trabalho realizado paralelamente, a espécie *Erylus discophorus* demonstrou também possuir actividade como haloperoxidase (Nicolai, Esteves et al. 2007). As haloperoxidasas (HPO) catalizam, na presença de peróxido de hidrogénio, a oxidação de halogenetos ( $X^-$ : iodeto, brometo ou cloreto) ao seu ácido hipo-halogenoso correspondente ou a intermediários halogenados oxidados como  $OX^-$ ,  $X_3^-$  ou  $X^+$ . Esta actividade enzimática foi seguida em alguns passos ao longo deste trabalho de forma a esclarecer se as duas actividades biológicas – actividade de inibição do VIH e actividade enzimática como haloperoxidase - seriam independentes e, a serem-no, conseguir separá-las.

## **2.2. PARTE EXPERIMENTAL**

### **2.2.1. Materiais e Métodos**

Todas as soluções utilizadas no decorrer deste trabalho foram preparadas em água MilliQ<sup>®</sup> da Wasserlab, excepto quando especificado.

As esponjas utilizadas nesta secção são designadas pelos seguintes códigos: B161, B358, B437 e Fe04/01. Estas esponjas foram recolhidas na Reserva Natural da Berlenga (designadas por Bxxx) e na costa Norte de Espanha, em Ferrol (Fe04/01), nos anos de 1998, 2001, 2002 e 2004, respectivamente. Após a sua recolha, as esponjas foram colocadas em sacos de plástico individuais, com o devido código de identificação, transportadas até ao laboratório imersas em água do mar, em contentores refrigerados, onde foram posteriormente congeladas a -20°C até à sua utilização. Foi retirado um *voucher* de cada uma das amostras que foi conservado em etanol para a sua determinação taxonómica.

Antes de qualquer utilização, a esponja é limpa, sendo-lhes retirados macroorganismos que é comum existirem à superfície da esponja, como algas, pequenos crustáceos, moluscos com concha, etc, bem como outros detritos, como sedimentos e pequenas pedras.

#### **2.2.1.1. Preparação do extracto bruto**

A esponja, depois de limpa, é cortada em pequenos pedaços e triturada em água MilliQ, na proporção de 1:5 (g de esponja/mL de água), num homogeneizador com haste, durante alguns minutos até à disrupção completa do tecido. Seguidamente, esta mistura é deixada em homogeneização durante 30 minutos, numa câmara a 4°C, ao que se segue uma centrifugação a 6000 g durante 35 minutos. O precipitado, que contém espículas, detritos e resíduos celulares, é desprezado e o sobrenadante, decantado e filtrado com gaze, consiste no extracto bruto (EB).

### 2.2.1.2. Avaliação da actividade anti-VIH

A avaliação da actividade anti-VIH constitui-se de várias etapas:

- Produção e manutenção das linhas celulares 293T e Jurkat;
- Produção da estirpe viral HIV-1 NL4-3
- Determinação da infectividade viral
- Ensaio de susceptibilidade do VIH
- Determinação da viabilidade celular
- Determinação do grau de infecção

O primeiro passo consiste na obtenção da estirpe viral que será utilizada para infectar as células durante o ensaio de susceptibilidade. O DNA viral, inserido num vector apropriado, é extraído e amplificado por PCR. Seguidamente, células 293T são transfectadas com este DNA com a ajuda de um agente de transfecção, transformando-as em células produtoras de vírus. Estes vírus são quantificados quanto à sua capacidade de infecção de células linfocitárias Jurkat e armazenados a -20°C, em alíquotas, até à sua posterior utilização. Por fim é então feito o ensaio de inibição do VIH propriamente dito, em que é avaliada a inibição da replicação do vírus na presença de cada uma das amostras. Este é acompanhado paralelamente por um ensaio de viabilidade celular. A produção de novos vírus é quantificada por um ensaio de ELISA ('Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay'), através de anticorpos específicos para a proteína p24 da cápside viral.

A descrição mais detalhada de cada uma destas etapas encontra-se de seguida. Todos os passos que envolvam o manuseamento de células animais e/ou partículas virais são realizados numa câmara de fluxo laminar localizada no interior de uma sala de biosegurança nível 3.

#### a) Produção e Manutenção das linhas celulares

A linha celular 293T deriva de células embrionárias do rim humano (HEK do inglês 'Human Embryonic Kidney') e é vulgarmente utilizada na produção de vectores retrovirais. Estas células são cultivadas em meio DMEM completo ('Dulbecco's Modified Eagle Medium'), numa câmara de incubação controlada a 37°C, 97% humidade e 0,3% de CO<sub>2</sub>.

As células Jurkat constituem uma linha celular imortalizada de linfócitos T, cuja principal utilização é a determinação da susceptibilidade de vários agentes patogénicos (como o cancro e o VIH) a determinados fármacos. Estas células são cultivadas em meio RPMI completo, numa câmara de incubação controlada a 37°C, 97% humidade e 0,3% de CO<sub>2</sub>.

A contagem de células viáveis (nº de células viáveis/mL) faz-se por microscopia óptica, com a ajuda de um hematocitómetro. A 10 µL da cultura de células juntam-se 90 µL de uma solução de azul de tripano 0,5% em soro fisiológico. Esta mistura é homogeneizada com o auxílio de uma pipeta e é colocada no hematocitómetro, procedendo-se à contagem das células viáveis. O azul de tripano é um corante que, caso a membrana celular não mantenha a sua integridade, cora a célula de azul enquanto que as células cuja membrana se apresenta intacta e, portanto, são viáveis, se mantêm translúcidas sobre o fundo azul.

#### b) Produção da estirpe viral HIV-1 NL4-3

As células competentes – estirpe bacteriana JM-109 – foram previamente transformadas com um inserto correspondente ao DNA viral (fornecido pelo ‘AIDS Reagent and Reference Program do National Institute of Health’) e armazenadas em alíquotas a -80°C até posterior utilização. As células são deixadas em cultura de um dia para o outro em meio L com ampicilina, numa incubadora com agitação orbital. O DNA do plasmídeo é extraído utilizando o ‘Jetquick Plasmid MiniPrep Spin Kit’, de acordo com as instruções do fabricante.

Para a transfecção, foram plaqueadas previamente cerca de  $4,5 \times 10^6$  células viáveis 293T, em fase exponencial de crescimento, num volume de 10 mL e deixadas em cultura de um dia para o outro. A mistura de transfecção é preparada adicionando, a um volume de meio DMEM basal, 2 µg de DNA plasmídico e 6 µL do agente de transfecção Fugene 6 (Roche) ajustando-se o volume de meio DMEM basal até ao volume final de 100 µL. Esta mistura é adicionada suavemente, gota a gota, à cultura de células 293T preparada anteriormente e é deixada a incubar durante 4 horas, após as quais se adicionam 10 mL de meio DMEM completo. Ao fim de 48 horas de incubação após este último passo retira-se o sobrenadante (no qual estão as partículas virais), divide-se em alíquotas e guarda-se a -20°C até posterior utilização.

c) Determinação da Infectividade Viral (DAIDS 1997)

A infectividade viral é quantificada pelo parâmetro TCID<sub>50</sub> ('Tissue Culture Infective Dose') que representa a dose viral com capacidade para infectar 50% das células presentes no ensaio. A determinação do título viral de cada 'batch' de vírus é determinada antes do seu uso no ensaio de susceptibilidade para minimizar os efeitos do inóculo. A partir de uma solução 'stock' de HIV-1 NL4-3 são preparadas diluições em série desde 4<sup>-2</sup> a 4<sup>-8</sup>, num volume final de 200 µL contendo 200000 células Jurkat em fase exponencial de crescimento. Ao 4º dia é feita uma mudança de 50% do meio e ao 7º dia recolhe-se o sobrenadante que é posteriormente sujeito à determinação do grau de infecção (ver secção 2.2.1.2.f)). O TCID<sub>50</sub> é calculado pelo método de Spearman-Kärber, utilizando a seguinte fórmula:

$$M = xk + d [0,5 - (1/n)(r)]$$

Em que,

M = TCID<sub>50</sub> em 200 µL de 'batch' viral

xk = dose da diluição mais elevada

r = somatório do número de respostas negativas

d = intervalo entre diluições

n = número de replicados por diluição

d) Ensaio de Susceptibilidade do VIH (DAIDS 1997)

O ensaio de susceptibilidade *in vitro* mede a extensão da inibição que um determinado fármaco provoca na produção do antigénio p24 do VIH por células linfocíticas infectadas por uma estirpe viral isolada clinicamente utilizando um inóculo previamente titulado. Este ensaio é realizado numa placa de 96 poços, utilizando 200000 células Jurkat por poço, com uma dose de HIV-1 NL4-3 de 1000 TCID<sub>50</sub>/milhão de célula e 20 µL de cada amostra a testar, num volume total de 200 µL por poço. Ao fim de 4 dias, procede-se à mudança de 50% do meio de cultura, adiciona-se novamente 20 µL da respectiva amostra a testar e ao 7º dia recolhe-se o sobrenadante de cada um dos poços e determina-se o grau de infecção.

Este ensaio foi realizado de dois modos diferentes: **com pré-incubação** antes da infecção, em que se adicionam os 20 µL de amostra e deixa-se incubar com as células

durante 30 minutos antes de se adicionar o inóculo viral; ou **sem pré-incubação**, em que as células são infectadas pela adição do inóculo e só depois se adicionam os 20 µL de amostra.

Paralelamente à determinação de susceptibilidade para cada uma das amostras, incluíram-se sempre dois poços controlo: o controlo positivo (+) era constituído por células incubadas com água destilada ou tampão de amostra (em substituição da amostra e sempre nas mesmas condições) e posteriormente infectadas com o inóculo viral; o controlo negativo (-) era constituído apenas por células e água destilada ou tampão de amostras, sem inóculo viral.

#### e) Determinação da Viabilidade Celular

A viabilidade celular funciona como um controlo do ensaio de susceptibilidade, de modo a garantir que os efeitos de inibição sobre a produção do antígeno p24 se devem realmente à amostra a ser testada e não à morte das células (uma vez que a morte celular implica que haverá pouca ou nenhuma replicação viral).

O reagente WST-1 é um sal de tetrazólio que é degradado pelas desidrogenases mitocondriais de células metabolicamente activas formando formazan, cujo máximo de absorção é a 440 nm. Deste modo, é possível correlacionar directamente os valores de absorvância com o número de células viáveis.

Numa placa de 96 poços, adicionam-se 200 000 células a cada poço e 20 µL de cada uma das amostras testadas no ensaio de susceptibilidade (uma amostra em cada poço), num volume final de 200 µL. Ao fim de 4 dias, procede-se tal como para o ensaio de susceptibilidade, mudando o meio de cultura e adicionando mais 20 µL de amostra. Ao 7º dia, adiciona-se, a cada poço, 20 µL do reagente de proliferação celular WST-1, deixa-se a incubar durante meia hora a 4 horas e lê-se a absorvância a 450 nm, com filtro de referência a 620 nm.

#### f) Determinação do Grau de Infecção

O grau de infecção é determinado pela presença da proteína p24 da cápside viral, num ensaio de ELISA que utiliza anticorpos específicos para este antígeno do VIH. Este ensaio é comercializado, em forma de 'kit', pela empresa Innogenetics e é designado por INNOTEST HIV Antigen mAb. Este 'kit' apresenta placas de microtítulo cujos poços foram revestidos com anticorpos policlonais humanos contra o VIH. A

amostra, contendo o antígeno do VIH (que consiste no sobrenadante retirado ao 7º dia do ensaio de susceptibilidade ou do ensaio de infectividade), é incubada nos poços revestidos, conjuntamente com uma mistura de anticorpos monoclonais biotinilados anti-p24. A estreptavidina conjugada com a peroxidase liga-se à biotina e a incubação com um substrato cromogénico da peroxidase leva à produção de uma coloração azul, que passa a amarelo quando a reacção é interrompida com ácido sulfúrico e cuja absorvância pode ser determinada a 450 nm. Caso a amostra não contenha VIH, o anticorpo marcado não se poderá ligar especificamente ao antígeno p24 e apenas se desenvolverá uma coloração muito ligeira.

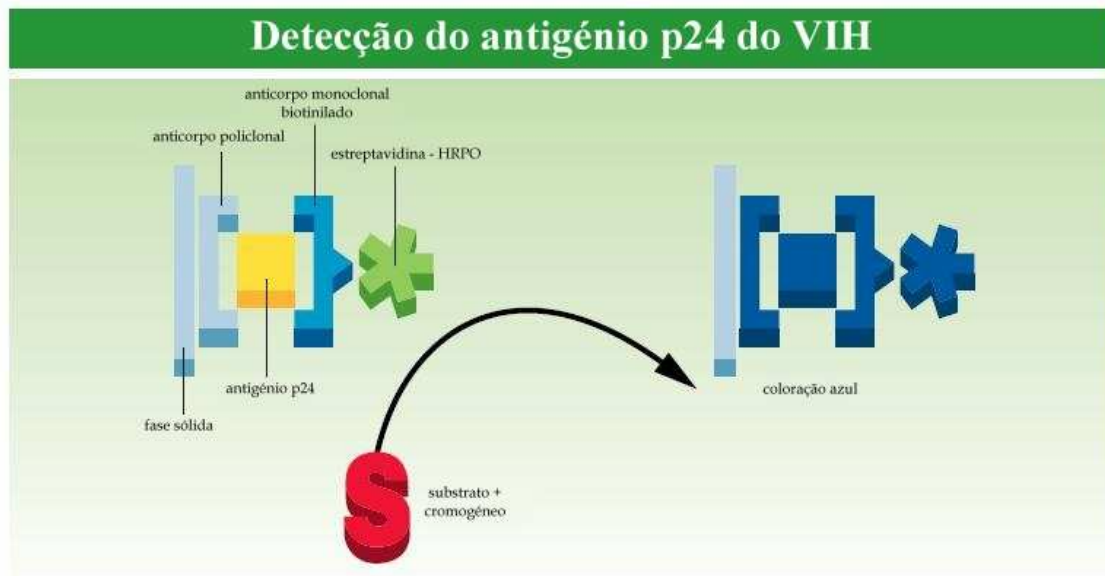


Figura 2.6 – Modo de acção do ensaio ELISA para a determinação do grau de infecção (adaptado de <[http://www.innogenetics.be/fotos/INNOTEST\\_HIV\\_Ag\\_mAb\\_CE.pdf](http://www.innogenetics.be/fotos/INNOTEST_HIV_Ag_mAb_CE.pdf)>)

A absorvância a 450 nm correlaciona-se directamente com a quantidade de proteína p24 e, portanto, é inversamente proporcional ao grau de inibição de replicação do VIH. Ao longo deste trabalho, a avaliação do grau de inibição das amostras analisadas foi estudada de um modo apenas qualitativo. A inexistência de actividade anti-VIH foi assinalada com um sinal menos (-), uma actividade de inibição média indicada por (+) e forte por (++) e uma inibição ligeira assinalada com (+/-).



### 2.2.1.3. Seguimento da actividade de Iodoperoxidase

A actividade enzimática de haloperoxidase foi seguida espectrofotometricamente, a 350 nm, através da formação de triiodeto, a partir de  $I^-$  e  $H_2O_2$ , catalizada pelo enzima que actua como iodoperoxidase (IPO) (Björkstén 1968). O ensaio enzimático é realizado contra um branco em que a quantidade de amostra é substituída pela mesma quantidade da solução-tampão em que esta se encontra. A unidade de actividade enzimática como iodoperoxidase é definida pelo consumo de 1  $\mu\text{mol}$  de  $H_2O_2$  por minuto (1 U = 1  $\mu\text{mol}$   $H_2O_2/\text{min}$ ). A velocidade do aumento de absorvância a 350 nm ( $dA/dt$ ), devido à formação de triiodeto, relaciona-se com a velocidade de consumo de  $H_2O_2$  através da seguinte expressão:

$$d[H_2O_2]/dt = [(1 + K/[I^-]) \times dA/dt]/\epsilon_M(I_3^-)$$

em que:

$K$  é a constante de equilíbrio da reacção  $I_2 + I^- \leftrightarrow I_3^-$  ( $1,3 \times 10^{-3}$  M)

$[I_3^-] = 6,06$  mM

$\epsilon_M(I_3^-) = 2,64 \times 10^4$   $\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$

### 2.2.1.4. Concentração de amostras

Uma vez que a concentração da amostra pode ser um factor preponderante no ensaio da actividade anti-VIH, havia a necessidade de obter amostras tão concentradas quanto possível. As amostras foram concentradas por ultra-filtração, num dispositivo Amicon, cuja membrana de exclusão retém moléculas com massa molecular superior a 10000 Da (Amicon 10K, Millipore), de acordo com as especificações do fabricante.

Para a concentração do extracto bruto, um volume inicial de 235 mL de extracto bruto, preparado como descrito no ponto 2.2.1.1., foi concentrado por ultra-filtração até ao volume final de 90 mL, o que resulta num factor de concentração de 2,6.

### **2.2.1.5. Métodos de Purificação**

Por uma questão de optimização do processo de isolamento da molécula com actividade anti-VIH, escolheu-se fazer estes estudos em apenas uma esponja e, mais tarde, se o método de purificação se revelasse eficiente, seria repetido para as outras esponjas. A esponja escolhida para os estudos de purificação foi a amostra B161 por ser a que existia armazenada em maior quantidade.

Foram feitas várias tentativas de isolamento da molécula responsável pela actividade anti-VIH, utilizando muitas técnicas bioquímicas diferentes de separação vulgarmente conhecidas e utilizadas. Foram poucos os passos que levaram a uma separação eficiente mantendo alguma actividade biológica. Neste trabalho apresentam-se os resultados que nos permitiram obter algumas informações relevantes sobre a natureza química do composto com actividade anti-VIH.

Devido à complexidade e diversidade das metodologias aplicadas ao longo deste trabalho, encontra-se, no final deste capítulo, um esquema que resume a parte experimental desta secção, em página A3 desdobrável, para permitir um acompanhamento mais fácil da descrição do trabalho desenvolvido.

#### **a) Precipitação salina do extracto bruto**

O extracto bruto (35 mL) foi colocado num banho de gelo, com agitação suave, e adicionou-se sulfato de amónio aos poucos até se obter 70% da percentagem de saturação deste sal (17 g). Deixou-se em agitação durante 2 horas, seguindo-se uma centrifugação a 10000 g durante 60 minutos, após o que, se recolheram 35 mL de sobrenadante – que se designou por B161 sob SA - e desprezou-se o precipitado.

#### **b) Diálise do sobrenadante proveniente da precipitação salina**

Procedeu-se a novo passo de precipitação salina como descrito no ponto anterior, utilizando 40 mL de extracto bruto e obtiveram-se 40 mL de sobrenadante, que foi dialisado contra água destilada durante 4 dias, com agitação e a 4 °C, procedendo-se a 4 mudanças da água de diálise. Obteve-se 175 mL de sobrenadante dialisado que foi concentrado por ultra-filtração. Resultaram 5 mL de sobrenadante dialisado concentrado que foi novamente sujeito a diálise durante 28 horas com uma mudança de água, da qual se obtiveram 20 mL no final da diálise. Seguidamente, esta amostra foi dessalinizada

por cromatografia líquida numa coluna PD-10 (matriz: Sephadex G-25, altura da coluna 5 cm, volume de matriz: 8,3 mL, eluída com água MilliQ de acordo com as especificações do fabricante), da qual se recolheram 22,5 mL que foram novamente concentrados até um volume final de 2 mL. Estes foram de novo injectados numa coluna PD-10 e obteve-se 5 mL de sobrenadante dialisado concentrado final, que foi armazenado a -20°C até posterior utilização.

A eficiência da dessalinização foi seguida através do teste de cloreto de bário, que consiste na adição de 50 µL de uma solução de BaCl<sub>2</sub> 0,1 M a 100 µL de amostra. A remoção de sais da amostra só é considerada eficiente quando o teste efectuado se revela negativo, ou seja, quando o precipitado de BaSO<sub>4</sub>, característico da presença de iões sulfato em solução, não é visível a olho nu.

#### c) Precipitação etanólica do extracto bruto

Primeiro ensaio:

Liofilizou-se 48 mL de extracto bruto e obteve-se 950 mg de extracto liofilizado, que foi ressuspenso em água MilliQ arrefecida a 4°C para uma concentração final de 50 mg/mL. Em banho de gelo, adicionou-se igual volume de etanol arrefecido a -20°C, lentamente e com agitação suave, deixou-se em homogeneização durante 1 hora e de um dia para o outro a -20°C. Seguidamente centrifugou-se a 5000 g durante 30 minutos.

Obtiveram-se 35 mL de sobrenadante que foi dividido em 3 alíquotas: uma alíquota de 5 mL, que foi armazenada a -20°C; uma alíquota de 15 mL, que foi evaporada sob vácuo, a uma temperatura do banho inferior a 35°C, obtendo-se um resíduo amarelado no final designado por sob EtOH rv; uma última alíquota de 15 mL, que foi liofilizada obtendo-se um resíduo designado por sob EtOH liof. Ambos os resíduos foram dissolvidos em 5 mL de água MilliQ fria e armazenados a -20°C até posterior utilização. O precipitado etanólico foi dissolvido em 10mL de água MilliQ fria e congelado a -20°C. Posteriormente foram testadas as actividades anti-VIH e IPO dos dois sobrenadantes e do precipitado.

Segundo ensaio:

Ao longo do trabalho prático foi necessário obter maior quantidade de amostra, pelo que se procedeu a nova precipitação etanólica, nas seguintes condições: preparou-se o extracto bruto como descrito em 2.2.1.1. a partir de 94 g de esponja e obtiveram-se

395 mL de extracto, que foi liofilizado e dissolvido em água MilliQ até uma concentração final de 50 mg/mL. Obtiveram-se 10,4 g de extracto bruto liofilizado, que após dissolução e precipitação com etanol como descrito acima, deram origem a 20,24 g de precipitado etanólico que foi dissolvido em 100 mL de solução-tampão Tris-Cl 50 mM, dividido em alíquotas de 12 mL e armazenado a -80°C até posterior utilização.

d) Métodos de extracção de glícidos

Num trabalho anterior, foram feitas extracções de glícidos de várias esponjas utilizando 4 métodos distintos (Nicolai 2001). Estes métodos de extracção estão descritos pormenorizadamente no Anexo II-A). Estas extracções deram origem a vários precipitados glicídicos que, depois de convenientemente secos, foram armazenados em recipientes de plástico fechados e vedados com parafilme, à temperatura ambiente, desde 2001. Os 4 precipitados obtidos para cada uma das esponjas (I, II, III e IV, respectivamente a cada um dos métodos de extracção) foram dissolvidos em água MilliQ, numa concentração de 26 mg de precipitado/mL de água, e testados quanto à sua actividade anti-VIH.

e) Separações Cromatográficas

Os fraccionamentos cromatográficos foram realizados num sistema de cromatografia líquida FPLC ('Fast Protein Liquid Chromatography') da Pharmacia com colector automático e seguidos a 280 nm por um detector UV acoplado. As amostras obtidas após cada um dos passos de separação descritos anteriormente foram sujeitas a várias cromatografias, sob várias condições, que se descrevem seguidamente. Na tabela 6.1 do anexo I-A) encontram-se descritas detalhadamente as características das várias colunas de cromatografia utilizadas. Nos parágrafos que se seguem, as separações cromatográficas serão identificadas pelo nome da matriz utilizada. As colunas S-300 e Superose 6 foram calibradas através da determinação dos volumes de eluição de uma mistura de marcadores de massa molecular. Os dados destas calibrações encontram-se nos Anexos I-B) e I-C), respectivamente.

O **sobrenadante** obtido através do protocolo descrito na secção 2.2.1.5.a), B161 sob SA, foi submetido a duas separações cromatográficas: filtração em gel e interacção hidrofóbica. A cromatografia de filtração em gel foi realizada na coluna Superose 6;

Injectaram-se 2 mL de amostra que foram eluídos com solução-tampão fosfatos 50 mM pH 7,0 a um fluxo de 1 mL/min e recolheram-se fracções de 2 mL. As fracções correspondentes a cada um dos picos foram juntas, determinou-se o seu conteúdo proteico e glicídico e testou-se a sua actividade anti-VIH.

Na cromatografia de interacção hidrofóbica, realizada na coluna Phenyl Sepharose, foram injectados 10 mL de amostra, que foi eluída com solução-tampão fosfatos 50 mM pH 7,0, num gradiente decrescente de 600 mL de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  de 2,2 a 0 M, a um fluxo de 5 mL/min.

O **sobrenadante** obtido através do protocolo descrito na secção 2.2.1.5.b) foi submetido a uma cromatografia de filtração em gel, na coluna S-300, injectando-se 2 mL de amostra que foram eluídos com água MilliQ a um fluxo de 0,5 mL/min e recolheram-se fracções de 2,5 mL em banho de gelo. As fracções correspondentes a cada um dos picos foram juntas, perfazendo um total de 6,25 e 25 mL, e concentradas por ultra-filtração num dispositivo Amicon 10K até ao volume final de 1,3 e 4 mL, respectivamente.

O **extracto bruto** obtido no passo 2.2.1.1. foi sujeito a uma cromatografia de filtração em gel na coluna Superose 6. Injectou-se 1 mL de amostra que foi eluída com solução-tampão fosfatos 50 mM pH 7,0, a um fluxo de 1 mL/min e recolheram-se as fracções correspondentes a cada um dos picos: pico 1 dos 24 aos 28 mL, pico 2 dos 40 aos 54 mL e pico 3 dos 56 aos 82 mL. Foi determinado o conteúdo em proteína, em glícidos totais e a actividade anti-VIH de cada uma das fracções.

O **extracto bruto concentrado** foi sujeito a várias separações cromatográficas de filtração em gel e troca iónica. Na cromatografia de filtração em gel, injectaram-se 5 mL de extracto bruto concentrado na coluna S-300, eluíu-se com solução-tampão fosfatos 50 mM pH 7,0, a um fluxo de 0,5 mL/min e recolheram-se fracções de 10 mL. A coluna e o colector de fracções foram mantidos em refrigeração durante a cromatografia. As fracções recolhidas foram concentradas por ultra-filtração e foram testadas quanto à sua actividade anti-VIH e de iodoperoxidase.

Na cromatografia de troca iónica DEAE injectaram-se 5 mL do extracto bruto concentrado e eluíu-se com solução-tampão fosfatos 50 mM pH 7,0, num gradiente

crescente de 200 mL de NaCl de 0 a 2 M, a um fluxo de 2,5 mL/min. A coluna e o colector de fracções foram mantidos em refrigeração durante a cromatografia. Recolheram-se fracções de 5 mL, da fracção 1 à 20, e de 10 mL, da fracção 20 à 40. As fracções recolhidas foram testadas quanto à sua actividade anti-VIH antes e depois de serem concentradas. Após concentração, as fracções foram testadas quanto à sua actividade como iodoperoxidase e estudadas por SDS-PAGE (Hoefler 1994). Os géis foram corados para proteína, pelo método de nitrato de prata (Hoefler 1994), e para actividade de iodoperoxidase, pelo método da *orto*-dianisidina (Vilter e Glombitza 1983). Os métodos de preparação dos géis e de ambas as colorações encontram-se descritos nos Anexos II-B), II-D) e II-E), respectivamente.

Na cromatografia de troca iónica MonoQ injectaram-se 2 mL de extracto bruto concentrado e eluíu-se com solução-tampão Bis-Tris Propano 20 mM pH 7,0, num gradiente crescente de 20 mL de NaCl de 0 a 2 M, a um fluxo de 0,5 mL/min. Foram recolhidas fracções de 5 mL em banho de gelo que foram testadas quanto à sua actividade anti-VIH antes e depois de concentrar.

O **extracto bruto concentrado** e o **precipitado etanólico** obtido segundo o protocolo descrito na secção 2.2.1.5.c) foram estudados por cromatografia em mini-coluna pré-empacotada em várias matrizes de troca hidrofóbica e troca iónica. No entanto, apenas a matriz DEAE revelou ser uma boa candidata como passo de purificação. Foram feitas várias cromatografias utilizando a matriz DEAE eluídas a vários pH. Para pH 7,0 usou-se a solução-tampão Bis-Tris Propano 50 mM, para pH 6,0 usou-se a solução-tampão Bis-Tris 20 mM e para pH 5,0 usou-se a solução-tampão Piperazina 20 mM. Injectaram-se 50 µL de amostra e eluiu-se com a solução-tampão respectiva, num gradiente crescente de 5 mL de NaCl de 0 a 3 M, a um fluxo de 1 mL/min.

Depois de determinadas as condições de eluição mais favoráveis, através dos estudos referidos anteriormente, foi realizada uma cromatografia na coluna DEAE onde se injectaram 5 mL do **precipitado etanólico** e eluíu-se com solução-tampão Bis-Tris 20 mM a pH 6,0, num gradiente crescente de 400 mL de NaCl de 0 a 3 M, a um fluxo de 2,5 mL/min. Todo o sistema estava refrigerado e recolheram-se fracções de 10 mL. As fracções recolhidas foram testadas quanto à sua actividade como iodoperoxidase, determinou-se o seu conteúdo glicídico e proteico e foram estudadas por SDS-PAGE. Os géis foram corados para proteína, pelo método de nitrato de prata e para actividade

de iodoperoxidase, pelo método da *orto*-dianisidina. As fracções correspondentes a cada um dos picos, designadamente pico 1 – fracções 6 a 12, pico 2 – fracções 25 a 34, e pico 3 – fracções 35 a 50, foram juntas e concentradas por ultra-filtração até um volume final de 1600, 4700 e 5900  $\mu\text{L}$ , respectivamente, e foram testadas quanto à sua actividade anti-VIH.

O precipitado glicídico obtido através do método de extracção IV aplicado à esponja B161 obtido através do protocolo descrito na secção 2.2.1.5.d), **precipitado glicídico B161(IV)**, foi dissolvido em água MilliQ na proporção de 50 mg/mL e estudado por cromatografias de filtração em gel (S-300 e Superose 6), troca iónica (DEAE) e afinidade (Concanavalina A). Injectaram-se 2 mL de amostra na coluna Superose 6, eluiu-se com solução-tampão fosfatos 50 mM pH 7,0, a um fluxo de 0,5 mL/min, e recolheram-se fracções de 5 mL, cujo conteúdo proteico e de glícidos totais foi analisado posteriormente. A fracção 9 desta cromatografia, correspondente à zona de maior absorvância a 280 nm do 2º pico cromatográfico, foi injectada (50  $\mu\text{L}$ ) na minicoluna DEAE pré-empacotada e eluída com solução-tampão fosfatos 50 mM pH 7,0, num gradiente crescente de 5 mL de NaCl de 0 a 3 M, a um fluxo de 1 mL/min.

Injectaram-se, na coluna de Concanavalina A, 500  $\mu\text{L}$  de precipitado glicídico B161(IV) e eluiu-se com solução-tampão fosfatos 50 mM pH 7,0, num gradiente crescente de 100 mL de glucose, de 0 a 2 M, a um fluxo de 1 mL/min.

Na coluna S-300, injectaram-se 2 mL de precipitado glicídico B161(IV) e eluiu-se com solução-tampão fosfatos 50 mM pH 7,0, a um fluxo de 0,5 mL/min. Repetiu-se esta separação cromatográfica, substituindo o eluente por água MilliQ. Recolheram-se fracções de 5 mL; as fracções 4 a 10, correspondentes ao primeiro pico cromatográfico, e as fracções 11 e 12, correspondentes ao segundo pico cromatográfico, foram juntas e concentradas e testadas quanto à sua actividade anti-VIH.

### **2.2.1.6. Doseamentos Colorimétricos**

Ao longo deste trabalho, a quantidade de proteína foi determinada pelo método de Bradford (Bradford 1976), utilizando como padrões várias soluções de albumina do soro bovino (BSA, do inglês 'Bovine Serum Albumine') de concentração compreendida entre 0 e 100 µg/mL.

A quantidade de glícidos totais foi determinada pelo método do orcinol/ácido sulfúrico, que se baseia na reacção de hidrólise das ligações glicosídicas provocada pelo ácido sulfúrico concentrado e a subsequente reacção de desidratação dos monósidos libertados originando derivados do furfural, que reagem com o orcinol formando um produto corado que absorve a 420 nm (Chaplin e Kennedy 1986). Utilizou-se como padrões várias soluções de glucose de concentração compreendida entre 0 e 125 µg/mL.

Em ambas as determinações utilizou-se sempre um branco constituído pela solução-tampão da amostra para descontar possíveis interferências. Sempre que a amostra apresentasse maior absorvância que o padrão de maior concentração, esta era diluída até que a sua absorvância se incluísse no intervalo de absorvâncias dos padrões. Foram feitos ensaios em triplicado para o doseamento de cada uma das amostras e os valores da sua concentração foram calculados por extrapolação nas respectivas curvas de calibração, utilizando o valor de absorvância da amostra correspondente à mediana.

## **2.2.2. Resultados e Discussão**

### **2.2.2.1. Determinação da actividade anti-VIH do extracto bruto**

Antes de qualquer tentativa de purificação, o extracto bruto, preparado como descrito na secção 2.2.1.1., foi testado quanto à sua capacidade de inibição do VIH, para confirmar, de facto, os resultados obtidos anteriormente. Estes ensaios de susceptibilidade do vírus à amostra foram feitos com e sem pré-incubação, como descrito na secção 2.2.1.2.. Observou-se que o extracto bruto analisado apenas exercia actividade de inibição da replicação do VIH quando era incubado previamente com as células antes da sua infecção. No ensaio sem pré-incubação da amostra não se observou a existência de qualquer actividade antiviral. Estas observações levam-nos a pensar que o mecanismo de inibição viral desta amostra funciona ao nível do impedimento da



adsorção e entrada do vírus na célula. A determinação mais precisa do mecanismo de inibição requer o isolamento prévio da molécula bioactiva. Após este ensaio, todas as determinações de actividade anti-VIH foram feitas com pré-incubação da amostra.

Foram preparados extractos brutos de outras três esponjas também pertencentes à espécie *Erylus discophorus*, mas recolhidas em localizações e anos diferentes – B358, B437 e Fe04/01. Todos os extractos demonstraram possuir capacidades de inibição viral equivalentes. As esponjas cujo código começa por B foram recolhidas na Reserva Natural da Berlenga; no entanto, os seus locais de recolha são distintos. Este facto leva-nos a pensar que esta bioactividade é característica desta espécie e independente da localização geográfica.

#### 2.2.2.2. Discussão dos passos de Precipitação Etanólica

A separação do sobrenadante, obtido após a precipitação etanólica do extracto bruto, em 3 alíquotas e a evaporação de duas delas por métodos diferentes serviu para garantir que o método de evaporação não tinha qualquer influência sobre as actividades biológicas da amostra e para determinar se estas se dividiriam entre precipitado ou sobrenadante ou ficariam retidas em apenas uma das fases. A tabela seguinte resume os resultados obtidos para a primeira precipitação etanólica descrita na secção 2.2.1.5.c):

Amostra	Proteína (µg/mL)	Glícidos (µg/mL)	IPO (U/mL)	Anti-VIH
B161/EB	332	1270	n.d.	++
precipitado EtOH	1162	827	60,8	++
Sob EtOH rv	684	224	0	-
Sob EtOH liof	596	306	0	-

Tabela 2.2 - Resumo dos resultados obtidos para a primeira precipitação etanólica do extracto bruto;

n.d. – não determinado

Para uma análise comparativa dos resultados, apresentam-se os valores em quantidades totais para cada uma das amostras na tabela seguinte:

Amostra	Proteína (mg)	Glúcidos (mg)	IPO (U)
B161/EB (48 mL)	15,9	61,0	n.d.
Precipitado EtOH (10 mL)	11,6	8,3	608
Sob EtOH rv (5 mL)	3,4	1,1	0
Sob EtOH liof (5 mL)	3,0	1,5	0
Total precipitado + sobrenadantes	18,0	10,9	608

Tabela 2.3 - Quantidades totais para cada uma das amostras obtidas após a primeira precipitação etanólica do extracto bruto

As primeiras considerações que se podem fazer em relação a estes resultados são que a soma da quantidade total de proteína e glúcidos existentes no precipitado e sobrenadante não é totalmente concordante com a que existia inicialmente no extracto bruto. No caso da quantidade de proteína, a discrepância é muito pequena e pode ser imputada aos erros associados ao próprio método de doseamento, bem como ao facto de ser necessária a preparação de diluições das amostras – elas próprias afectadas de erro - para se conseguir quantificar o conteúdo proteico de amostras muito concentradas. Para o conteúdo glicídico os valores são muito discrepantes, existindo inicialmente no extracto bruto cerca de 6 vezes mais glúcidos do que na soma da quantidade existente no precipitado e sobrenadantes. Esta grande discrepância de resultados deve-se, provavelmente, ao facto de, neste método de doseamento, os valores obtidos variarem substancialmente com a diluição da amostra.

Em relação a concentrações proteicas, podemos dizer que este é um bom passo de concentração, uma vez que a proteína no precipitado etanólico ficou 3,5 vezes mais concentrada do que estava inicialmente no extracto bruto. Em termos de fraccionamento, o passo de precipitação etanólica também se revelou ser eficiente, uma vez que removeu cerca de 36% de proteína e 24% de glúcidos que ficaram dissolvidos no sobrenadante, enquanto que o precipitado manteve e concentrou ambas as actividades biológicas – iodoperoxidase e anti-VIH. Face a estes resultados, foi decidido manter o passo de precipitação etanólica do extracto bruto como primeiro passo de fraccionamento.

Foi necessário, então, obter maior quantidade de amostra para prosseguir os estudos, pelo que se procedeu ao segundo ensaio de precipitação etanólica descrito na secção 2.2.1.5.c). O extracto bruto inicial e o precipitado etanólico obtido foram

doseados quanto ao seu conteúdo glicídico e proteico e determinadas as actividades biológicas. O sobrenadante foi simplesmente descartado e não foi considerado em nenhuma destas determinações uma vez que já se tinha observado, no ensaio anterior, que este não retia nenhuma das actividades biológicas de interesse. Os resultados encontram-se resumidos na tabela seguinte:

Amostra	Proteína (mg/mL)	Glicídios (mg/mL)	IPO (U/mL)	Anti-VIH
B161/EB	1,25	1,81	5,8	++
precipitado EtOH	2,78	3,67	48,4	++
Factor de concentração	2,2	2,0	8,3	n.a.

Tabela 2.4 - Resumo dos resultados obtidos para a segunda precipitação etanólica do extracto bruto;

n.a. – não se aplica

Estes resultados confirmam que o passo de precipitação etanólica constitui um passo eficiente de concentração das actividades biológicas ao mesmo tempo que separa uma série de proteínas e glicídios que ficam retidos no sobrenadante. Este precipitado etanólico dissolvido em água MilliQ foi dividido em alíquotas e armazenado a -80°C até à sua utilização. Uma vez que o passo de descongelação pode levar à perda de alguma actividade enzimática, esta foi determinada também após a descongelação e imediatamente antes da sua injeção na coluna de cromatografia.

### 2.2.2.3. Determinação da actividade anti-VIH dos precipitados glicídicos

Todos os precipitados glicídicos armazenados (ver secção 2.2.1.5.d)) foram testados quanto à sua actividade anti-VIH, mesmo os que provinham de espécies de esponjas diferentes de *Erylus discophorus*. Os valores de absorvância obtidos no ensaio de determinação do grau de infecção – secção 2.2.1.2.f) – foram extrapolados numa curva de p24 validada. Estes valores devem, no entanto, ser avaliados de um modo meramente comparativo; eles servem apenas para correlacionar as várias amostras analisadas neste ensaio, não possuindo qualquer valor quantitativo de inibição. A absorvância a 450 nm correlaciona-se directamente com a quantidade de proteína p24 de acordo com a seguinte curva de calibração:

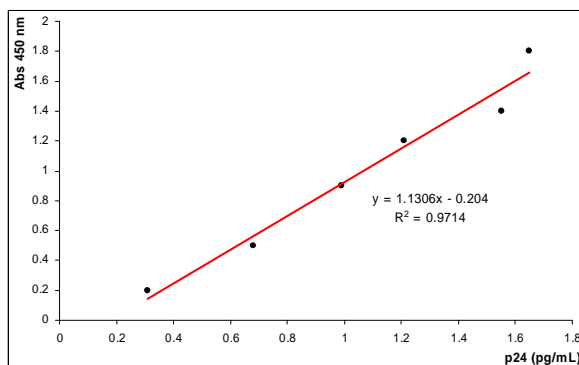


Figura 2.7 – Curva de calibração validada da proteína p24

Os resultados obtidos, em termos de valores de p24, encontram-se resumidos na tabela seguinte. Como termo de comparação, e porque estas amostras foram testadas no mesmo ensaio, foram também incluídos os valores obtidos para os extractos brutos analisados na secção 2.2.2.1..

<b>Amostra</b>	<b>Espécie</b>	<b>p24 (pg/mL)</b>
Controlo +	n.a.	1,99
Controlo -	n.a.	0,10
B161 (EB)	<i>Erylus discophorus</i>	0,28
B358 (EB)	<i>Erylus discophorus</i>	0,29
B437 (EB)	<i>Erylus discophorus</i>	0,22
Fe04/01 (EB)	<i>Erylus discophorus</i>	0,20
B22(I)	<i>Myriastran anancora</i>	1,34
B22(II)		1,31
B22(III)		1,56
B22(IV)		2,04
B33(I)	<i>Cliona celata</i>	1,85
B33(II)		1,90
B33(III)		1,89
B124(I)	<i>Cliona celata</i>	1,98
B124(II)		1,87
B124(III)		1,44
B124(IV)		1,99
B161(I)	<i>Erylus discophorus</i>	0,47
B161(II)		0,20
B161(III)		1,08
B161(IV)		0,37
B206(I)	<i>Erylus discophorus</i>	0,21
B206(II)		0,73
B206(III)		0,85
B206(IV)		0,94
B294(I)	<i>Erylus discophorus</i>	0,95
B294(II)		0,93
B294(III)		0,54
B294(IV)		1,34

Tabela 2.5 - Determinação da actividade anti-VIH dos precipitados glicídicos;

n.a. – não se aplica; EB – Extracto Bruto; I, II, III e IV referem-se aos precipitados glicídicos extraídos pelo respectivo método

Com base nestes resultados construiu-se o seguinte gráfico, visualmente mais explícito:

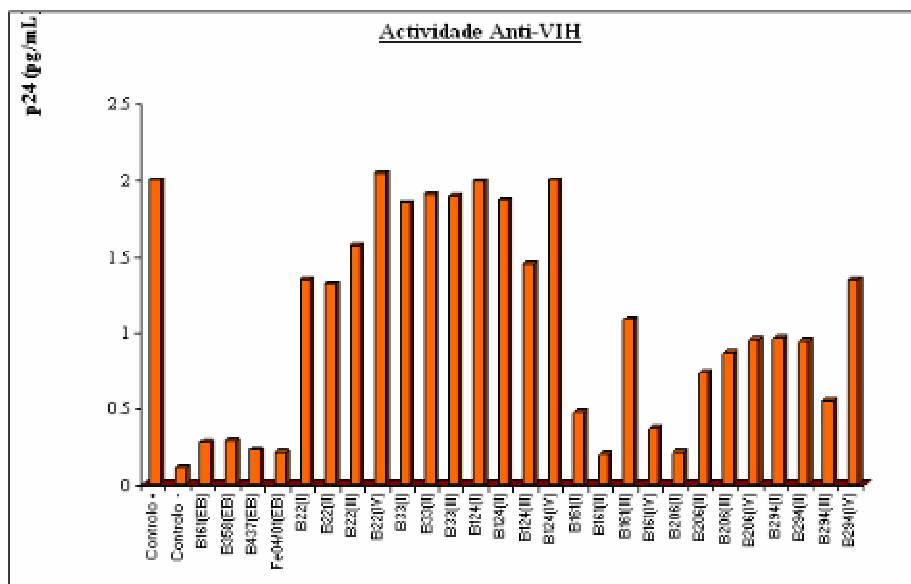


Figura 2.8 – Representação gráfica dos resultados obtidos para a determinação da actividade anti-VIH dos precipitados glicídicos

Lembre-se que a maior inibição viral corresponde aos valores mais baixos de concentração de p24, portanto a inibição mais forte corresponde às barras mais pequenas do gráfico. As amostras que demonstraram possuir maior actividade de inibição de replicação do VIH foram os extractos brutos e os precipitados glicídicos B161(I), B161(II), B161(IV) e B206(I).

Considerando a amostra B161, a extracção glicídica que origina o precipitado com maior actividade de inibição é a realizada pelo método II, seguida pelo método IV e método I. O método de extracção III levou à obtenção de um precipitado que perdeu grande parte da sua actividade de inibição. A principal diferença entre os métodos de extracção glicídica III e IV é a existência, no método IV, de um passo de desnaturação da papaína por ebulição a 100°C da mistura e um passo de remoção de ácido nucleicos através da incubação da mistura com DNase. No entanto, não se sabe se estes passos serão os responsáveis pela manutenção da actividade. Uma vez que todos os métodos de extracção glicídica incluem passos em que a amostra é submetida a temperaturas elevadas (60 e 100°C), põe-se em causa a real influência da temperatura durante as separações cromatográficas na perda de actividade das fracções recolhidas. Por esta

razão, as cromatografias realizadas ao precipitado glicídico não foram feitas sob refrigeração do sistema.

Dos quatro precipitados glicídicos obtidos para a amostra B161, apenas o precipitado IV foi escolhido para prosseguir o fraccionamento no sentido de obter uma molécula tão pura quanto possível. Esta escolha baseou-se em vários critérios:

1) o método de extracção I foi descartado porque consiste basicamente numa precipitação etanólica do extracto bruto e, portanto, não adicionará, em termos de fraccionamento, grandes vantagens em relação à precipitação etanólica estudada na secção 2.2.2.2., realizada de acordo com o método descrito em 2.2.1.5.c);

2) o método II, embora resulte no precipitado com maior actividade anti-VIH, não possui um passo de remoção de proteínas, essencial para esclarecer se a molécula bioactiva será essencialmente glicídica ou proteica;

3) o método III resultou num precipitado cuja actividade inibidora era pouco satisfatória.

Foi, assim, escolhido o precipitado obtido pelo método de extracção IV, uma vez que é o método que possui maior número de passos de fraccionamento, mantendo a sua actividade biológica. As posteriores tentativas de separação cromatográfica desta amostra estão discutidas adiante, na secção 2.2.2.4.d).

#### **2.2.2.4. Separações Cromatográficas**

##### **a) Fraccionamento do sobrenadante após precipitação salina**

Em trabalhos anteriores, observou-se que, após a precipitação do extracto bruto com sulfato de amónio a 70%, a actividade anti-VIH se mantinha exclusivamente no sobrenadante, enquanto que se se aumentasse a concentração de sal, esta actividade encontrava-se particionada entre precipitado e sobrenadante (Duarte 2002). Daí que tenha sido esta a percentagem de saturação de sal escolhida para o ensaio de precipitação salina. A separação cromatográfica do sobrenadante obtido no ponto 2.2.1.5.a) na coluna de filtração em gel Superose 6 deu origem ao seguinte cromatograma:

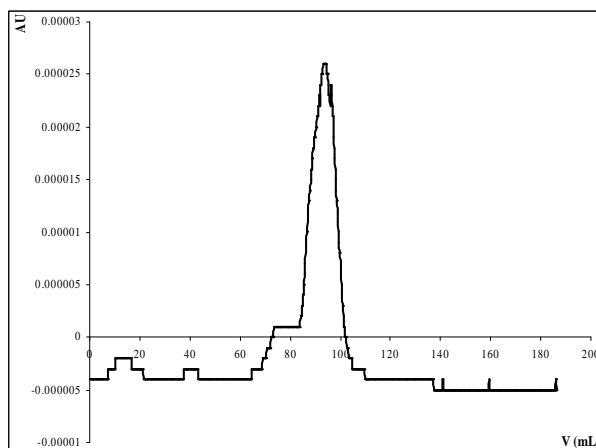


Figura 2.9 – Cromatograma do sobrenadante obtido após precipitação salina na matriz Superose 6; injeção de 2 mL de amostra; eluente: solução-tampão fosfatos 50 mM pH 7,0; fluxo 1 mL/min; recolhidas fracções de 2 mL

As fracções correspondentes a cada um dos picos cromatográficos foram juntas e determinou-se o seu conteúdo proteico e glicídico e testou-se a sua actividade anti-VIH. A seguinte tabela resume os resultados obtidos:

Amostra	Intervalo de eluição (mL)	Proteína (µg/mL)	Glicídios Totais (µg/mL)	Actividade anti-VIH
B161/EB	Não se aplica	332	1270	++
B161 sob SA	Não se aplica	121	640	n.d.
Pico 1	[8;20]	2,1	0	-
Pico 2	[34;36]	5,8	0,45	-
Pico 3	[38;44]	2,5	1,57	-
Pico 4	[68;80]	9,1	7,76	-
Pico 5	[86;100]	0	29,60	-

Tabela 2.6 - Resumo dos resultados obtidos para as amostras da cromatografia B161 sob SA na matriz Superose 6; n.d. - não determinado

No cromatograma apresentado, não é visível a separação entre os picos 2 e 3 devido à baixa resolução a valores de absorvância tão pequenos. No entanto, este facto não é relevante face aos resultados obtidos. A precipitação do extracto bruto (B161/EB) com sulfato de amónio foi eficiente na remoção de cerca de 64% das proteínas e 50% dos glicídios. Existe alguma discrepância entre a quantidade de proteína e glicídios existentes na amostra injectada e aquela existente nas fracções recolhidas que se deve a eventuais perdas e também à propagação de erros inerentes aos ensaios colorimétricos.

A actividade de inibição do VIH não foi determinada para o sobrenadante B161 sob SA pois as elevadas concentrações de sal, que levam à morte das células, inviabilizam o ensaio. Nenhuma das fracções recolhidas manteve a actividade anti-VIH existente no extracto bruto. Esta perda de actividade pode ter ocorrido durante o passo de precipitação salina, tendo ficado a molécula responsável por esta actividade retida no precipitado em vez de no sobrenadante, contrariando assim os resultados obtidos anteriormente. Pode ainda estar presente um problema de concentração, visto que a cromatografia leva à diluição da amostra injectada. Para além disso, e uma vez que se desconhece a natureza química da molécula em estudo, pode também ter ocorrido a sua desnaturação quer devido às elevadas concentrações de sal quer devido ao aumento da temperatura durante a cromatografia.

Para ultrapassar o problema da concentração foi introduzido o passo de concentração de amostras por ultra-filtração; para garantir a estabilidade da molécula, as cromatografias foram realizadas, sempre que possível, com o sistema cromatográfico totalmente refrigerado.

Seguidamente, numa tentativa de dessalinizar e fraccionar o sobrenadante salino, injectou-se a amostra numa coluna de interacção hidrofóbica, obtendo-se o seguinte cromatograma:

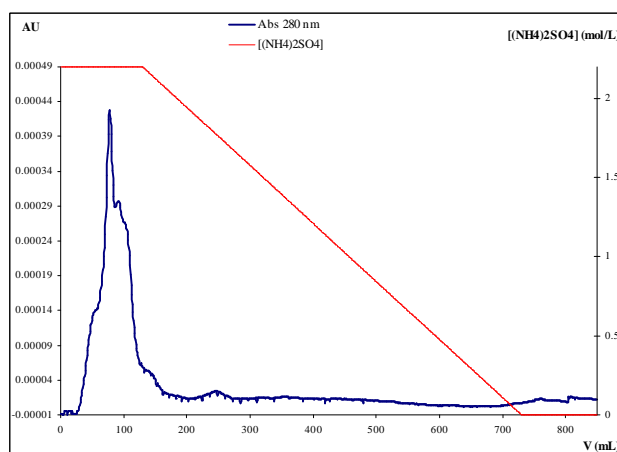


Figura 2.10 – Cromatograma do sobrenadante obtido após precipitação salina na matriz Phenyl Sepharose; injeção de 10 mL de amostra; eluente: solução-tampão fosfatos 50 mM pH 7,0; Gradiente decrescente de 600 mL de 2,2 a 0 M de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; fluxo 5 mL/min



Como se pode observar pelo cromatograma, esta tentativa de separação demonstrou não ser eficiente como passo de purificação. Existe um pequeno pico por volta dos 250 mL de eluição mas a sua absorvância a 280 nm é extremamente baixa e pode até constituir um artefacto. Para além disso, toda a amostra é eluída a elevadas concentrações salinas, o que significa que também não será uma alternativa para a remoção do sal. No entanto, podemos especular quanto à hidrofobicidade das moléculas presentes no sobrenadante salino. Uma vez que todas as moléculas existentes na amostra injectada foram eluídas antes do início do gradiente, podemos afirmar que estas serão moléculas altamente hidrofílicas. Contudo, não podemos estender esta observação à molécula com actividade anti-VIH pois não foi possível determinar a sua presença (ou não) no sobrenadante salino. Para podermos esclarecer esta dúvida, teríamos que testar o sobrenadante quanto à sua actividade anti-VIH e, por isso, foi feita a diálise descrita no passo 2.2.1.5.b). No final dos passos descritos, a amostra ainda apresentava algum sal e, como tal, foi injectada na coluna de filtração em gel S-300 numa tentativa de dessalinização. O cromatograma obtido foi o seguinte:

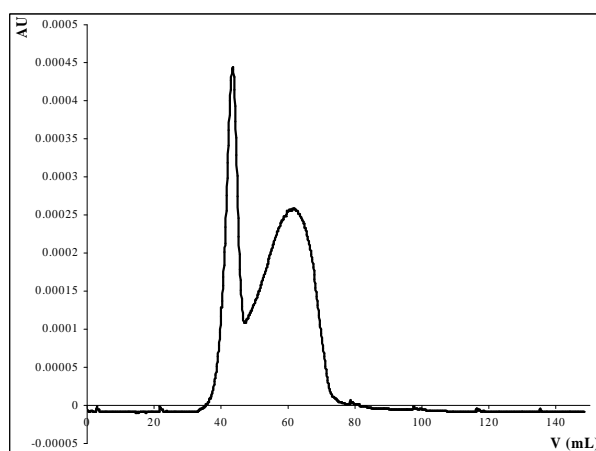


Figura 2.11 – Cromatograma do sobrenadante dialisado na matriz S-300; injeção de 2 mL de amostra; eluente: água MilliQ; fluxo 0,5 mL/min; recolhidas fracções de 2,5 mL

Após concentração por ultra-filtração, as fracções recolhidas correspondentes a cada um dos picos ainda apresentavam ainda algum sal. Foi possível realizar o teste de actividade anti-VIH, houve manutenção da viabilidade celular mas nenhuma das amostras revelou manter a actividade de inibição. Decidiu-se eliminar o passo de precipitação salina do protocolo de purificação uma vez que, além de adicionar uma

série de interferências, a dessalinação é problemática e nenhuma das amostras revelou manter a actividade de inibição do VIH. Contudo, não se descartou a hipótese da influência da temperatura na perda da actividade anti-VIH, uma vez que nenhuma destas cromatografias foi realizada sob refrigeração.

b) Fraccionamento do extracto bruto

Abandonado o ensaio de precipitação salina como primeiro passo de fraccionamento, colocou-se a hipótese de conseguir uma primeira separação numa cromatografia de filtração em gel. Se obtivéssemos uma fracção com actividade anti-VIH, mesmo que não totalmente pura, teríamos também a indicação da sua massa molecular aproximada por extrapolação na curva de calibração da coluna determinada anteriormente (ver Anexo I-C)). A cromatografia do extracto bruto B161/EB na coluna de filtração em gel Superose 6 deu origem ao seguinte cromatograma:

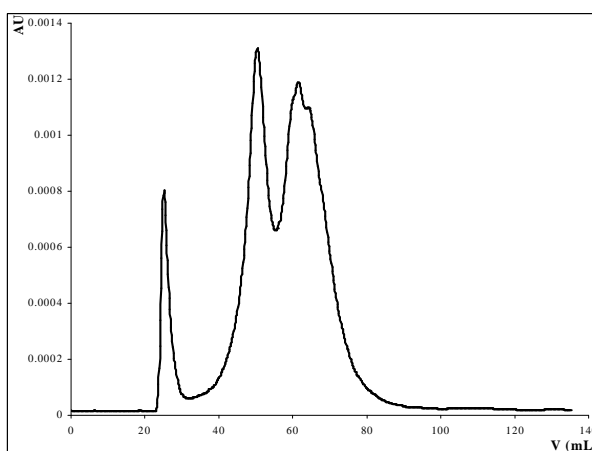


Figura 2.12 – Cromatograma do extracto bruto B161/EB na matriz Superose 6; injeção de 1 mL de amostra; eluente: solução-tampão fosfatos 50 mM pH 7,0; fluxo 1 mL/min; recolhidas fracções correspondentes a cada um dos picos

Foram recolhidas as fracções correspondentes a cada um dos três picos principais e determinou-se o seu conteúdo glicídico e proteico e testou-se a actividade anti-VIH. Os resultados encontram-se resumidos na tabela seguinte:

<b>Amostra</b>	<b>Intervalo de eluição (mL)</b>	<b>Proteína (µg/mL)</b>	<b>Glicídios Totais (µg/mL)</b>	<b>Anti-VIH</b>
Pico 1	[24;28]	32,5	34,3	-
Pico 2	[40;54]	42,1	22,3	-
Pico 3	[56;82]	0	24,1	-

Tabela 2.7 - Resumo dos resultados obtidos para as amostras da cromatografia B161/EB na matriz Superose 6

Mais uma vez não foi possível obter uma fracção que tenha mantido a actividade de inibição viral. No entanto, os factores concentração das fracções e temperatura são dois factores a ter em conta. É curioso também reparar que não é possível estabelecer qualquer paralelo entre este cromatograma e o da figura 2.9 no sentido de determinar quais os picos que “desaparecem” com o passo de precipitação salina.

Nos resultados obtidos até agora, foram identificados dois factores que poderiam ser os responsáveis pela não manutenção da actividade de inibição do VIH: a temperatura e a concentração. Por isso, uma vez que havia a necessidade de obter amostras tão concentradas quanto possível, decidiu-se concentrar a amostra inicial antes de a injectar na coluna de cromatografia. Teve-se também o cuidado de manter, sempre que possível, o sistema refrigerado, a 4°C, durante toda a separação cromatográfica. Amostras e fracções recolhidas foram sempre mantidas em banho de gelo e, após a sua análise, foram armazenadas a -80°C.

O extracto bruto, concentrado por ultra-filtração como descrito no passo 2.2.1.4. e designado por B161/EB conc, foi sujeito a uma cromatografia de troca iónica na matriz MonoQ e obteve-se o seguinte cromatograma:

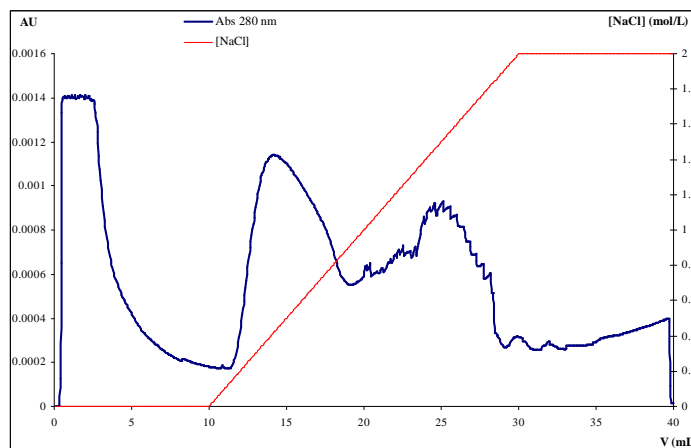


Figura 2.13 – Cromatograma do extracto bruto concentrado na matriz MonoQ; injeção de 2 mL de amostra; eluente: solução-tampão Bis-Tris Propano 20 mM pH 7,0; Gradiente crescente de 20 mL de 0 a 2 M de NaCl; fluxo 0,5 mL/min; Coluna não refrigerada; recolhidas fracções de 5 mL.

O primeiro pico cromatográfico eluído no volume de 0 a 5 mL é devido a saturação da coluna e não foi considerado. Os outros dois picos, correspondentes aos intervalos de eluição [10;20] e [20;30] mL, foram submetidos a testes anti-VIH antes e depois de concentrados mas nenhum deles revelou manter a actividade. Uma vez que as fracções foram concentradas antes de serem testadas, o problema de concentração foi descartado. No entanto, mantém-se a dúvida quanto à influência da temperatura, uma vez que esta coluna não permite a sua refrigeração.

A terceira tentativa de fraccionamento do extracto bruto consistiu em injectar a amostra, depois de concentrada, na coluna de filtração em gel S-300 por esta ser maior e, teoricamente, permitir uma melhor separação. Uma vez que já se sabia, de trabalhos anteriores, que esta esponja possui um enzima com actividade de iodoperoxidase, seguiu-se também esta actividade nas fracções recolhidas após concentração. O seguimento desta actividade enzimática teve dois intuitos: por um lado, esclarecer se este enzima poderia também ser responsável pela actividade anti-VIH; se se revelasse que estas duas actividades são independentes, conseguir obtê-las em picos cromatográficos diferentes seria indicativo de um bom fraccionamento. Obteve-se o seguinte cromatograma:

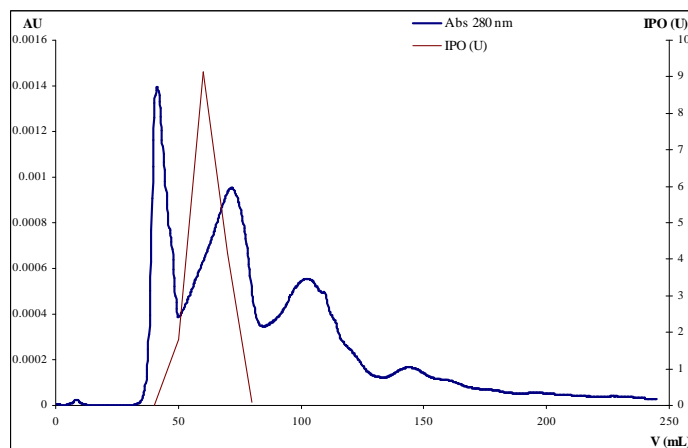


Figura 2.14 – Cromatograma do extracto bruto concentrado B161/EB conc. na matriz S-300; injeção de 5 mL de amostra; eluente: solução-tampão fosfatos 50 mM pH 7,0; fluxo 0,5 mL/min; recolhidas fracções de 10 mL a partir dos 40 mL de volume eluído; coluna e colector de fracções refrigerados.

As fracções 1 a 5, correspondentes aos dois picos cromatográficos de maior absorvância eluídos no intervalo de 40 a 90 mL, foram concentradas e testadas quanto à actividade de inibição viral e actividade como iodoperoxidase. Os resultados obtidos encontram-se resumidos na seguinte tabela:

Amostra	V inicial <sup>(a)</sup> (mL)	V final <sup>(b)</sup> (mL)	Anti-VIH	IPO (U/mL)
Fracção 1	10	1,8	+	1,00
Fracção 2	10	2,0	+	4,56
Fracção 3	10	1,5	+	2,77
Fracção 4	10	1,4	+	0,07
Fracção 5	10	1,3	-	0

Tabela 2.8 - Resumo dos resultados obtidos para as amostras da cromatografia B161/EB conc. na coluna S-300;

(<sup>a</sup>) volume antes da concentração, (<sup>b</sup>) volume após concentração.

Esta foi a primeira separação cromatográfica que permitiu obter fracções biologicamente activas contra o VIH. Os resultados obtidos apontam para a concomitância das duas actividades biológicas mas requerem confirmação. Por extrapolação na curva de calibração obtida para esta coluna (ver Anexo I-B), tendo em conta o seu intervalo de eluição, podemos dizer que estas moléculas possuem uma massa molecular entre 600 e 2000 kDa.

Para esclarecer se, de facto, a mesma molécula seria responsável por ambas as bioactividades, decidiu-se explorar as características iónicas das moléculas presentes no extracto bruto. Depois de concentrado, o extracto bruto foi injectado na coluna DEAE, tendo-se obtido o seguinte cromatograma:

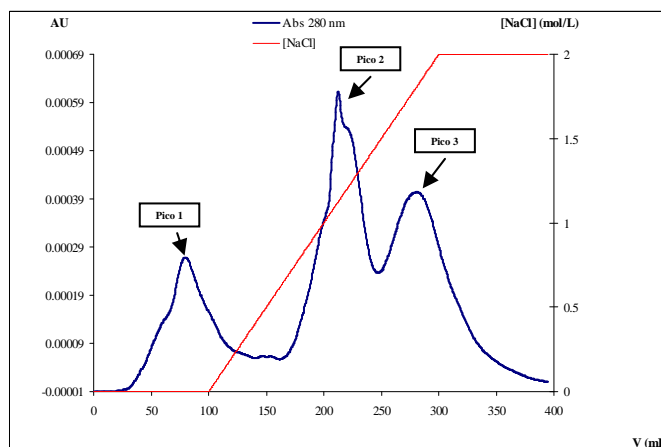


Figura 2.15 – Cromatograma do extracto bruto concentrado na matriz DEAE; injeção de 5 mL de amostra; eluente: solução-tampão fosfatos 50 mM pH 7,0; Gradiente crescente de 200 mL de 0 a 2 M de NaCl; fluxo 2,5 mL/min; recolhidas fracções de 5 mL até ao início do gradiente e de 10 mL daí em diante; Coluna e colector refrigerados.

Todas as fracções recolhidas foram testadas quanto à sua actividade anti-VIH mas nenhuma delas se revelou positiva. As fracções correspondentes a cada um dos três picos cromatográficos foram juntas e concentradas e novamente testadas contra o VIH. Seguiu-se também a actividade como iodoperoxidase, por forma a esclarecer a concomitância de ambas as actividades. A tabela seguinte resume os resultados obtidos:

Amostra	Intervalo de eluição (mL)	V inicial <sup>(a)</sup> (mL)	V final <sup>(b)</sup> (mL)	Anti-VIH	IPO (U/mL)
Pico 1	[40;120]	80	1,1	-	0
Pico 2	[170;240]	70	3,0	-	5,86
Pico 3	[250;330]	80	2,0	+	2,31

Tabela 2.9 - Resumo dos resultados obtidos para as amostras da cromatografia B161/EB conc. na matriz DEAE;

<sup>(a)</sup> volume antes da concentração, <sup>(b)</sup> volume após concentração.

Esta cromatografia revelou ser um bom passo de purificação na medida em que conseguimos obter três picos cromatográficos relativamente bem definidos, tendo-se mantido ambas as actividades biológicas. A observação de que a actividade anti-VIH só se tenha manifestado após a concentração das fracções revela que o factor concentração é crucial na determinação desta actividade. Nesta cromatografia volta a haver sobreposição da actividade anti-VIH com a de iodoperoxidase no terceiro pico cromatográfico. No entanto, a existência de alguma actividade enzimática no pico 3 pode apenas ser devido ao facto de os picos 2 e 3 não estarem bem separados, já que a actividade enzimática é maior no pico 2. Uma vez que esta separação cromatográfica se baseia na carga iónica das moléculas, podemos especular quanto à carga iónica das moléculas eluídas em cada um dos picos. O pico 1 foi eluído antes do início do gradiente salino e portanto é, provavelmente, constituído por moléculas catiónicas, uma vez que a matriz DEAE é um trocador de aniões. Os picos 2 e 3 possuem moléculas aniónicas, sendo que a carga negativa do pico 3 é superior à do pico 2. Assim, ambas as moléculas, tanto a que possui actividade anti-VIH como o enzima iodoperoxidase, são moléculas aniónicas.

Estas três amostras foram estudadas por SDS-PAGE não-desnaturante, tendo-se obtido os seguintes géis:

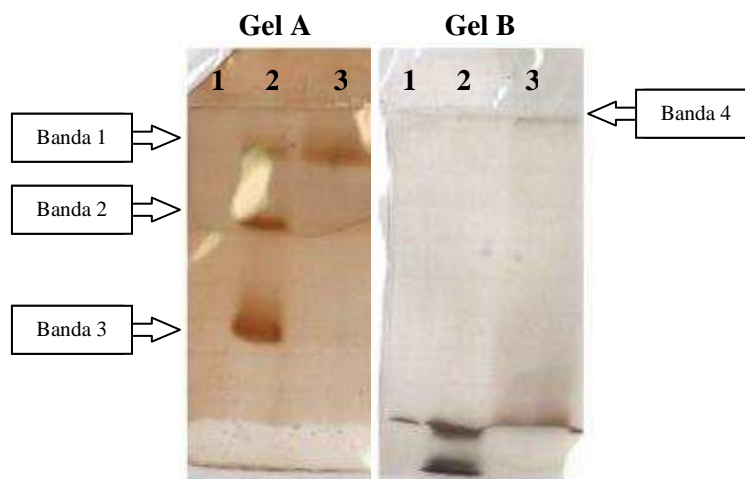


Figura 2.16 – SDS-PAGE não-desnaturante dos picos recolhidos na cromatografia do B161/EB conc. na matriz DEAE, após concentração; gel de composição 7,5%T e 0,75 mm de espessura;

Gel A corado para actividade de IPO pelo método da *ortho*-dianisidina,

Gel B corado para proteína pelo método do nitrato de prata;

Em ambos os géis, o número do poço corresponde ao número do pico cromatográfico.

A existência de 3 bandas com actividade de iodoperoxidase no poço 2 do gel A deve-se provavelmente a alguma desnaturação que ocorreu durante a preparação das amostras para aplicação no gel, que terá levado à perda da estrutura quaternária do enzima cujas subunidades se terão separado, mantendo, no entanto, a sua actividade enzimática. A banda de maior massa molecular – Fig. 2.16 Banda 1 - corresponderá ao enzima integral, uma vez que já tínhamos visto, na cromatografia de filtração em gel (Fig. 2.14), que este enzima possui uma elevada massa molecular. As outras duas bandas – Fig. 2.16 Bandas 2 e 3 -, de massa molecular inferior, corresponderão a duas subunidades com massas moleculares diferentes ou a agregados de mais que uma subunidade – Fig. 2.16 Banda 2. No poço 3, confirma-se a existência de actividade como iodoperoxidase no pico 3 determinada no ensaio enzimático, encontrando-se a banda 1 mais intensa e as outras duas muito ténues. No gel B, corado para a detecção de proteínas, não é possível encontrar correspondência às bandas de iodoperoxidase que se observam no gel A. Pensa-se que isto se pode dever ao facto de este enzima possuir um ‘turnover’ muito elevado que, mesmo presente em quantidades abaixo do limite de detecção do método de coloração para proteína, possua uma actividade enzimática muito elevada. No poço 3 do gel B observa-se a presença de uma banda de elevada massa molecular – Fig. 2.16 Banda 4 – que não tem correspondência no poço 3 do gel A e que pode ser a molécula com actividade anti-VIH, uma vez que já tínhamos determinado por cromatografia de filtração em gel (Fig. 2.14) que esta molécula possui também uma elevada massa molecular.

c) Estudo da influência da solução-tampão na separação cromatográfica

Uma vez que a cromatografia de troca iónica demonstrou constituir um passo de fraccionamento bastante satisfatório, tentou-se otimizar esta cromatografia aplicando o extracto bruto em vários tipos de cromatografia de troca iónica (catiónica e aniónica, forte e fraca). No entanto, apenas a DEAE revelou uma boa capacidade de resolução cromatográfica e, por isso, esses cromatogramas não serão aqui apresentados. Decidiu-se, então, otimizar a cromatografia na matriz DEAE estudando a influência do tipo e pH da solução-tampão de eluição. Nas haloperoxidasas de vanádio, este elemento encontra-se no centro activo sob a forma de vanadato, numa geometria tetraédrica. Sabe-se que iões com o mesmo tipo de estrutura que o vanadato (como fosfatos e sulfatos) são capazes de substituir o vanadato no centro activo do enzima levando à



perda da sua actividade (Tanaka e Wever 2004). Por esta razão, evitou-se o uso de tampões que tivessem na sua composição iões como sulfato e fosfato. Para pH 7,0 optou-se pela solução-tampão Bis-Tris Propano, para pH 6,0 usou-se a solução-tampão Bis-Tris e para pH 5,0 usou-se a solução-tampão piperazina. Estudou-se também qual a amostra a ser injectada na coluna de cromatografia, de modo a obter-se uma melhor separação: extracto bruto concentrado ou precipitado etanólico. Estes ensaios foram realizados em mini-coluna DEAE; a coluna não foi refrigerada nem se recolheram fracções, uma vez que o intuito era unicamente de optimização da separação. Obtiveram-se os seguintes cromatogramas:

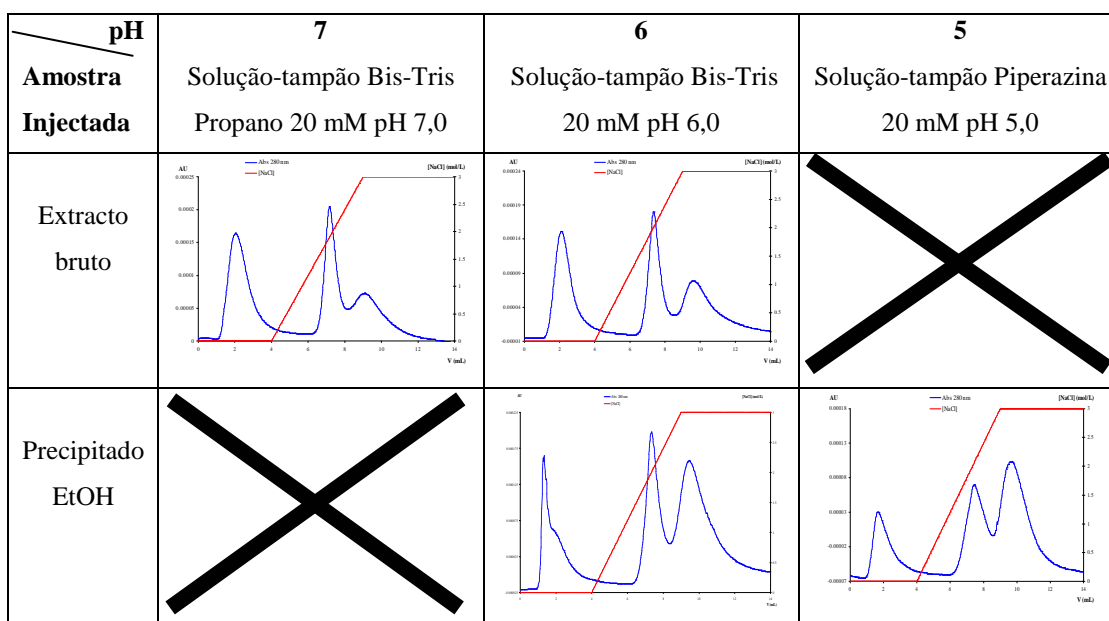


Figura 2.17 – Estudo do pH e amostra injectada na separação cromatográfica em mini-coluna DEAE; injeção de 50  $\mu$ L de amostra, gradiente crescente de 5 mL de 0 a 3 M de NaCl, fluxo 1 mL/min;

Observando os cromatogramas obtidos, determinou-se que as condições mais favoráveis à separação cromatográfica, em termos de resolução e recuperação dos picos eluídos, consistiam na injeção do precipitado etanólico e a sua eluição com solução-tampão Bis-Tris 20 mM pH 6,0. Assim, foram estas as condições escolhidas para a separação cromatográfica do precipitado etanólico na coluna DEAE preparativa de 75 mL. Esta cromatografia teve por objectivo a separação e recolha de fracções bioactivas e esclarecer quanto à concomitância das duas actividades biológicas. Obteve-se o seguinte cromatograma:

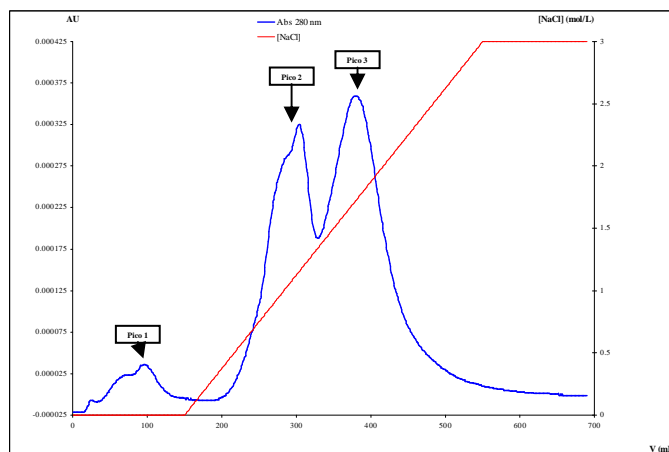


Figura 2.18 – Cromatograma do precipitado etanólico na matriz DEAE; injeção de 5 mL de amostra; eluente: solução-tampão Bis-Tris 20 mM pH 6,0; Gradiente crescente de 400 mL de 0 a 3 M de NaCl; fluxo 2,5 mL/min; recolhidas fracções de 10 mL; coluna e colectador refrigerados.

Foram recolhidas 49 fracções cromatográficas de 10 mL, nas quais foram doseados proteína e glícidos e determinou-se a sua actividade como iodoperoxidase. Os resultados encontram-se resumidos na seguinte tabela:

<b>Amostra</b>	<b>IPO (U)</b>	<b>Proteína (µg)</b>	<b>Glícidos (µg)</b>
Precipitado EtOH	136,04	13896	18365
Fracção 1	0	0	69
Fracção 2	0	4	63
Fracção 3	0	0	49
Fracção 4	0	0	61
Fracção 5	0	0	74
Fracção 6	0	0	60
Fracção 7	0	17	67
Fracção 8	0	21	94
Fracção 9	0	21	113
Fracção 10	0	10	0
Fracção 11	0	0	0
Fracção 12	0	0	0
Fracção 13	0	0	0
Fracção 14	0	0	0
Fracção 15	0	0	0
Fracção 16	0	0	0
Fracção 17	0	7	0
Fracção 18	0	0	0
Fracção 19	0	0	0
Fracção 20	0	0	0
Fracção 21	0	7	0
Fracção 22	0	149	0
Fracção 23	0	264	26
Fracção 24	6,55	452	95
Fracção 25	5,17	733	165

Fracção 26	6,54	997	249
Fracção 27	8,51	1209	424
Fracção 28	32,83	1438	489
Fracção 29	22,34	1540	513
Fracção 30	4,86	1358	582
Fracção 31	11,98	1004	582
Fracção 32	6,78	771	486
Fracção 33	5,79	598	411
Fracção 34	5,50	486	469
Fracção 35	5,29	507	597
Fracção 36	4,36	577	667
Fracção 37	3,25	643	723
Fracção 38	2,04	691	817
Fracção 39	1,28	688	849
Fracção 40	0,91	625	778
Fracção 41	0,67	459	731
Fracção 42	0,53	302	495
Fracção 43	0	170	381
Fracção 44	0	73	272
Fracção 45	0	10	178
Fracção 46	0	0	103
Fracção 47	0	0	61
Fracção 48	0	0	34
Fracção 49	0	0	0
Total das fracções	135,19	15797	11826

Tabela 2.10 - Resumo dos resultados obtidos para doseamento de proteínas, glicídios e actividade de iodoperoxidase das fracções recolhidas na cromatografia representada na figura 2.18; valores em quantidade total em 5 mL de precipitado etanólico e 10 mL de fracção.

Com base nestes resultados é possível construir o perfil de eluição em termos de quantidade de proteína e glicídios:

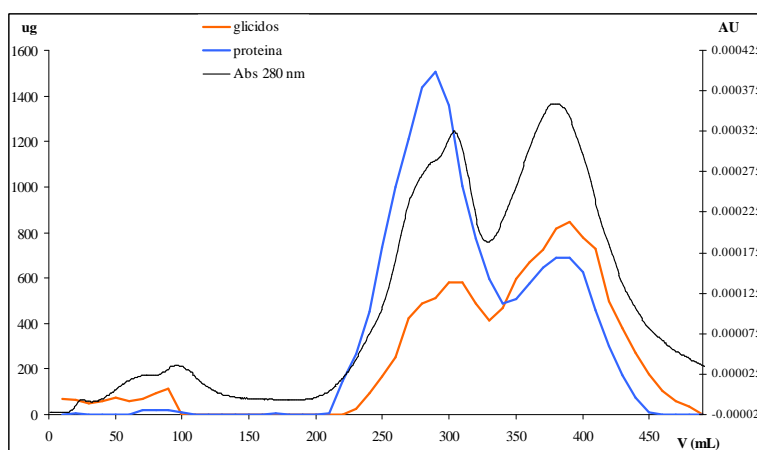


Figura 2.19 – Perfil de eluição da cromatografia graficamente representada na Fig. 2.18 em termos da quantidade de glicídios e proteína presentes em cada uma das fracções recolhidas.

Podemos, ainda, traçar o perfil de eluição em termos da actividade enzimática como iodoperoxidase determinada em cada uma das fracções:

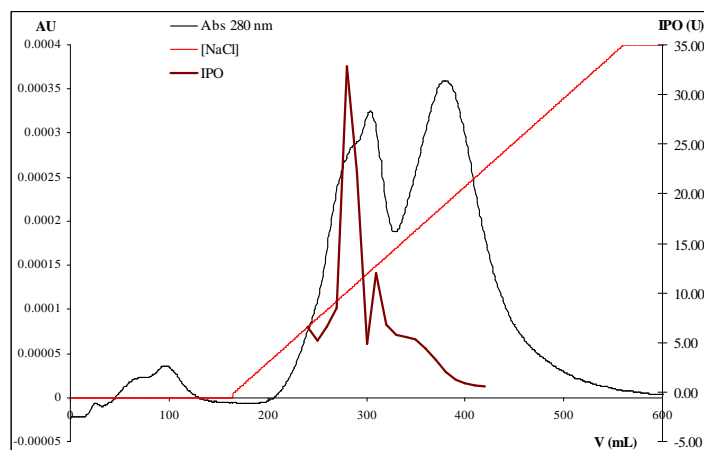


Figura 2.20 - Perfil de eluição da cromatografia graficamente representada na Fig. 2.18 em termos da actividade como iodoperoxidase.

Em relação à actividade enzimática da amostra injectada, observou-se que houve uma perda de 44% da actividade como iodoperoxidase após a descongelação da amostra (lembre-se que logo após a precipitação etanólica, o precipitado possuía 48,4 U/mL; os 5 mL injectados correspondem a 242 U e o valor real de IPO determinado após descongelação foi de 136 U). No entanto, a soma total da actividade como IPO recolhida nas fracções indica que a perda de actividade enzimática durante a cromatografia é mínima. Os cálculos efectuados revelaram que o enzima foi recuperado a 99,4% nesta cromatografia, com um factor de purificação de 15,4.

As quantidades de proteína e glícidos recolhidos nas fracções divergem um pouco dos existentes na amostra injectada, mas há que ter em conta os erros inerentes aos próprios doseamentos. O perfil de eluição em termos de glícidos e proteína é concordante com o perfil cromatográfico seguido através da absorvância a 280 nm, sendo que o pico 2 é essencialmente proteico e o pico 3 possui quantidades equivalentes de glícidos e proteína.

Como se pode observar facilmente na fig. 2.20, a molécula com actividade como iodoperoxidase é eluída no Pico 2, o que está em total concordância com o que tinha sido observado anteriormente na cromatografia apresentada na Fig. 2.15. Observando atentamente o Pico 2, vemos que, a 280 nm, este pico apresenta um ombro, formando

um pico duplo. É interessante observar que a actividade como IPO apresenta o mesmo comportamento, formando dois picos de actividade que correspondem cada um deles a cada um dos ombros que se observa a 280 nm. Estas observações levaram-nos a pensar na possível existência de duas isoformas deste enzima com actividade de iodoperoxidase, uma com maior actividade que a outra. Vemos também na Fig. 2.20 que a actividade de IPO se prolonga um pouco para o Pico 3, mas a maior parte desta actividade centra-se no Pico 2, e este prolongamento dever-se-á apenas ao facto de estes dois picos, picos 2 e 3, não estarem completamente separados.

Cada uma das fracções recolhidas nesta cromatografia foi testada para actividade anti-VIH, mas todas deram resultados negativos. Juntaram-se e concentraram-se as fracções correspondentes a cada um dos picos cromatográficos e testaram-se de novo quanto à sua actividade de inibição viral. Os resultados encontram-se resumidos na seguinte tabela:

<b>Amostra</b>	<b>Fracções</b>	<b>V inicial<sup>(a)</sup> (mL)</b>	<b>V final<sup>(b)</sup> (mL)</b>	<b>Anti-VIH</b>
Pico 1	6 a 12	70	1,6	-
Pico 2	25 a 34	100	4,7	-
Pico 3	35 a 50	160	5,9	+

Tabela 2.11 - Resumo dos resultados obtidos para as fracções recolhidas na cromatografia do precipitado etanólico na matriz DEAE (Fig. 2.18);

<sup>(a)</sup> volume antes da concentração, <sup>(b)</sup> volume após concentração.

Mais uma vez estes resultados confirmam os obtidos anteriormente, sendo que a molécula com actividade anti-VIH foi eluída no pico 3. Estas amostras concentradas correspondentes aos picos cromatográficos 2 e 3 foram estudadas por SDS-PAGE não-desnaturante e os géis, corados para proteína e actividade de IPO, apresentam-se na figura seguinte:

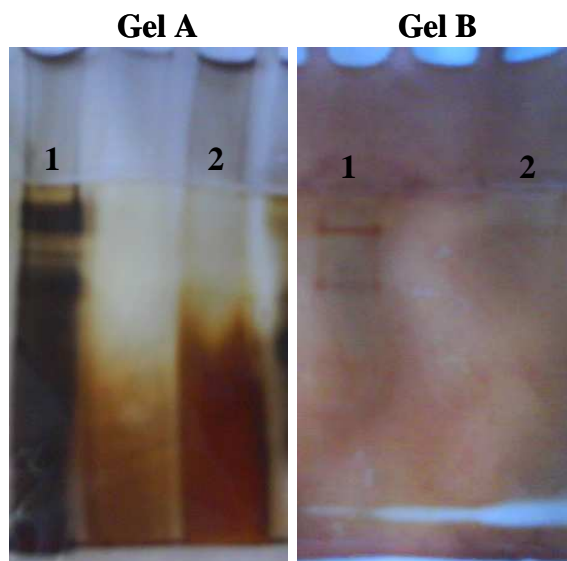


Figura 2.21 - SDS-PAGE não-desnaturante das fracções recolhidas e concentradas correspondentes aos picos cromatográficos eluídos na cromatografia do precipitado etanólico na matriz DEAE (Fig. 2.18); gel de composição 7,5% T e 1,5 mm de espessura;  
Gel A corado para proteína pelo método do nitrato de prata,;  
Gel B corado para actividade de IPO pelo método da *orto*-dianisidina;  
Em ambos os géis: poço 1 – Pico 2, poço 2 – Pico 3.

O gel A, corado para proteína pelo método do nitrato de prata, apresenta arrastamento e bandas pouco definidas. No entanto, no poço 1 correspondente ao pico 2, onde é eluída a molécula com actividade de iodoperoxidase, é possível fazer a correspondência entre as bandas proteicas e as bandas de actividade no poço 1 do gel B. É interessante observar a existência de duas bandas de actividade enzimática que vem confirmar a suspeita da presença de duas isoformas do enzima. No poço 2, não é possível observar nenhuma banda definida, apenas um grande arrastamento, que se deve provavelmente ao elevado conteúdo glicídico presente nesta amostra. No poço 2 do gel B é possível observar uma ténue banda de actividade que se deve à não total separação dos dois picos cromatográficos.

Esta cromatografia consistiu no passo de fraccionamento cromatográfico mais satisfatório obtido ao longo de todo este trabalho e permitiu-nos obter resultados importantes. Primeiro que tudo, nesta separação cromatográfica obtivemos 2 picos importantes, em que num é eluída a molécula com actividade de iodoperoxidase e noutra a molécula com actividade anti-VIH. Isto permitiu-nos esclarecer a dúvida que nos surgiu anteriormente de que a mesma molécula podesse ser responsável por ambas

as actividades, dúvida à qual podemos agora responder que não, as duas actividades biológicas existem em moléculas independentes e possíveis de serem separadas através desta cromatografia de troca aniónica fraca. Podemos também dizer que ambas as moléculas são aniónicas, sendo que a molécula com actividade anti-VIH possui uma carga global mais negativa que a do enzima. O aparecimento de um pico duplo cuja actividade enzimática é perfeitamente correspondente à absorvância a 280 nm leva-nos a pensar que possam existir duas isoformas deste mesmo enzima. No entanto, tal observação requer estudos posteriores que não se incluem no âmbito deste trabalho. Esta cromatografia revelou também ser um bom passo de purificação da haloperoxidase, uma vez que o grau de recuperação da actividade enzimática é excelente (99,4%) com um factor de purificação também bastante elevado (15,4). Por último, esta cromatografia resulta numa fracção activa contra o VIH, resultado que, só por si, já é muito satisfatório e mais uma vez confirma a observação de que a concentração das amostras é um factor crucial na avaliação da actividade de inibição do VIH.

Uma vez que neste trabalho se pretendia essencialmente estudar a molécula com actividade anti-VIH, tentou-se a posterior separação cromatográfica da amostra concentrada do pico 3, com o objectivo de se conseguir isolar, tanto quanto possível, a molécula responsável pela actividade anti-viral. No entanto, nenhuma destas posteriores separações resultou num fraccionamento satisfatório.

#### d) Fraccionamento do precipitado glicídico B161(IV)

O precipitado glicídico B161(IV), obtido através do método de extracção glicídica IV aplicado à esponja B161, foi dissolvido em água MilliQ na proporção de 50 mg/mL. Esta solução foi injectada em várias colunas de cromatografia para estudar qual delas constituiria um passo de purificação eficiente, na medida em que permitisse uma boa separação e mantivesse a actividade anti-VIH. Apenas duas separações cromatográficas se revelaram eficientes em termos de se conseguir algum fraccionamento e apenas numa delas se determinou a manutenção de alguma actividade anti-viral.

A injeção do precipitado glicídico B161(IV) na coluna de filtração em gel Superose 6 deu origem ao seguinte cromatograma:

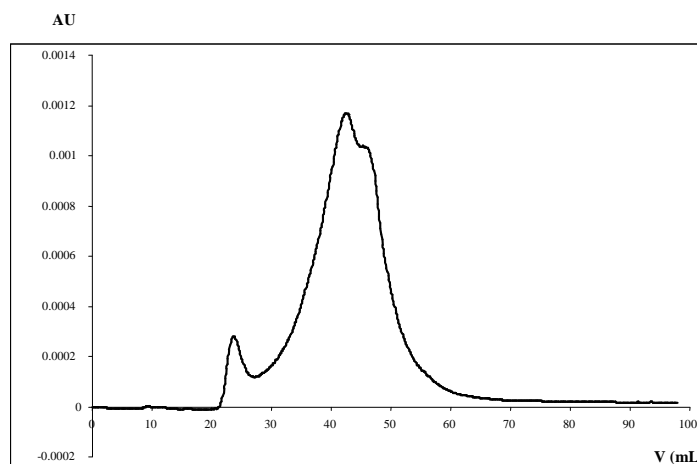


Figura 2.22 - Cromatograma do precipitado glicídico B161(IV) na matriz Superose 6; injeção de 2 mL de amostra; eluente: solução-tampão fosfatos 50 mM pH 7,0; fluxo 0,5 mL/min; recolhidas fracções de 5 mL

Uma vez que o próprio método de extracção glicídica envolve passos de temperatura elevada, pensa-se que a temperatura não será um factor que leve à perda de actividade anti-VIH e, portanto, nestas cromatografias não houve o cuidado de manter o sistema cromatográfico refrigerado. Esta cromatografia permitiu a separação de dois picos, em que o 2º pico parece ser a sobreposição de vários outros picos, que obviamente necessitariam de posterior fraccionamento. Foi determinado o conteúdo proteico e glicídico da amostra e das fracções recolhidas e os resultados apresentam-se, em quantidades totais por 2 mL de precipitado glicídico e 5 mL de fracção, na seguinte tabela:

<b>Amostra</b>	<b>Proteína (µg)</b>	<b>Glicídios (µg)</b>
Precipitado glicídico	6054	n.c.
Fracção 5	171	104
Fracção 6	530	256
Fracção 7	569	924
Fracção 8	1066	2737
Fracção 9	2043	4038
Fracção 10	987	3713
Fracção 11	201	934
Fracção 12	46	332
Fracção 13	16	344
Fracção 14	13	262
Fracção 15	13	238
Total nas fracções	5655	13879

Tabela 2.12 – Quantidades de proteína e glicídios totais na amostra e fracções recolhidas na separação cromatográfica do precipitado glicídico B161(VI) na matriz Superose 6; n.c. – não conclusivo



Não foi possível determinar a concentração de glicídios na amostra inicial uma vez que, para várias diluições da mesma amostra, os valores obtidos eram extremamente discrepantes. A quantidade de proteína total recolhida nas fracções é concordante com o valor inicial determinado na amostra injectada. A quantidade total de glicídios calculada através da soma das quantidades existentes em cada uma das fracções, é cerca de 2,5 vezes superior à quantidade de proteína.

A partir dos dados constantes na tabela 2.12, construiu-se um perfil de eluição em termos de quantidade de proteína e de glicídios que se apresenta na seguinte figura:

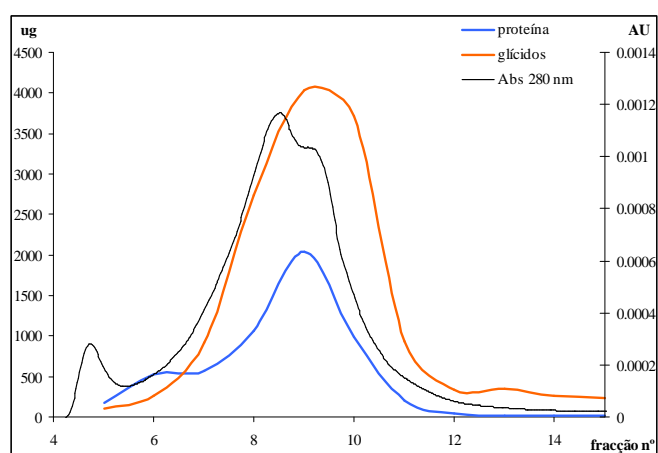


Figura 2.23 – Perfil de eluição da cromatografia graficamente representada na Fig. 2.22 em termos da quantidade de glicídios e proteína presentes em cada uma das fracções recolhidas.

A presença de proteína nas fracções recolhidas bem como no próprio precipitado glicídico indica que o método de extracção glicídica não remove totalmente as proteínas. Por razões de ordem logística, não foi possível testar nenhuma das fracções recolhidas quanto à sua actividade anti-VIH. No entanto, este perfil de eluição leva-nos a crer que, caso a molécula com actividade anti-VIH seja eluída no 2º pico, ela poderá ser de natureza glicoproteica. Uma forma de esclarecer esta dúvida pode passar por melhorar a eficiência do passo de remoção de proteínas do método de extracção glicídica IV, aumentando o tempo de incubação com papaína, e testando se a actividade anti-VIH se mantém ou não, ou tentar remover a proteína da fracção cromatográfica e testar a sua actividade.

Com o objectivo de conseguir purificar uma maior quantidade de amostra, essencial para que os testes anti-VIH sejam exequíveis e válidos, tentou-se separar o

precipitado glicídico B161(IV) numa outra coluna de filtração em gel – Sephacryl S-300 - mas de maior tamanho, o que permite a injeção de maior quantidade de amostra e uma separação mais eficiente. Obteve-se o seguinte cromatograma

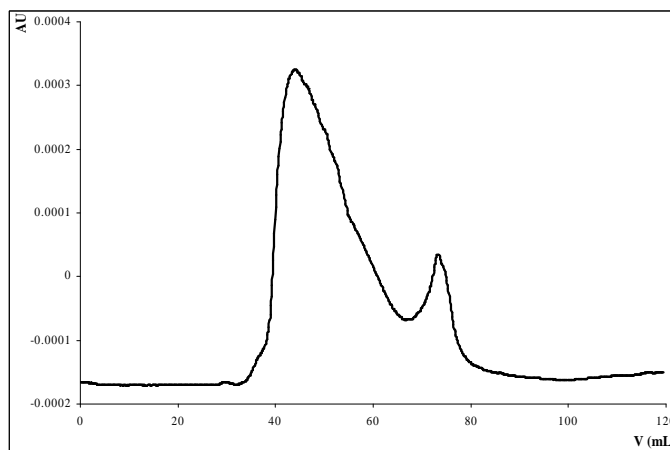


Figura 2.24 - Cromatograma do precipitado glicídico B161(IV) na matriz S-300; injeção de 2 mL de amostra; eluente: água MilliQ; fluxo 0,5 mL/min; recolhidas fracções de 5 mL

As fracções correspondentes a cada um dos picos cromatográficos foram juntas e concentradas e testadas quanto à sua actividade anti-VIH. As fracções correspondentes ao primeiro pico, eluído no intervalo de 40 a 70 mL, demonstraram possuir uma actividade de inibição viral muito modesta. No entanto, por extrapolação na curva de calibração anteriormente determinada para esta coluna (ver Anexo I-B), e sabendo que o máximo de absorvância do 1º pico ocorre a cerca de 45 mL de eluição, ficámos a saber que a molécula com actividade anti-VIH possui uma massa molecular superior a 2000 kDa.

Nenhuma das amostras provenientes do precipitado glicídico (IV), quer o próprio precipitado quer as fracções cromatográficas, se revelaram passíveis de serem estudadas por PAGE, levando à obtenção de arrastamentos em vez de bandas definidas, devido, provavelmente, à elevada concentração glicídica.

O facto de após todas estas tentativas de fraccionamento nunca termos conseguido efectivamente isolar a molécula com actividade anti-VIH, quer por se obterem fracas separações quer por perda de actividade, levaram-nos a desistir do prosseguimento deste trabalho. Em todas as separações cromatográficas, mesmo aquelas

em que se conseguiram recuperar fracções bioactivas contra o VIH, houve perda considerável desta actividade. As razões que podemos apontar para este facto são várias. Em primeiro lugar, podemos estar perante um mero problema de concentração, em que esta molécula se encontra no extracto em quantidades tão pequenas que, após o fraccionamento, há uma diluição da actividade. No entanto, as fracções recolhidas foram sempre tão concentradas quanto possível, chegando-se mesmo a juntar fracções recolhidas de várias cromatografias feitas sob as mesmas condições, não se tendo obtido uma maior actividade. A segunda hipótese para explicar esta perda de actividade pode prender-se com a existência de duas ou mais moléculas que actuam sinergisticamente, resultando numa potente actividade de inibição viral. Após o seu fraccionamento, deixa de existir esta acção sinérgica e, embora exista alguma actividade, ela não é tão potente como era inicialmente.

A última proposta que pode explicar esta perda consistente de actividade relaciona-se com um factor de impedimento estereoquímico. As esgonjas marinhas possuem moléculas glicídicas, designadas por gliconectinas, de elevada massa molecular – na ordem dos 200000 kDa – que são utilizadas pela esgonja como moléculas de reconhecimento e adesão, através das quais as células do animal distinguem o material alogénico do material xenogénico (Misevic, Ripoll et al. 2007). Estas moléculas constituirão, portanto, uma espécie de anticorpos das esgonjas. A elevada massa molecular destas gliconectinas e, conseqüentemente, o seu tamanho, aliada a uma elevada concentração destas moléculas no extracto bruto, pode simplesmente formar uma “nuvem” em redor do linfócito e bloquear o acesso do vírus aos seus receptores, provocando a actividade de inibição observada. Estaremos, então, perante uma actividade de inibição viral inespecífica, causada simplesmente pelo impedimento de acesso do vírus aos receptores da célula-alvo, devido à elevada massa molecular destas moléculas glicídicas. A diluição da amostra inerente ao seu fraccionamento, leva a que a concentração destas moléculas glicídicas diminua, fazendo com que haja menor impedimento de acesso aos receptores da célula linfocítica, estando esta mais vulnerável ao “ataque” do vírus. Esta hipótese é concordante com os resultados obtidos, na medida em que se determinou que os precipitados glicídicos mantêm actividade, denotando a natureza glicídica (pelo menos parcial) da molécula com actividade de inibição viral e também explica a consistente perda de actividade ao longo das várias tentativas de fraccionamento cromatográfico.

### 2.3. NOTAS CONCLUSIVAS DO CAPÍTULO 2

Actualmente, a infecção por VIH é a mais preocupante epidemia mundial, envolvendo consequências a nível político, social, económico, científico e médico. Necessitam-se urgentemente novos fármacos mais eficazes, que consigam suplantar as resistências adquiridas pelo vírus e que acarretem efeitos secundários menos severos para o doente. Mas acima de tudo, faltam medicamentos cuja acção anti-viral seja definitiva, capaz de erradicar totalmente o vírus do organismo infectado. Neste contexto, a comunidade científica uniu esforços no sentido de pesquisar e desenvolver novos compostos que suprimam a necessidade premente da erradicação desta infecção.

Não raras vezes a Natureza tem servido como origem ou fonte de inspiração para a síntese de novas moléculas que demonstraram possuir propriedades anti-virais extremamente potentes. Com o aparecimento e o acesso a novas tecnologias, a comunidade científica virou-se para o ambiente marinho na procura de compostos bioactivos promissores. Foram encontrados novos organismos, com metabolismos singulares, que permitiram a descoberta de metabolitos que revelaram um potencial farmacológico único. Neste contexto, as esponjas marinhas demonstraram ser fontes importantes de novos compostos e interessantes alvos de investigação e desenvolvimento para a biotecnologia.

O presente trabalho tinha por objectivo a extracção, isolamento e estudo do mecanismo de inibição viral de macromoléculas existentes em esponjas marinhas pertencentes à espécie *Erylus discophorus*. Embora este objectivo não tenha sido atingido, devido a várias dificuldades no fraccionamento dos extractos obtidos, foram recolhidas informações importantes sobre esta actividade anti-VIH estudada. Em primeiro lugar, sabemos que a actividade anti-VIH demonstrada é específica para a espécie *Erylus discophorus*, uma vez que esponjas recolhidas em zonas adjacentes, pertencentes a outras espécies, não demonstraram possuir esta actividade; é, portanto, uma actividade ‘species-specific’. Por outro lado, ficámos a saber que esta espécie possui actividade anti-viral independentemente da localização geográfica do local de recolha da esponja. Este facto leva-nos a descartar a hipótese de que esta actividade biológica possa ser atribuída a um microrganismo ambiental. Contudo, esta actividade poderá ser devida à existência de um simbionte obrigatório ou ao próprio consórcio

esponja-microrganismo. Ficaram no ar algumas dúvidas quanto a existência de apenas uma ou mais moléculas responsáveis por esta actividade biológica. No entanto, o mecanismo de inibição viral funcionará provavelmente ao nível do passo de adsorção e fusão do vírus com a célula linfocítica. Esta inibição poderá ser específica, sinérgica entre duas ou mais moléculas, ou inespecífica, existindo apenas um efeito de impedimento estereoquímico da ligação do vírus aos receptores celulares. Quanto à natureza química da principal molécula responsável pela actividade anti-VIH, obtiveram-se informações no sentido de que será extremamente hidrofílica, glicídica ou glicoproteica, com uma massa molecular muito elevada, acima de 2000 kDa e carga aniónica a pH 6, o que significa que o seu ponto isoeléctrico será inferior a 6.

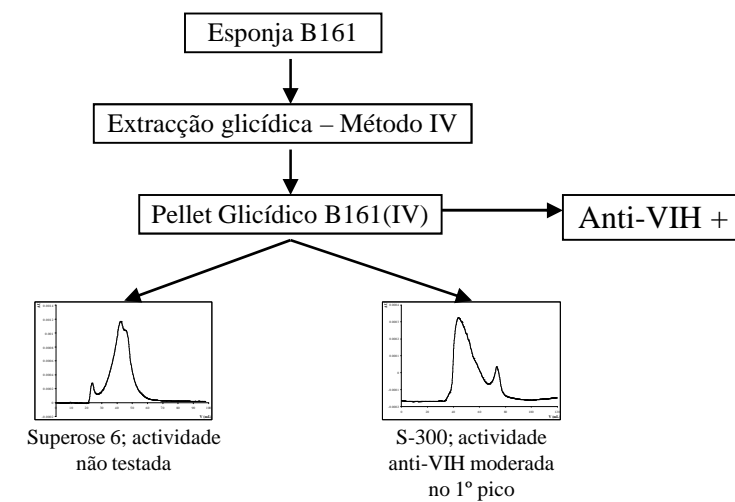
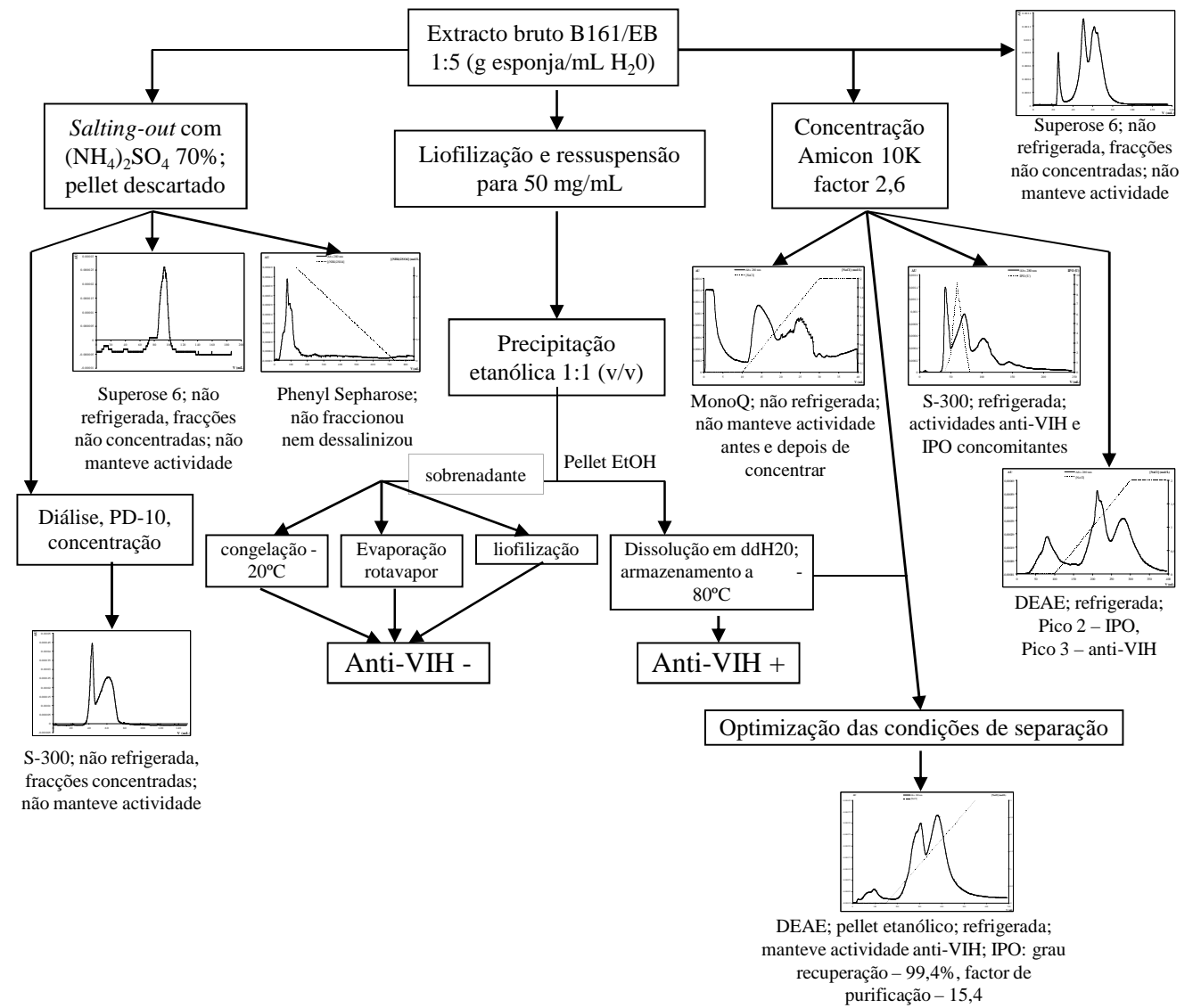
Ao longo deste trabalho, foram vários os desafios e obstáculos que se nos depuseram. O factor de concentração das amostras revelou ser preponderante na avaliação da actividade anti-VIH, sendo imperativo obter amostras extremamente concentradas para que fosse possível observar alguma actividade biológica. A impossibilidade do estudo das amostras por electroforese foi outro factor de impasse ao longo de todo o trabalho. Mas, acima de tudo, a perda consistente de actividade biológica ao longo das várias tentativas de fraccionamento do extracto bruto, no sentido de conseguir isolar a molécula bioactiva, foi o maior factor de impedimento no prosseguimento destes estudos.

Não obstante todos estes contratemplos, a potente actividade anti-VIH observada para o extracto bruto justifica futuro investimento material e humano neste trabalho. A elucidação da origem biológica desta actividade – esponja ou simbiote – poderá trazer uma nova abordagem do problema, que poderá passar pelo cultivo de microrganismos como meio de obtenção da amostra inicial. A aplicação de outras estratégias analíticas no sentido de esclarecer a natureza química da molécula ou das moléculas responsáveis pela actividade anti-viral será outro passo a seguir. O fraccionamento apenas parcial da amostra inicial e a sua aplicação tópica directa, sob a forma de géis vaginais ou em lubrificantes, poderá também oferecer uma alternativa, caso se demonstre uma baixa toxicidade dessas fracções. Uma outra abordagem possível será testar estes extractos quanto a uma possível actividade de inibição de outros vírus. Será essencial explorar todas as ferramentas de biotecnologia aplicáveis com o objectivo máximo de uma potencial aplicação farmacológica deste composto. Contudo, com base nos dados obtidos neste trabalho, este composto apenas poderá ter uma aplicação profilática, não

demonstrando ser uma alternativa no sentido de uma possível “cura” da infecção por VIH, uma vez que o extracto demonstrou não possuir actividade de inibição depois de estabelecida a infecção. Actualmente estão já disponíveis no mercado alguns géis vaginais com propriedades anti-VIH. No entanto, a constituição química destes géis baseia-se na utilização de anticorpos, tornando o seu modo de acção direccionado para vias de infecção muito específicas. Esta sua extrema especificidade de actuação tem levado a que a sua aplicabilidade seja muito restrita e não constituam uma alternativa fiável e segura. A existência de compostos químicos com uma acção antiviral de largo espectro, como parece ser o caso estudado neste capítulo, será uma mais-valia e uma verdadeira inovação farmacológica, no âmbito da prevenção de novas infecções por VIH, que é e será sempre parte integrante de um programa sustentado para travar esta epidemia que assola o mundo inteiro.

Paralelamente ao objectivo principal deste trabalho – o estudo da actividade de inibição anti-VIH de extractos de esponjas marinhas pertencentes à espécie *Erylus discophorus* – conseguimos também obter algumas pistas nos primeiros passos de isolamento de um enzima com actividade de haloperoxidase, trabalho este que, posteriormente, originou a publicação (Nicolai, Esteves et al. 2007) que se encontra no Anexo IV.

## Resumo da Parte Experimental do Capítulo 2 – *Erylus discophorus* e Actividade Anti-VIH



### **3. FAMÍLIA *CLIONIDAE* E BIOACUMULAÇÃO DE NÍQUEL**

---





### 3. FAMÍLIA *CLIONIDAE* E BIOACUMULAÇÃO DE NÍQUEL

Alguns autores têm defendido a utilização das esponjas marinhas como indicadores ambientais de poluição, nomeadamente na acumulação de metais pesados e pesticidas, uma vez que estes animais vivem fixos ao seu substrato bentónico durante toda a sua vida adulta e se alimentam por filtração, ficando particularmente expostas às condições ambientais do ecossistema onde se inserem (Perez 2001; Perez, Vacelet et al. 2004). Contudo, é importante avaliar se o conteúdo em metais da esponja é consequência de contaminação ambiental ou de um processo de bioacumulação, resultante do metabolismo do próprio animal (Araújo, Conceição et al. 2003). Para além disso, é essencial esclarecer, também, a origem biológica desta acumulação, uma vez que esta poderá ser levada a cabo por um microrganismo associado e não pela esponja propriamente dita.

Em 1999, Araújo e seus colaboradores reportam a composição multielementar de 30 espécimens de esponjas marinhas da zona costeira e dois espécimens de profundidade, pertencentes a 19 espécies diferentes recolhidas ao longo da área Este da costa portuguesa do Oceano Atlântico, Madeira e Angola. Foram encontrados níveis de níquel particularmente elevados (2400 e 4300 mg kg<sup>-1</sup>) em dois espécimens da espécie *Suberites carnosus*, recolhidos em Porto Novo, zona costeira da ilha da Madeira. Esta acumulação parece ser independente da localização, visto que outras espécies recolhidas no mesmo local não apresentam estes elevados teores de níquel (Araújo, Cruz et al. 1999).

Em 2003, estes investigadores analisaram esponjas de diferentes espécies da costa Oeste portuguesa e sedimentos dos respectivos locais de recolha e determinaram os elementos maioritários, minoritários e vestigiais, para avaliar a influência do ambiente sobre os processos de bioacumulação (Araújo, Conceição et al. 2003). A comparação da composição elementar dos sedimentos das Berlengas com a composição de sedimentos não poluídos indicava, claramente, a ausência de poluentes metálicos naquela zona. Para a espécie *Cliona viridis*, encontraram-se teores de Ni e Zn muito acima dos valores médios. Contudo, este conteúdo não será uma influência local visto

que a concentração destes metais na esponja (2700 a 3500 mg kg<sup>-1</sup> para o Ni e 4700 a 6700 mg kg<sup>-1</sup> para Zn) é cerca de 100 a 1000 vezes superiores que nos sedimentos. Além disso, outros espécimens de diferentes espécies estiveram expostos a condições ambientais comparáveis e não apresentaram valores semelhantes.

Estudos sobre o conteúdo de vários metais em esponjas recolhidas ao longo do golfo de Marselha, em locais sucessivamente menos expostos a contaminação proveniente de descargas urbanas, demonstraram que há uma acumulação máxima de níquel na espécie *Cliona viridis*, que não se correlaciona com os níveis de poluição dos locais de recolha. O teor em níquel das várias esponjas foi determinado por espectroscopia de absorção atômica e revelou valores médios da ordem de 2195 a 3330 mg kg<sup>-1</sup> (Perez 2001).

O trabalho desenvolvido neste capítulo teve por objectivo principal o estudo, a nível químico e biológico, desta bioacumulação de níquel por parte de algumas esponjas pertencentes à família *Clionidae* e também de um espécimen pertencente à espécie *Suberites carnosus*. Pretendeu-se esclarecer a reprodutibilidade dos elevados teores de níquel em vários espécimens de esponjas, pertencentes a várias espécies e recolhidas em localizações geográficas distintas. Pretendia-se também obter algumas pistas quanto ao mecanismo de acumulação do níquel, esclarecendo se este se encontraria sob a forma inorgânica ou se existiria alguma molécula orgânica que o acumulasse especificamente e, se fosse caso disso, isolar e caracterizá-la. Por fim, quisemos também saber se esta acumulação seria resultante do próprio metabolismo da esponja ou se, eventualmente, o responsável pela bioacumulação de níquel seria algum microrganismo associado. Para isso, identificámos taxonomicamente os dinoflagelados associados embebidos no interior do tecido da esponja e tentámos, embora sem sucesso, cultivá-los. Identificaram-se e isolaram-se também as bactérias associadas às várias esponjas acumuladoras de níquel para tentar esclarecer se haveria alguma bactéria comum entre elas que pudesse ser a potencial acumuladora de níquel.

Este capítulo está organizado em Considerações Introdutórias, Parte Experimental e Notas Conclusivas. Na primeira parte, é feita uma pequena introdução com informação relevante para o trabalho em questão encontrada na literatura, focando algumas considerações sobre o níquel e o seu papel nos sistemas vivos, características

gerais da família *Clionidae* e dos seus simbioses mais comuns, os dinoflagelados, e finalmente, alguns exemplos de bioacumulação por parte de alguns organismos. Na Parte Experimental incluem-se materiais e métodos, resultados e a sua discussão em relação ao fenómeno de bioacumulação observado e a sua potencial aplicação biotecnológica no âmbito ambiental.

### **3.1. CONSIDERAÇÕES INTRODUTÓRIAS DO CAPÍTULO 3**

#### **3.1.1. O Níquel**

A utilização do níquel remonta ao início da Idade do Bronze na Mesopotâmia, cerca de 3500 anos A.C., onde os bronzes produzidos possuíam um conteúdo de níquel até cerca de 2%. Também os chineses, em 2000 A.C., utilizavam ligas naturais de níquel-cobre na manufactura dos seus utensílios (Sigel, Sigel et al. 2007).

No entanto, o níquel só foi descoberto como elemento em 1751, pelo químico e metalúrgico suíço Baron Axel Frederik Cronstedt, quando este tentava extrair cobre de um mineral chamado niquelite. Em vez de obter cobre, como Cronstedt esperava, obteve um metal branco que baptizou de níquel, nome proveniente do mineral de onde foi extraído (WebElements.com 2008).

##### **3.1.1.1. Características Gerais**

O níquel é um elemento químico, de símbolo Ni, de número atómico igual a 28 (28 prótons e 28 electrões) e massa atómica 58,6934 u.m.a. É classificado como um metal de transição e encontra-se situado no grupo 10 (8B), período 4, bloco d da Tabela Periódica dos Elementos. À temperatura ambiente, o níquel, na sua forma metálica, é sólido, possui uma coloração branco-prateada e é um metal duro, de consistência maleável e dúctil. Possui um carácter moderadamente ferromagnético e propriedades de condução de calor e electricidade relativamente pobres. O níquel, de configuração electrónica no seu estado fundamental  $[Ar] 3d^8 4s^2$ , existe nos estados de valência 0, +1, +2 e +3, sendo que o estado de oxidação +2 é o mais vulgar.

Nos sistemas químicos, o níquel pode formar vários compostos, onde se incluem fluoretos ( $\text{NiF}_2$ ), cloretos ( $\text{NiCl}_2$ ), iodetos ( $\text{NiI}_2$ ), óxidos ( $\text{NiO}$ ,  $\text{Ni}_2\text{O}_3$ ), sulfuretos ( $\text{NiS}$ ,  $\text{NiS}_2$ ,  $\text{Ni}_3\text{S}_2$ ), carbonilos ( $\text{Ni}(\text{CO})_4$ ), e vários complexos ( $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Ni}(\text{CN})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) (WebElements.com 2008).

Nos sistemas biológicos, o níquel é considerado um nutriente essencial, necessário, em concentrações da ordem do nanomolar, para a concatenação e actividade catalítica de, pelo menos, seis enzimas. No entanto, em concentrações superiores, o níquel é altamente tóxico, possuindo um elevado potencial carcinogénico e é capaz de desencadear reacções alérgicas por contacto (Expert.Group.on.Vitamins.and.Minerals 2002).

No meio ambiente, o níquel existe naturalmente na crosta terrestre em concentrações de cerca de 79 ppm (partes por milhão) (Expert.Group.on.Vitamins.and.Minerals 2002). Também na atmosfera se encontram naturalmente elevadas quantidades de níquel, proveniente de poeiras e cinzas vulcânicas (Sigel, Sigel et al. 2007). A existência de grandes depósitos de níquel, formando ligas com outros metais (vulgarmente ferro e cobre), em alguns locais do planeta, levam a crer que este exista também no núcleo da Terra. Nos meteoritos, a concentração de níquel pode chegar aos 13000 ppm (WebElements.com 2008). Nos alimentos, as categorias mais ricas em níquel são os cereais, vegetais e frutas, donde se destaca o cacau, com um conteúdo de 9,8 ppm, e o feijão de soja, com 5,2 ppm (Expert.Group.on.Vitamins.and.Minerals 2002). O níquel proveniente de actividades antropogénicas, como a extracção de minérios, fundições e refinarias, bem como a sua presença em componentes industriais e comerciais, produtos secundários de combustão, esgotos e tráfego automóvel, é igualmente uma fonte importante para a dispersão deste elemento no ambiente (Sigel, Sigel et al. 2007).

A biodisponibilidade e absorção de níquel por parte dos organismos depende principalmente dos vários equilíbrios de solubilidade aquosa, especialmente no meio marinho (Tetra Tech 1999; Expert.Group.on.Vitamins.and.Minerals 2002). Na natureza, o níquel possui 5 isótopos estáveis -  $^{64}\text{Ni}$ ,  $^{62}\text{Ni}$ ,  $^{61}\text{Ni}$ ,  $^{60}\text{Ni}$  e  $^{58}\text{Ni}$  - sendo que este último representa 58% da abundância total deste metal (WebElements.com 2008).

A principal aplicação do níquel é na metalurgia, onde este é empregue no fabrico de aço inoxidável e outras ligas resistentes à corrosão. É também utilizado na produção de pilhas recarregáveis, reacções de catálise, cunhagem de moedas, revestimentos metálicos e como pigmento na indústria vidreira, onde confere uma coloração verde (WebElements.com 2008).

### **3.1.1.2. Ciclo Biogeoquímico do Níquel nos Oceanos**

O ciclo de qualquer nutriente no oceano consiste em cinco processos: 1) captura pelos biota à superfície; 2) afundamento e remineralização da biomassa; 3) advecção e difusão do nutriente remineralizado para a superfície; 4) 'inputs' e 'outputs' de e para a atmosfera e sedimentos; 5) reciclagem à superfície (Morel 2008).

No meio ambiente, o níquel pode ocorrer sob a forma coloidal, como espécie dissolvida ou associado a partículas inorgânicas (Fig. 3.1). As espécies dissolvidas consistem no ião livre ou em complexos inorgânicos e orgânicos. Os ligandos orgânicos que complexam com este metal podem ser moderadamente fortes ou extremamente estáveis. Não é provável que os complexos estáveis estejam biodisponíveis, mas há autores que discutem a possibilidade de formas não reactivas do metal possam dissociar-se em formas mais biodisponíveis, quando em contacto com a água do mar. Nas formas particuladas, o metal pode estar adsorvido a sedimentos (que podem sofrer erosão), adsorvido a partículas sólidas de origem antropogénica ou embebido na matriz dos solos, em níveis vestigiais naturais. As várias formas químicas do metal podem variar de acordo com diferentes variáveis do ambiente, como o pH, concentração das espécies orgânicas dissolvidas, potencial de oxidação-redução, salinidade, afinidade do metal para as partículas existentes no substrato e na coluna de água e processos biológicos relacionados (Tetra Tech 1999).



podem biotransformá-los, fornecendo vias preferenciais para a difusão do níquel e alteração do seu potencial de oxidação-redução. A captura, acumulação e toxicidade do níquel pelos organismos variam com as diferentes formas do metal, visto que apenas algumas espécies químicas estão biodisponíveis.

A cadeia alimentar está dividida em seis componentes tróficos: produtores, zooplâncton, animais bentônicos, peixes não piscívoros, peixes piscívoros e organismos de níveis tróficos superiores, como mamíferos marinhos e aves. O zooplâncton e os animais bentônicos são muito importantes no ciclo do níquel devido às suas actividades filtradoras.

Os organismos marinhos influenciam, de uma maneira geral, o ciclo biogeoquímico do níquel através de processos de captura e excreção, incorporação em tecidos biológicos e produção de detritos orgânicos com metais. A captura remove os metais dissolvidos da coluna de água e incorpora-os nos “biota”, enquanto a excreção devolve os metais à água, numa forma solúvel. Este processamento biológico pode alterar a forma e a biodisponibilidade dos metais. Os iões metálicos livres e os complexos fracos com espécies inorgânicas são as formas assimiladas mais facilmente, enquanto as formas excretadas podem estar complexadas com ligandos orgânicos, muito menos disponíveis para captura.

Os fluxos de captura e remoção de níquel dependem da velocidade de captura, da concentração de metal biodisponível na água e da densidade de organismos. Uma vez que os microrganismos e o fitoplâncton possuem, devido à sua razão superfície/volume e elevada actividade metabólica, maiores velocidades de captura e excreção, em relação a organismos de níveis tróficos superiores, contribuem de forma mais decisiva para o ciclo biogeoquímico do níquel.

O processamento através da cadeia alimentar produz formas orgânicas de níquel existente em material fecal. Estes detritos orgânicos depositam metais nos sedimentos. A mortalidade do plâncton e o depósito de fitoplâncton também contribuem com metais na forma orgânica para a coluna de água e sedimentos. Alguns destes metais são reciclados através da cadeia alimentar, outros são libertados, em formas solúveis, para os sedimentos e coluna de água que se lhes sobrepõe, à medida que a matéria orgânica se decompõe (Tetra Tech 1999).



Ao longo do decurso da história do nosso planeta, o fitoplâncton terá desenvolvido, simultaneamente, ferramentas bioquímicas que maximizam o aproveitamento dos fluxos de metais vestigiais disponíveis e estratégias para promover a sua reciclagem de forma mais eficiente. Assim, a eficiência relativa de reciclagem dos vários nutrientes no ambiente marinho deverá resultar, de algum modo, da coevolução da química e da biologia nos oceanos. As diferenças entre as eficiências de reciclagem de cada um dos metais vestigiais serão controladas, em parte, pelas diferentes coordenações em compostos celulares e a natureza química desses compostos (Morel 2008).

### **3.1.1.3. Níquel nos Sistemas Biológicos**

#### a) O níquel como catalizador da vida primordial

O ambiente no qual a vida surgiu era, provavelmente, electronicamente rico e abundante em gases, como hidrogénio e dióxido de carbono. Nas formas de vida primordiais, o níquel terá exibido um papel bioquímico importante, uma vez que eram necessários catalizadores especiais para lidar com estes gases. O níquel, assim como o cobalto, terá sido extremamente útil quando o metabolismo era baseado numa atmosfera redutora mas, após o aparecimento do oxigénio molecular, o seu valor terá diminuído (Russell 2006; Sigel, Sigel et al. 2007). Uma proposta alternativa sugere que a diminuição em grande escala da metanogénese ocorreu antes, e não está necessariamente relacionada, ao Grande Evento Oxidativo. O arrefecimento da manta terrestre, há cerca de 2,7 milhões de anos, terá levado a alterações químicas no vulcanismo e abundâncias dos elementos vestigiais existentes nos oceanos, provocando uma diminuição brusca da concentração de níquel disponível para os microrganismos metanogénicos. Este declínio global da metanogénese terá, há cerca de 2,4 milhões de anos atrás, facilitado a transição de um ambiente essencialmente anóxico para uma atmosfera rica em oxigénio (Konhauser, Pecoits et al. 2009). O níquel terá, então, desempenhado um papel crucial nesta alteração drástica da constituição atmosférica que acabou por estruturar toda a biosfera do planeta.

Actualmente, os enzimas mais extensamente estudados, que requerem níquel para a catálise, são seis e incluem a urease, superóxido dismutase, hidrogenases de NiFe, metil-coenzima M redutase, monóxido de carbono desidrogenase e acetil-coenzima A sintase (Ragsdale 1998; Watt e Ludden 1999).

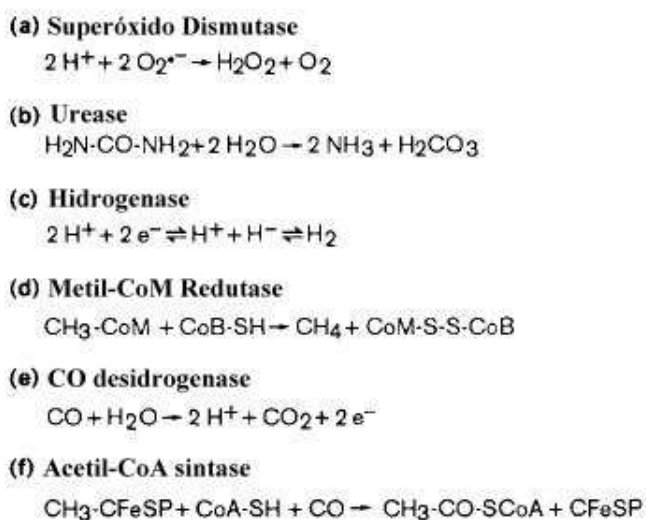


Figura 3.2 - Enzimas que contêm níquel e reacções que elas catalizam (adaptado de (Ragsdale 1998))

Para além destas, conhecem-se ainda a glioxalase I, a acireductona dioxigenase (Sigel, Sigel et al. 2007) e uma putativa *cis/trans*-isomerase (Watt e Ludden 1999). No entanto, estes enzimas estão menos estudados e em alguns casos a sua estrutura ainda não foi estabelecida.

Em eucariotas superiores, o níquel está limitado a apenas um enzima, a urease, embora as bactérias anaeróbias simbióticas destes organismos utilizem o níquel em algumas reacções que envolvem o hidrogénio molecular. As bactérias metanogénicas, pertencentes à classe das *archaeobacteria*, mantiveram as suas hidrogenases de níquel, mas estes organismos estão confinados a nichos anaeróbios perdidos no mundo geoquímico. Pensa-se que estas bactérias são ancestrais, utilizando cofactores de níquel especiais, como o anel F<sub>430</sub> presente no enzima metil-coenzima M redutase (Sigel, Sigel et al. 2007).

b) A Bioquímica do Níquel

Os elementos vestigiais podem ser essenciais para o crescimento, reprodução e saúde, ou podem ser não-essenciais, constituindo reminescências fortuitas das nossas origens geoquímicas ou indicadores de contaminação ambiental. Elementos como o silício, vanádio, níquel, arsénico e outros metais, presentes em eucariotas superiores em quantidades da ordem dos ppm ou inferiores, são considerados essenciais, embora ainda não se tenham definido funções bioquímicas específicas para estes elementos. Estudos nutricionais, realizados em várias espécies animais, indicam que os sintomas de privação de níquel incluem distúrbios no crescimento, na reprodução e nos níveis de glucose no plasma. A insuficiência de níquel afecta também a distribuição e função de outros nutrientes como o cálcio, ferro, zinco e vitamina B<sub>12</sub> (Nielsen 1991). No entanto, a deficiência de níquel em humanos não foi, até à data, reconhecida pela Organização Mundial de Saúde (World.Health.Organization 2000; Expert.Group.on.Vitamins.and.Minerals 2002)

Contudo, mesmo os metais essenciais podem tornar-se tóxicos, caso o seu *intake* seja excessivo (Nielsen 1991). Em ambientes sujeitos a contaminação ambiental, a homeostase dos metais é muito importante visto que, uma sobrecarga de metais, pode causar stress oxidativo levando eventualmente à inibição de enzimas, peroxidação lipídica, alteração de ácidos nucleicos (Eitinger, Suhr et al. 2005) e distúrbios na captação de microelementos essenciais (Sigel, Sigel et al. 2007). Embora os metais de transição sejam fundamentais na catálise de reacções metabólicas cruciais para a manutenção de vida, eles também catalizam reacções que podem danificar a célula. As reacções redox catalizadas por iões metálicos no citosol podem danificar proteínas, lípidos e DNA. Os iões metálicos podem ligar-se a enzimas, causando a sua inibição ou inactivação da sua actividade enzimática, e interagir com o DNA, danificando o material genético vital para a célula (Watt e Ludden 1999). Experiências feitas em ratinhos demonstraram que a acumulação de níquel nos tecidos até níveis tóxicos podem causar danos na capacidade reprodutiva e no desenvolvimento embriogénico. Observou-se, também, a existência de danos no DNA de células isoladas de ratinhos expostas a compostos de níquel. O seu potencial carcinogénico, determinado *in vitro*, inclui inibição dos mecanismos de reparação do DNA, inibição da comunicação intercelular, alterações dos níveis de alguns factores de transcrição e efeitos sobre o metabolismo do cálcio. Em trabalhadores com exposição ocupacional a compostos de

níquel observou-se a existência de aberrações cromossomais. Para além disso, a natureza do átomo de níquel, com dois electrões desemparelhados na sua orbital de valência, conduz à sua ligação a péptidos ou proteínas, formando complexos antigénicos capazes de induzir reacções alérgicas (Expert.Group.on.Vitamins.and.Minerals 2002).

Uma vez que o níquel é um metal potencialmente tóxico para a célula, o 'uptake', transporte, armazenamento, concentração intracelular e biossíntese de enzimas de níquel são fortemente regulados por proteínas que se ligam especificamente a este metal. Estas incluem permeases (por exemplo NixA, HoxN, NikA-NikE), metalochaperones (p.e. UreE, HypB) e proteínas reguladoras da biossíntese (p.e. NikR e sensor de H<sub>2</sub>) (Carrington, Al-Mjeni et al. 2002). Em microrganismos, a captura de níquel e cobalto é mediada por sistemas de ATP-'binding cassette' (ABC) e transportadores secundários (NiCoTs) (Eitinger, Suhr et al. 2005).

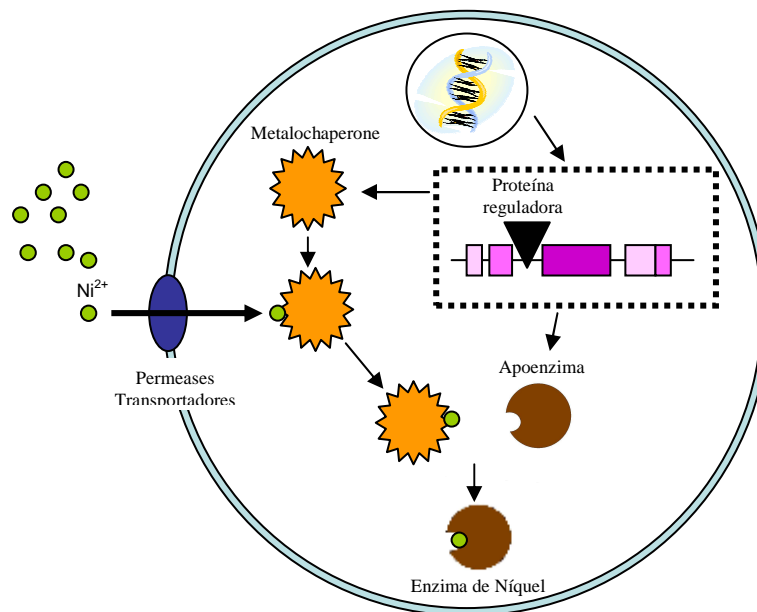


Figura 3.3 - Regulação intracelular do níquel através de permeases, transportadores, metalochaperones e proteínas reguladoras da transcrição

c) Permeases e Sistemas Transportadores de Níquel

A permease de níquel do tipo ABC mais extensamente investigada é o sistema NikABCDE da bactéria *E. coli*. Este sistema, cujo funcionamento de transporte é dependente de ATP, é composto por uma proteína periplasmática (NikA), duas proteínas de membrana (NikBC) e duas proteínas ABC (NikDE) (Mulrooney e Hausinger 2003; Eitinger, Suhr et al. 2005). A proteína NikA é uma proteína solúvel e encarrega-se da ligação ao átomo de níquel; as proteínas NikB e NikC formam um poro transmembranar para a passagem do níquel e as proteínas NikD e NikE hidrolizam o ATP, acoplado a energia daí resultante ao transporte do níquel. Este sistema, ou sistemas homólogos, foram já estudados noutros microrganismos, como a *H. pylori* (Mulrooney e Hausinger 2003).

Para além dos sistemas transportadores multicomponente dependentes de ATP, existem ainda transportadores de níquel unimoleculares, como é o caso do HoxN e dos seus homólogos NixA (Mulrooney e Hausinger 2003), HupN e UreH (Watt e Ludden 1999). Estes fazem parte da família dos transportadores NiCoTs e exibem especificidade parcial ou total para os átomos de níquel ou cobalto (Eitinger, Suhr et al. 2005). O transportador HoxN, isolado pela primeira vez na bactéria *Alcaligenes eutrophus*, é uma proteína com uma massa molecular de cerca de 33 kDa (Watt e Ludden 1999) e contém oito segmentos transmembranares (Mulrooney e Hausinger 2003). Este transportador concentra níquel 10 a 15 vezes, funcionando como um sistema de elevada afinidade mas baixa capacidade (Mulrooney e Hausinger 2003). Na levedura *Schizosaccharomyces pombe* foi também encontrado um transportador de níquel transmembranar semelhante ao HoxN, levantando a possibilidade da existência de transportadores de níquel em eucariotas superiores (Mulrooney e Hausinger 2003).

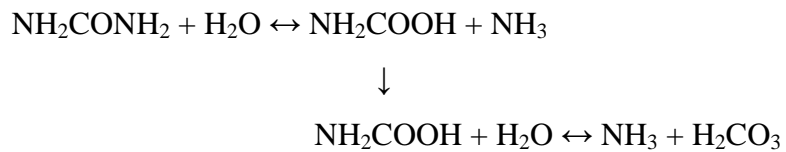
Para além destes transportadores específicos, o níquel é também capaz de entrar na célula através de outros transportadores de metais divalentes menos específicos, com diferentes afinidades (Watt e Ludden 1999).

c) Enzimas de Níquel

## i) Urease

Na história da bioquímica, a urease constituiu um marco por ter sido o primeiro enzima a ser cristalizado, a partir do feijão de soja, e também o primeiro enzima em que foi demonstrada a presença de níquel, embora cerca de 50 anos separem estes dois eventos (Watt e Ludden 1999). Este enzima desempenha um papel fundamental no metabolismo do azoto em plantas e microrganismos e funciona como um factor de virulência de alguns patogéneos que afectam humanos e animais (Ragsdale 1998).

A urease cataliza a hidrólise da ureia formando-se amónia e carbamato, que se decompõe espontaneamente, formando ácido carbónico e outra molécula de amónia (Mulrooney e Hausinger 2003), de acordo com a seguinte equação:



As subunidades e estrutura quaternária das ureases existentes em plantas e bactérias diferem consideravelmente, embora a sequência proteica possua regiões conservadas com homologia superior a 50% (Watt e Ludden 1999). O centro activo de níquel parece também ser conservado, com dois átomos de níquel, cada um deles coordenado por dois átomos de azoto de dois resíduos de histidina, um oxigénio proveniente de um grupo carbamilo que liga os dois átomos de níquel entre si e um oxigénio proveniente de uma molécula de água; o segundo átomo de níquel liga-se ainda a um outro átomo de oxigénio de um grupo carboxilato proveniente de um resíduo de aspartato da cadeia lateral (Ragsdale 1998) e a fazer a ponte entre os dois átomos de níquel existe ainda um grupo hidroxilo (Sigel, Sigel et al. 2007):

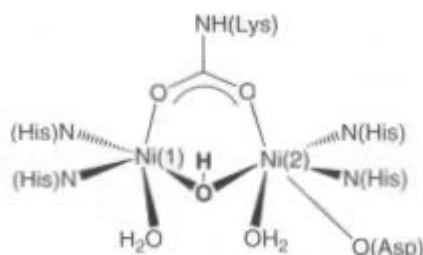


Figura 3.4 - Esquema da esfera de coordenação dos dois átomos de níquel no centro activo do enzima urease (Sigel, Sigel et al. 2007)

Os iões metálicos parecem estar profundamente embutidos na estrutura do enzima e numa região inacessível a agentes quelantes, o que levanta a questão de como os metais e o carbamato se incorporam na proteína. A síntese do centro metálico da urease é um processo complexo que requer a presença de níquel, dióxido de carbono (usado para a carbamilação), hidrólise de GTP e várias proteínas acessórias (Mulrooney e Hausinger 2003), referidas mais adiante na secção 3.1.1.3.e) Metalochaperones.

Embora o zinco seja mais comum em centros activos de enzimas hidrolíticas, a urease usa o níquel devido à sua maior afinidade para átomos de azoto, permitindo a ligação dos grupos  $\text{NH}_2$  da ureia (Watt e Ludden 1999).

## ii) Hidrogenases

As hidrogenases desempenham um papel central no metabolismo energético microbiano, catalizando a oxidação reversível do hidrogénio molecular gasoso:



Estes enzimas são vulgares em bactérias, *archea* e eucariotas. A sua função mais importante é, provavelmente, equilibrar o potencial redox no interior da célula e fornecer energia através da dissociação do hidrogénio molecular (Sigel, Sigel et al. 2007). Actualmente conhecem-se três classes distintas de hidrogenases: hidrogenases de NiFe, hidrogenases de Fe e hidrogenases sem centro metálico (Mulrooney e Hausinger 2003). Dentro das primeiras, destaca-se um subgrupo, as hidrogenases de NiFeSe, nas

quais, um dos resíduos de cisteína que serve de ligando aos dois iões metálicos foi substituído por uma selenocisteína (Sigel, Sigel et al. 2007). A existência de níquel nestes enzimas pode explicar o crescimento quimiolitotrófico dependente de níquel que se observou em algumas bactérias (Mulrooney e Hausinger 2003).

Foram identificadas hidrogenases de níquel com duas estruturas quaternárias diferentes. Um dos tipos de hidrogenases é composto por tetrâmeros e são enzimas de membrana. No entanto, a classe mais vulgar de hidrogenases de níquel é composta por duas subunidades de tamanhos diferentes. A subunidade maior possui uma massa molecular entre 45 e 65 kDa, dependendo do organismo, e contém o centro activo metálico, onde um átomo de níquel se liga a um átomo de ferro através de dois grupos tiolato e um outro átomo, que foi sugerido que seja oxigénio ou enxofre. O átomo de ferro está ainda coordenado a dois grupos  $\text{CN}^-$  e um CO e o átomo de níquel está coordenado por dois átomos de enxofre provenientes de dois resíduos de cisteína. A subunidade pequena, de cerca de 26 kDa, contém dois ‘clusters’ de  $\text{Fe}_4\text{S}_4$  e um ‘cluster’ de  $\text{Fe}_3\text{S}_4$ , dispostos num arranjo linear, de forma a canalizarem os electrões para fora do centro activo do enzima (Watt e Ludden 1999).

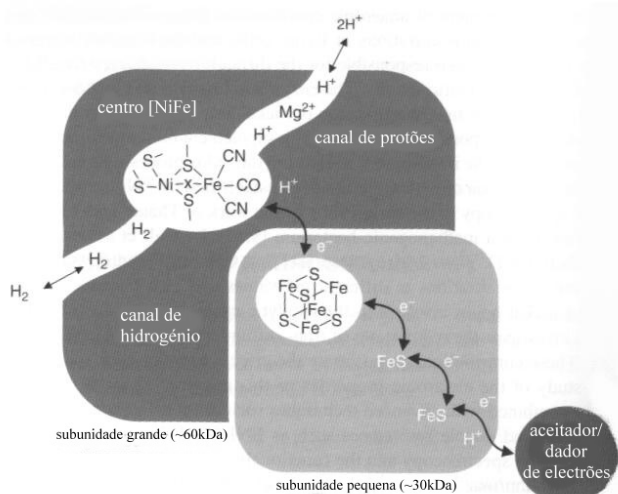


Figura 3.5 - Representação esquemática de uma hidrogenase de níquel heterodimérica (adaptado de (Sigel, Sigel et al. 2007))

O centro activo de níquel está localizado bem no interior da proteína e foi proposto que, para ser lá colocado, devem existir proteínas acessórias e/ou a hidrólise de um nucleótido trifosfato que “abrem” a subunidade grande para a inserção do níquel (Watt e Ludden 1999).



Através da análise de dados estruturais, foram propostos dois mecanismos de funcionamento da hidrogenase. Em ambos, o ciclo catalítico inicia-se com a ligação do  $H_2$  ao níquel (Sigel, Sigel et al. 2007).

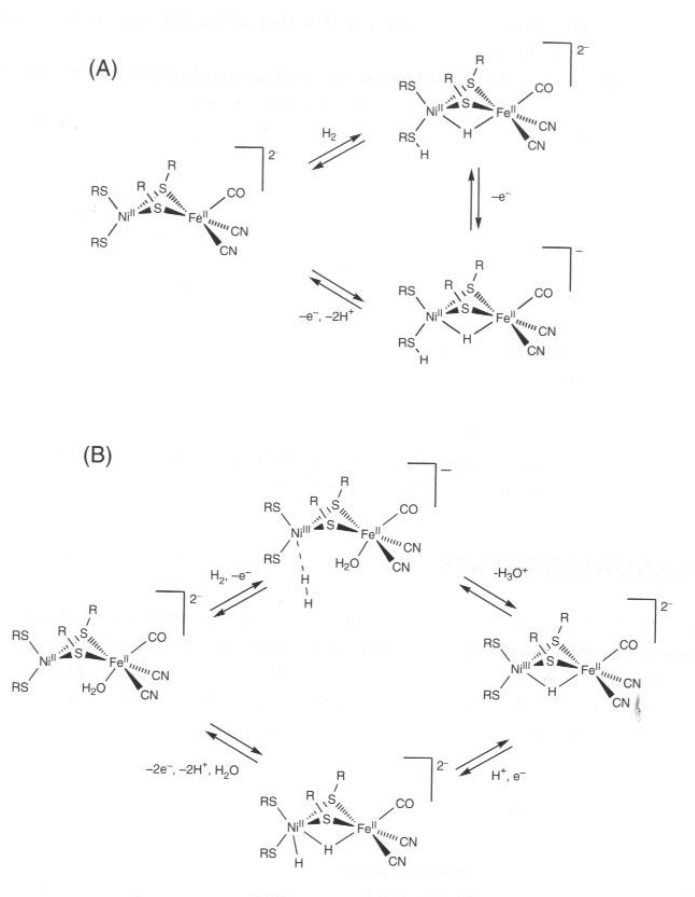


Figura 3.6 - Mecanismos propostos para o ciclo catalítico das hidrogenases de níquel (Sigel, Sigel et al. 2007)

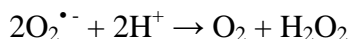
Num dos modelos (mecanismo A da Fig. 3.6), um dos resíduos de cisteína ligado ao níquel actua como base e assiste na clivagem heterolítica do  $H_2$  que ocorre com a ligação do hidreto ao átomo de níquel e sem existir qualquer alteração do estado redox do metal. Os electrões são depois expulsos através do átomo de ferro e o enzima volta ao seu estado inicial (Watt e Ludden 1999).

O segundo modelo proposto (mecanismo B da Fig. 3.6) pressupõe a oscilação do estado de oxidação do níquel entre os estados +2 e +3. A ligação inicial do  $H_2$  provoca a alteração do estado redox do níquel, o  $H_2$  é polarizado para o  $Ni^{3+}$  e o protão é aceite por uma molécula de água ligada ao átomo de ferro. Dá-se a libertação de  $H_3O^+$  e o hidreto forma uma ponte entre o níquel e o ferro. Com a entrada de um novo protão e

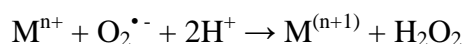
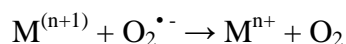
outro electrão, o níquel volta ao estado +2, ligando-se o protão ao níquel ou a um dos resíduos de cisteína terminais. A libertação dos dois protões e dois electrões e a entrada de uma molécula de água que se liga ao ferro completa o ciclo. Infelizmente, até à data, não foi possível esclarecer qual é o mecanismo exacto de reacção (Sigel, Sigel et al. 2007).

### iii) Superóxido Dismutase (NiSOD)

As Superóxido Dismutases (SODs) pertencem à classe de enzimas denominadas oxidoreductases, cuja função é proteger a célula de danos oxidativos provocados por espécies reactivas de oxigénio. As SODs, concretamente, catalizam a conversão do radical anião superóxido a peróxido e oxigénio molecular, segundo a seguinte equação global:



Todas as SODs conhecidas são metaloenzimas que catalizam a disproporção de duas moléculas de superóxido através da transferência de electrões, de e para o centro activo metálico, acoplada a transferências de protão rápidas, numa reacção que prossegue segundo um mecanismo de ping-pong em que o metal é primeiro reduzido e depois reoxidado pelo anião superóxido. As reacções parciais catalizadas pela SOD podem ser resumidas do seguinte modo (Sigel, Sigel et al. 2007):



Através do fornecimento de um protão, utilizado na redução do radical superóxido, o enzima é capaz de acoplar uma reacção favorável (a oxidação do  $\text{O}_2^{\bullet -}$  a  $\text{O}_2$ ) como força motriz para desencadear uma reacção desfavorável (a redução do  $\text{O}_2^{\bullet -}$ ).

São bem conhecidas e foram já caracterizadas SODs cujos centros activos possuem diferentes metais, tais como manganês (MnSOD), ferro (FeSOD), ou até

centros bimetálicos de cobre e zinco (CuZnSOD). No entanto, só em 1996 foi identificada a primeira SOD com centro metálico de níquel (NiSOD), em várias estirpes da espécie *Streptomyces sp.* As NiSODs apresentam várias semelhanças com as suas congéneres. Contudo, formam um grupo distinto no que diz respeito ao conteúdo metálico e ambiente de coordenação do centro de níquel, estrutura proteica e mecanismo reaccional.

O estado de oxidação mais comum do níquel em água é o Ni(II), o que faz deste metal um centro metálico improvável para uma SOD. Por esta razão, a catálise depende de um ambiente proteico capaz de atingir o potencial de redução do par Ni(III/II). Para o conseguir, os enzimas redox com centros de níquel adoptaram como estratégia a ligação a grupos tiolato de resíduos de cisteína, de modo a conseguirem atingir um estado de oxidação mais elevado. No entanto, esta observação era, até à data da descoberta das NiSODs, inesperada nestes enzimas devido à fácil oxidação dos tiolatos por acção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e O<sub>2</sub> (Sigel, Sigel et al. 2007).

Os primeiros estudos cristalográficos focados sobre as NiSODs, apontavam para uma estrutura enzimática homotetramérica composta por subunidades com cerca de 13 kDa. Contudo, estudos posteriores sugerem a existência de uma estrutura hexamérica da proteína. Os estudos biofísicos do centro activo de níquel revelaram a existência de um átomo de Ni(III) coordenado a três átomos de enxofre e dois átomos de azoto. Uma vez que o enzima possui apenas dois resíduos de cisteína, o terceiro átomo de enxofre teria de provir de um resíduo de metionina, formando-se um centro metálico mononuclear. Contudo, uma interpretação alternativa dos dados espectroscópicos aponta para a formação de um centro dinuclear, no qual os resíduos de cisteína provenientes de cada par de subunidades se coordenam ao centro metálico (Mulrooney e Hausinger 2003).

Ainda não se conhece o mecanismo através do qual as espécies de *Streptomyces* são capazes de incorporar selectivamente o níquel neste enzima tão singular (Mulrooney e Hausinger 2003). Para além disso, não se reconheceram até agora vantagens na utilização deste metal para os microrganismos onde foram identificadas NiSODs (Sigel, Sigel et al. 2007)

## iv) CO desidrogenase e Acetil-CoA sintase

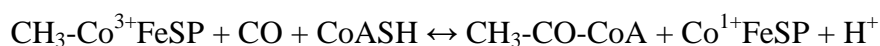
O enzima CO desidrogenase (CODH) cataliza a oxidação reversível do monóxido de carbono a dióxido de carbono, segundo a seguinte reacção:



Existem dois tipos distintos deste enzima, de acordo com a sua origem biológica e constituição do seu centro activo. Foi identificado, em alguns microrganismos aeróbios, um enzima CO desidrogenase com centro de molibdénio; no entanto, o mais estudado e conhecido é o CO desidrogenase com centro de níquel, identificado em microrganismos anaeróbios. Este enzima é homodimérico, com um centro de [4Fe-4S] (centro D) a servir de ligação entre as duas subunidades, participando como cadeia de transferência electrónica. Outros 2 centros [4Fe-4S] (B e B') estão posicionados de forma a conduzirem os electrões para o centro D, provenientes dos centros Ni-Fe-S localizados na subunidade oposta (C e C') (Mulrooney e Hausinger 2003).

Embora os iões  $\text{Ni}^{2+}$  sejam incorporados espontaneamente *in vitro*, a inserção de níquel *in vivo* necessita de, pelo menos, duas proteínas acessórias, CooC e CooJ, codificadas num gene downstream do gene que codifica para o enzima, formando estes um *cluster* de genes. Foi, ainda, identificada uma proteína designada por CooT, cujo envolvimento na activação do CODH ainda não é claro (Mulrooney e Hausinger 2003) (Sigel, Sigel et al. 2007).

A actividade como CO desidrogenase existe também associada ao enzima acetil-CoA sintase (ACS) que, para além da reacção anterior, cataliza ainda a decomposição do grupo acetil em moléculas monocarbonadas ou a reacção inversa, no sentido da síntese de acetil-coenzima A, de acordo com a seguinte reacção:

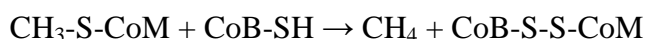


Estes enzimas bifuncionais, denominados acetil-CoA sintases/CO desidrogenases, foram identificados em microrganismos metanogénicos, redutores de sulfato e acetogénicos. Ambas as actividades enzimáticas são dependentes de níquel,

sendo que o centro activo da subunidade funcional com actividade de ACS é estruturalmente distinto do centro C, envolvido na actividade catalítica como CODH. O centro catalítico responsável pela actividade como ACS, denominado centro A, parece envolver um átomo de cobre como ligando entre o níquel e um centro de [4Fe-4S] ou, alternativamente, o cobre poderá ser substituído por um átomo de zinco ou um segundo átomo de níquel. Pouco se sabe sobre os detalhes mecanísticos das reacções que envolvem esta enzima, mas foi proposto que o centro [4Fe-4S] e o átomo de níquel distal (ou cobre ou zinco) poderão modular a reactividade do átomo de níquel central, permitindo que este alterne entre os estados de oxidação Ni(0) e Ni(II). Pensa-se que serão necessárias proteínas acessórias adicionais para a concatenação do centro catalítico com actividade de ACS (Mulrooney e Hausinger 2003).

v) Metil-CoM redutase

O enzima Metil-Coenzima M redutase é comum a todos os microrganismos metanogénicos e cataliza o passo final da reacção de redução do grupo metil a metano (Watt e Ludden 1999), de acordo com a seguinte equação química:



São necessários dois substratos, metil-S-coenzima M (CH<sub>3</sub>-S-CoM) e coenzima B (CoB-SH), formando-se metano e o perssulfureto CoB-S-S-CoM, que será subsequentemente reduzido (Sigel, Sigel et al. 2007). O enzima possui dois centros activos, cujo cofactor, denominado F<sub>430</sub> devido ao seu máximo de absorvância a 430 nm, é constituído por um complexo de Ni-tetrapirrolo, fortemente ligado à proteína mas não através de ligações covalentes (Mulrooney e Hausinger 2003).

O níquel encontra-se numa coordenação octaédrica, ligado a quatro átomos de azoto do tetrapirrolo no plano equatorial, a um átomo de oxigénio dum resíduo de glutamina da cadeia lateral na posição axial inferior e ao grupo tiol do CoM na posição axial superior (Ragsdale 1998).

Quando o enzima é activado, o níquel encontra-se no estado redox +1. Pensa-se que durante o ciclo catalítico, o centro activo passará por um estado intermediário no

qual o níquel se encontra na forma de Ni(III) e, finalmente, passará a Ni(II) que será novamente regenerado à sua forma inicial de Ni(I) aquando da activação do enzima (Mulrooney e Hausinger 2003).

O níquel, como parte constituinte deste enzima, desempenha, assim, um papel fundamental no metabolismo dos microrganismos metanogénicos. Ele é a base de sustentação da existência destas formas de vida (Mulrooney e Hausinger 2003).

#### vi) Glioxalase I (Glx I)

Tal como a superóxido dismutase, a glioxalase é outro enzima envolvido na protecção da célula, mas neste a espécie tóxica metabolizada é o metilglioxal, metabolito intermediário formado em vários processos enzimáticos intracelulares (Mulrooney e Hausinger 2003).

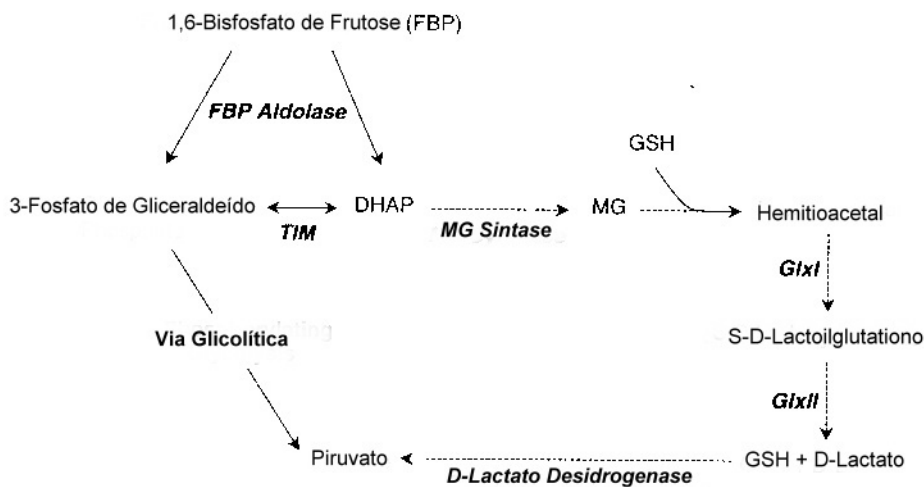


Figura 3.7 - Reacções que envolvem a formação e metabolização do metilglioxal (MG);

FBP Aldolase – Bisfosfato de Frutose Aldolase; TIM – fosfato de triose isomerase;

MG sintase – Metilglioxal sintase; GSH – glutatio no; Glx I e Glx II – Glioxalase I e II, respectivamente (adaptado de (Sigel, Sigel et al. 2007))

Pensa-se que, em condições de deficiência de fosfato inorgânico em relação à concentração de fosfato de dihidroxiacetona formado durante a via glicolítica, haja activação de um enzima com actividade de metilglioxal sintase que permite a formação

de piruvato a partir de lactato, numa via de ‘bypass’ da glicólise (Sigel, Sigel et al. 2007).

Outra reacção que leva à formação de metilglioxal é a reacção de isomerização catalizada pelo enzima fosfato de triose isomerase, que leva a cabo a interconversão dos intermediários 3-fosfato de gliceraldeído e fosfato de dihidroxiacetona, formados na via glicolítica. O intermediário enediolato gerado durante a catálise é susceptível de eliminação do fosfato sob a forma inorgânica, resultando na formação de metilglioxal. Esta reacção fornece o maior contributo para a formação de metilglioxal na célula, que se pode traduzir numa concentração intracelular próxima de 0,4 mM/dia. Esta acumulação substancial de metilglioxal demonstra bem a necessidade da existência de vias constitutivas de destoxificação (Sigel, Sigel et al. 2007).

Existem ainda outras vias de formação de metilglioxal, como sejam a degradação de aminoácidos e as reacções de conversão da acetona catalizadas pelos enzimas do citocromo P450 (Sigel, Sigel et al. 2007).

No interior da célula, o metilglioxal reage formando aductos com ácidos nucleicos e proteínas. A acumulação de metilglioxal na célula danifica as funções celulares a vários níveis, embora o mecanismo exacto de toxicidade ainda seja pouco claro. Entre os vários efeitos citotóxicos referidos na literatura incluem-se modificações lipídicas, morte celular por stress oxidativo e aumento da apoptose (Sigel, Sigel et al. 2007).

No entanto, as células possuem um mecanismo de remoção deste intermediário tóxico que envolve um sistema de dois componentes: o sistema das glioxalases – glioxalase I e II. Numa primeira fase, o glutathione (GSH) reage, de forma não enzimática, com o metilglioxal, formando-se um hemitioacetal que serve de substrato para o enzima glioxalase I. Este enzima cataliza a reacção de isomerização do hemitioacetal a *S*-D-lactoilglutathione que, por sua vez, é depois metabolizado, pelo enzima glioxalase II, hidrolizando-o a lactato (Mulrooney e Hausinger 2003).

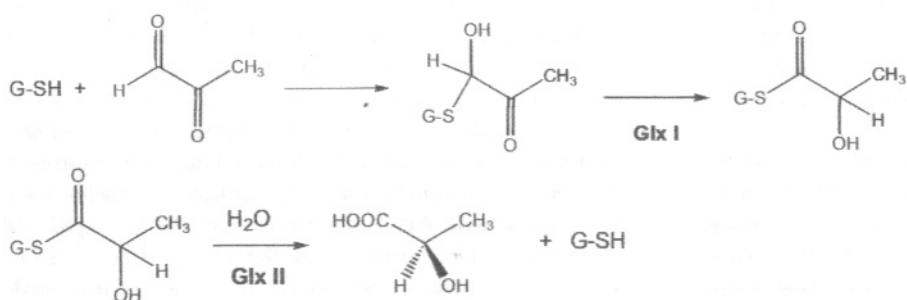


Figura 3.8 - Reacções do sistema de glioxalases;

Glx I – Glioxalase I; Glx II – Glioxalase II (Mulrooney e Hausinger 2003)

Em humanos e leveduras, a glioxalase I foi já bem caracterizada e sabe-se ser um enzima dependente de zinco. Surpreendentemente, em *E. coli*, este enzima revelou possuir uma preferência por níquel, embora exista grande homologia entre as sequências proteicas dos dois enzimas e pensa-se ser provável que outros microrganismos patogénicos possuam também glioxalases dependentes de níquel (Mulrooney e Hausinger 2003).

Estudos de absorção de raio-X forneceram evidências consistentes com um mecanismo catalítico envolvendo transferências de protão entre o substrato e moléculas de solventes coordenadas ao metal em detrimento de coordenação directa do substrato com o metal. Quanto aos mecanismos de incorporação do níquel na estrutura enzimática ainda pouco se sabe (Mulrooney e Hausinger 2003).

#### vii) Acireductona dioxigenase

Até à data, não foram encontrados enzimas de níquel em animais superiores. Daí que a descoberta, em bactérias, de um enzima de níquel existente numa via metabólica ubíqua, como a via de recuperação da metionina, tenha levado a especulação quanto à existência de um enzima de níquel em mamíferos, ainda por descobrir (Sigel, Sigel et al. 2007). Muitos microrganismos reciclam metiladenosina, produzida durante a biossíntese de S-adenosil-metionina, formando o aminoácido original (a metionina) numa via metabólica designada por via de recuperação da metionina. Um dos principais intermediários desta via é a aciredutona, pode ser oxidada formando dois produtos



diferentes. Na reacção produtiva, a actividade de dioxigenase leva à formação de ácido fórmico e do  $\alpha$ -cetoácido precursor da metionina, que é rapidamente transaminado formando-se o aminoácido correspondente. Numa reacção alternativa não produtiva, a actividade de dioxigenase converte a aciredutona a formato, monóxido de carbono e metiltiopropionato (Mulrooney e Hausinger 2003).

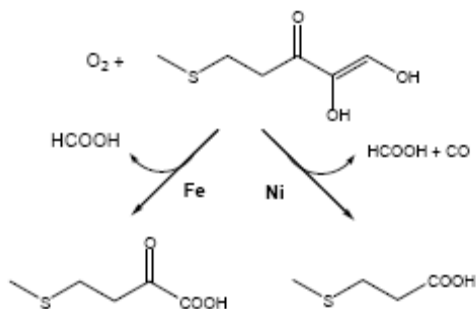


Figura 3.9 – Reacções do enzima aciredutona dioxigenase; a mesma estrutura proteica possui duas actividades enzimáticas distintas, dependendo do centro metálico (Mulrooney e Hausinger 2003).

Surpreendentemente, ambas as actividades encontram-se na mesma proteína, mas resultam de diferenças no seu conteúdo metálico. A reacção produtiva, que ocorre com formação de metionina, ocorre quando o ferro se encontra ligado à proteína; a actividade não produtiva está associada à proteína com níquel. Este é o único exemplo conhecido de uma oxigenase dependente de níquel. Estudos mecanísticos sugerem que a identidade do metal determina o local de ataque de um putativo anião peróxido formado durante a reacção (Mulrooney e Hausinger 2003).

No enzima com níquel, este metal parece estar coordenado através das cadeias laterais de três resíduos de histidina e três outros dadores de azoto/oxigénio, numa geometria octaédrica. Parece também existir uma certa promiscuidade da estrutura proteica em relação ao centro metálico, uma vez que a reconstituição do enzima com  $\text{Co}^{2+}$  ou  $\text{Mn}^{2+}$  resulta na obtenção da actividade enzimática observada com centro de níquel e a reconstituição com  $\text{Mg}^{2+}$  resulta na activação parcial da actividade do enzima quando ligado ao ferro (Sigel, Sigel et al. 2007).

viii) *Cis/trans* Isomerase

A proteína SlyD e suas homólogas são enzimas de níquel que possuem dois domínios catalíticos distintos: uma peptidil-prolil-*cis/trans* isomerase (PPIase) e uma extensão C-terminal rica em resíduos de histidina e cisteína, capaz de ligar iões metálicos divalentes. A actividade enzimática de peptidil-prolil-*cis/trans* isomerase cataliza a seguinte reacção:

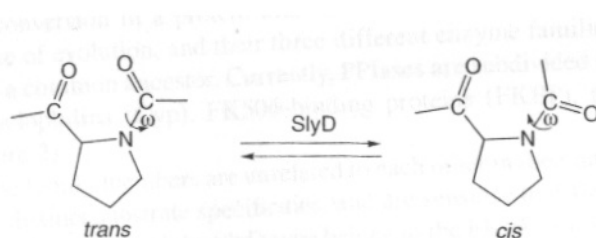


Figura 3.10 – Interconversão isomérica da ligação prolil catalizada pelo enzima PPIase (Sigel, Sigel et al. 2007)

As propriedades da ligação prolil influenciam fortemente a rigidez da cadeia de aminoácidos ao nível intramolecular e determinam a termodinâmica das interacções proteína-proteína e proteína-ligando. Esta interconversão conformacional constitui, em muitos casos, o passo limitante da formação da estrutura secundária de proteínas, desempenhando um papel importante no controlo conformacional da sua actividade biológica. Este enzima é, até à data, o único exemplo conhecido de uma PPIase sujeita a regulação por iões de metais de transição (Sigel, Sigel et al. 2007).

e) Metalochaperones

As metalochaperones são proteínas acessórias que apresentam directamente os iões metálicos a proteínas-alvo (como os enzimas de níquel), através de interacções proteína-proteína altamente específicas. Estas proteínas ligam os iões metálicos em zonas expostas facilmente acessíveis e possuem, provavelmente, algum tipo de superfície de acoplagem (‘docking’) específica para reconhecer determinadas proteínas-alvo (Rosenzweig 2002).

Os enzimas de níquel até agora conhecidos foram isolados na sua forma inactiva, como apoenzimas deficientes em níquel. As tentativas para reconstituir a actividade

enzimática através da adição de níquel demonstraram que a activação destes enzimas é extremamente difícil. Estas observações sugerem que deverá existir um mecanismo *in vivo* para a concatenação dos centros activos de enzimas de níquel. Foram identificados, através da comparação de sequências de proteínas acessórias de níquel, dois motivos comuns envolvidos na inserção de níquel nos respectivos enzimas: um motivo de ligação a nucleótidos (P-loop) e uma região rica em histidinas (domínio de ligação ao níquel) (Watt e Ludden 1999). No entanto, existem proteínas acessórias, que se sabem serem essenciais para a inserção de níquel no respectivo centro activo, mas não revelaram homologia com estes motivos. Este é o caso da proteína UreD, necessária para a activação do enzima urease (Watt e Ludden 1999).

f) O níquel na regulação dos seus transportadores, metalochaperones e enzimas

Como vimos, o níquel é um micronutriente essencial para muitos organismos, servindo como cofactor em enzimas envolvidos em processos metabólicos fundamentais. No entanto, a presença de níquel em excesso pode ser potencialmente tóxico para as células; por isso, a síntese de enzimas de níquel requer a presença de mecanismos altamente regulados de processamento do níquel, desde o seu transporte selectivo para o interior da célula até à sua inserção em apoproteínas. Participam, nestes processos, várias proteínas acessórias, cruciais para a biossíntese de enzimas dependentes de níquel (Sigel, Sigel et al. 2007). O próprio níquel participa em mecanismos de regulação da transcrição e activação dos seus enzimas através de proteínas acessórias ou sensores (Mulrooney e Hausinger 2003).

Muitos microrganismos possuem mecanismos de resistência a metais pesados que incluem sensores específicos para determinados iões metálicos. O sensor/regulador de níquel mais bem caracterizado, em *Escherichia coli*, é a proteína NikR. Esta proteína liga-se directamente ao níquel e actua na regulação da transcrição do operão *nik*, composto por seis genes, cujos cinco primeiros, designados por *nikABCDE*, codificam para os componentes de um sistema de transporte de níquel dependente de ATP. O último gene deste operão, *nikR*, codifica para uma proteína (NikR) que se liga ao DNA e inibe a transcrição do operão *nikABCDE*, na presença de níquel. A expressão da proteína NikR é, por sua vez, regulada por dois promotores de transcrição e, algumas

evidências, apontam também para uma autoregulação parcial da transcrição da proteína NikR. Assim, esta proteína funciona como regulador ao nível de entrada do níquel na célula. Ela está envolvida na regulação da concentração intracelular de níquel, actuando na expressão genética de um transportador activo dependente de ATP (Mulrooney e Hausinger 2003).

Na bactéria patogénica *Helicobacter pylori*, bem como noutras bactérias, a expressão do enzima urease demonstrou não se correlacionar com a biodisponibilidade de azoto, concentração de ureia, fase de crescimento, ou pH. Observou-se que, nestes microrganismos, o níquel regula a transcrição dos genes da urease através de uma proteína homóloga à proteína NikR, existente em *E. coli* (Mulrooney e Hausinger 2003).

Em estudos pioneiros, realizados na espécie *Bradyrhizobium japonicum*, o níquel demonstrou estimular a transcrição dos genes do enzima hidrogenase (Kim e Maier 1990). Pensa-se que o níquel se ligará à proteína HypB, uma proteína de níquel com actividade de GTPase, e esta incorporará o metal na proteína HupUV, formando um complexo activo. A formação deste complexo constituirá um sinal detectado por outras proteínas reguladoras que se ligarão ao DNA e, aí, estimularão a expressão dos genes da hidrogenase. A proteína HypB possui uma região N-terminal, rica em resíduos de histidina, responsável pela sequestração e armazenamento de átomos de níquel, necessário para posterior activação do enzima hidrogenase (Mulrooney e Hausinger 2003).

Em várias bactérias do género *Streptomyces*, o níquel está também envolvido na regulação da transcrição do enzima SOD, podendo funcionar como regulador positivo e negativo. Durante a maturação do enzima Ni-SOD, ocorre um evento de clivagem proteolítica, que remove uma pequena cadeia N-terminal com 14 resíduos de aminoácidos, e resulta na formação de um local de ligação ao níquel, composto por seis resíduos de aminoácidos. A transcrição da peptidase envolvida neste evento proteolítico é, também ela, regulada pela presença de níquel (Sigel, Sigel et al. 2007). Deste modo, o níquel desempenha uma função tripla na biossíntese de Ni-SOD: estimula a sua transcrição, regula a sua modificação pós-transcricional e é essencial para a sua

activação. A presença de níquel demonstrou ser capaz de activar a expressão do gene de Ni-SOD e reprimir a de Fe-SOD. No caso em que o níquel desempenha um papel de estimulador da transcrição de Ni-SOD, ainda não foram caracterizados os genes ou elementos reguladores envolvidos no processo. Na sua função inibidora da expressão de Fe-SOD, sabe-se que o níquel se liga a uma proteína repressora ainda não identificada que, por sua vez, se ligará ao DNA, desactivando a expressão do enzima com centro de Fe. O níquel não regula directamente a concentração deste putativo repressor mas afecta a sua afinidade de ligação ao DNA (Mulrooney e Hausinger 2003).

### **3.1.2. Resistência e Tolerância ao Níquel em Sistemas Vivos**

#### **3.1.2.1. Bioconcentração, Bioacumulação e Biomagnificação**

Na literatura científica, estes três conceitos – Bioconcentração, Bioacumulação e Biomagnificação – são ambíguos, não existindo consenso sobre o seu significado e sendo muitas vezes aplicados em situações divergentes. Por esta razão, o Comité Científico para a Toxicidade, Ecotoxicidade e Ambiente (CSTEE – ‘Comité Scientifique de Toxicologie, Ecotoxicologie et l'Environnement’) da Directoria Geral da Saúde e Protecção ao Consumidor da Comissão Europeia emitiu, em Novembro de 2000, um documento de opinião onde, entre outras disposições, define estes três conceitos da seguinte forma (CSTEE 2000):

- Bioacumulação é a absorção total por parte do organismo vivo através de todas as formas de exposição (bioconcentração por alimentação e exposição ambiental no ar, água, solo, sedimentos, etc.);

- Bioconcentração é a absorção directa de um determinado químico proveniente de um compartimento ambiental externo (ar, água) através de superfícies de troca gasosa (folhas nas plantas, sistemas respiratórios e, numa menor extensão, pele nos animais). A bioconcentração é um processo físico-químico simples baseado no particionamento entre diferentes fases em equilíbrio;

- Biomagnificação é a acumulação e transferência de compostos químicos através da cadeia alimentar devido a ingestão, resultando num aumento das concentrações internas em organismos de níveis tróficos superiores.

De acordo com estas definições, a bioconcentração reflecte, no organismo, as concentrações de um determinado químico no ambiente ao qual este está exposto; a bioacumulação é o resultado de um mecanismo de captura e armazenamento de um determinado composto pelo organismo, que o acumula a níveis superiores aos existentes no meio ambiente; a biomagnificação reflecte a acumulação de determinado composto químico ao longo da cadeia trófica e resultará das acções conjuntas dos dois mecanismos anteriores, bioconcentração e bioacumulação. Ao longo deste trabalho, estes conceitos serão utilizados no âmbito em que foram definidos nesta secção.

### **3.1.2.2. Biomonitorização**

A poluição por metais é um assunto ambiental que tem constituído, desde há algumas décadas, uma preocupação para vários países desenvolvidos ou em desenvolvimento. Existe uma necessidade substancial de compreender os mecanismos de bioacumulação e toxicidade de metais em organismos aquáticos (Wang e Rainbow 2008). Um dos pré-requisitos mais importantes de um programa de biomonitorização é o de que as populações de organismos utilizados como bioindicadores respondam igualmente à biodisponibilidade de metais, independentemente da localização (Wang e Rainbow 2005). Deve garantir-se que a concentração de metais encontrada no organismo reflecte a biodisponibilidade do metal no ambiente e é independente dos mecanismos bioquímicos e fisiológicos do próprio organismo (Wang e Rainbow 2008). A questão de como um determinado metal é processado por um organismo é importante, não apenas em termos de toxicidade, mas também para a compreensão do ciclo biogeoquímico desse metal no ambiente (Hall 1982). Os metais manifestam os seus efeitos adversos na natureza eliminando, provavelmente, algumas espécies e mantendo outras inafectadas. É importante determinar quais as espécies mais susceptíveis de serem eliminadas; estas constituirão bioindicadores úteis dos efeitos prejudiciais dos metais e serão os impulsionadores das alterações dos ecossistemas em resposta à contaminação por metais (Luoma e Rainbow 2005).

### **3.1.2.3. Regulação das Concentrações Intracelulares de Níquel**

De um modo geral, os organismos marinhos regulam as concentrações internas de metais através de mecanismos de regulação activa, armazenamento ou uma combinação de ambos. Os organismos cuja homeostase se baseia em mecanismos de regulação activa mantêm estáveis as concentrações de metais nos tecidos excretando-os a velocidades comparáveis às de captura. Os outros organismos armazenam os metais sob formas inertes não tóxicas, como sejam grânulos inorgânicos insolúveis ou ligados a proteínas tipo metalotioninas.

Alguns estudos apontam para a essencialidade do níquel em alguns animais marinhos. É, portanto, provável que estes tenham desenvolvido mecanismos que lhes permitam manter a concentração interna de níquel sob uma vasta gama de concentrações externas (no ambiente). A própria existência de mecanismos de regulação da concentração intracelular de níquel em animais marinhos, vertebrados e invertebrados, sugere a essencialidade deste metal. No entanto, a essencialidade do níquel nestes organismos permanece desconhecida, uma vez que ainda não se conseguiu encontrar um metaloenzima de níquel nos seus tecidos (Muysen, Brix et al. 2004).

### **3.1.2.4. Mecanismos de Resistência e Tolerância ao Níquel**

São bem conhecidos e foram já extensamente estudados os mecanismos de resistência contra a toxicidade induzida por níquel em plantas terrestres. Estas estratégias compreendem mecanismos de exclusão e sequestração, ligação a ligandos fortes e outros mecanismos como o aumento da actividade de enzimas anti-oxidantes (Sigel, Sigel et al. 2007). Tanto a exclusão como a sequestração constituem processos de transporte de metais contra um gradiente de concentração, necessitando, por isso, de um sistema de transporte activo. Com as devidas precauções, e à falta de um conhecimento aprofundado nesta área em organismos marinhos, é plausível utilizar estes exemplos como putativas estratégias generalistas contra a toxicidade induzida por níquel e mecanismos de bioacumulação em outros organismos.

A exclusão constitui um mecanismo muito comum na resistência de organismos vivos para o níquel. Na planta do trigo, o níquel induz um aumento da actividade de

peroxidases extracelulares que levam à produção de compostos fenólicos que reduzem a permeabilidade inespecífica das raízes (Sigel, Sigel et al. 2007). Em algumas espécies de pinheiros encontrou-se uma correlação entre a capacidade de exclusão de níquel e a associação de um fungo às raízes da planta. É possível que este fungo excrete ligandos fortes para o metal que reduzam a sua biodisponibilidade (Sigel, Sigel et al. 2007). Este exemplo levanta a questão da influência dos simbioses nos mecanismos de resistência e acumulação de metais. No entanto, os mecanismos fisiológicos e bioquímicos desta supressão da captura de níquel não são ainda compreendidos e não é possível excluir a hipótese de que esta correlação entre a resistência ao níquel e a infecção por fungos seja uma mera coincidência.

Outra estratégia de tolerância ao níquel, existente em plantas e também já encontrada noutros organismos, é a sequestração do metal em compartimentos celulares (Sigel, Sigel et al. 2007), muitas vezes formando grânulos inorgânicos (Wang e Rainbow 2008), que mantêm o metal inerte, de forma a proteger a célula contra potenciais danos desencadeados em reacções de oxidação. Este é o principal mecanismo de destoxificação utilizado por organismos bioacumuladores (Sigel, Sigel et al. 2007).

A ligação a ligandos fortes para o níquel constitui também uma forma alternativa da tolerância a metais pesados. Estes ligandos formam compostos altamente estáveis com o metal, reduzindo a sua biodisponibilidade e prevenindo reacções indesejáveis com outros ligandos intracelulares. Como exemplos deste tipo de compostos incluem-se as fitoquelatinas (quelantes de cádmio em plantas, embora estas pareçam ter uma afinidade reduzida para o níquel), metalotioninas, ácidos orgânicos (como malato e citrato) e aminoácidos (como a histidina). A parede celular ou a membrana plasmática de alguns organismos constituem também importantes quelantes de metais. Em plantas aquáticas e algas, a parede celular está em contacto directo com o meio e funciona como um trocador catiónico (Sigel, Sigel et al. 2007).

Alguns organismos parecem acumular especificamente determinado(s) metal(ais) em quantidades muito superiores às existentes no ambiente, num mecanismo conhecido como bioacumulação. Nesta situação, os processos de tolerância a metais pesados estarão orientados no sentido de lidar com elevadas concentrações de metais que, muitas vezes com funções ainda não identificadas, o organismo necessita. Na secção seguinte reportam-se alguns casos de bioacumulação encontrados na literatura, com especial ênfase sobre a bioacumulação em organismos marinhos.



### 3.1.2.5. Bioacumulação de Metais Pesados

Existem vários factores que influenciam a bioacumulação de metais: a especificidade do metal, influências ambientais (salinidade, pH, temperatura, existência ou pré-exposição a outros metais, etc.), via de exposição e características inerentes à espécie do organismo. A captura e eliminação de metais e outros compostos inorgânicos por organismos vivos não ocorrem através de simples processos de difusão (Muysen, Brix et al. 2004). Pelo contrário, a acumulação de metais em sistemas vivos ocorre através de mecanismos fisiológicos biocinéticos; ou seja, a bioacumulação é o resultado do balanço entre a captura de metais e a sua eliminação do organismo (Luoma e Rainbow 2005) – um equilíbrio entre assimilação e excreção. A captura de metais dá-se geralmente por alimentação e/ou por assimilação de formas dissolvidas (Luoma e Rainbow 2005). A eliminação dá-se por processos fisiológicos de excreção (renal, hepática ou branquial, em animais com este tipo de diferenciação de tecidos), destoxificação ou armazenamento (Muysen, Brix et al. 2004).

Na Natureza são muitos e variados os casos de bioacumulação de diferentes metais. Seguidamente, descrevem-se alguns exemplos considerados mais relevantes no âmbito deste trabalho, focando, obviamente, a bioacumulação de metais em organismos marinhos.

Um dos primeiros casos reconhecido como bioacumulação reporta a 1981 quando Benson e Summons observaram a acumulação de arsénico em invertebrados marinhos da Grande Barreira de Coral (Benson e Summons 1981). Esta acumulação parecia estar associada ao metabolismo de síntese de fosfolípidos de membrana. O arsenato presente nas águas oceânicas seria assimilado por *zooxanthellae* simbióticas e subsequentemente depositado no tecido do hospedeiro, concretamente moluscos e ascídias. Em ostras do género *Tridacna*, os valores de arsénico atingiam, no rim, valores entre 600 e 1025 ppm (Benson e Summons 1981).

Em 1982, Hall reportava, no organismo zooplânctónico *Daphnia magna*, a acumulação de níquel na forma iónica livre, localizado especificamente na carapaça do animal (Hall 1982). A entrada de níquel na célula parecia ser controlada por dois mecanismos diferentes: um que exibia uma cinética de saturação tipo Michaelis-Menten

e que deveria operar a baixas concentrações de níquel, ou seja, ambientes pouco contaminados; outro que funcionaria quando o organismo estava exposto a maiores concentrações do metal e cuja taxa de incorporação era linear (Hall 1982).

Em 1988, foi isolado um porfinóide de níquel no tunicado *Trididemnum solidum*. Este pigmento azul-esverdeado foi designado por tuniclorina e foi proposto o envolvimento de uma putativa alga simbiote na biossíntese deste composto (Bible, Buytendorp et al. 1988). Até à data, o cofactor P430 e a tuniclorina constituem os únicos exemplos conhecidos de porfinóides de níquel.

Na bactéria *Bradyrhizobium japonicum* foi demonstrado que, quando exposta à presença de níquel, é capaz de o acumular, sequestrar intracelularmente e armazená-lo até que seja necessário para a biossíntese do enzima hidrogenase (Maier, Pihl et al. 1990). O níquel acumulado encontra-se ligado a componentes citoplasmáticos, parecendo associar-se concretamente a proteínas solúveis que foram parcialmente isoladas. A acumulação de níquel não era directamente correlacionável com a síntese do enzima hidrogenase, mas o estado nutricional prévio da célula em termos de níquel afectava a capacidade do microrganismo sintetizar o enzima (Maier, Pihl et al. 1990)

No final da década de 70, é descoberta a bactéria *Alcaligenes eutrophus* nos sedimentos da cave de decantação de uma fábrica de zinco na Bélgica (Taghavi, Mergeay et al. 1997; Mergeay, Monchy et al. 2003). Esta bactéria, também anteriormente designada por *Ralstonia eutropha* e, mais recentemente, por *Ralstonia metallidurans* (nome actualmente considerado como o mais correcto), demonstrou ser altamente resistente a uma variedade de metais pesados, como Zn(II), Cd(II), Co(II), Ni(II), Cu(II),  $\text{CrO}_4^{2-}$ , Hg(II) e Pb(II) (Mergeay, Monchy et al. 2003). Esta  $\beta$ -Proteobacteria, de metabolismo quimiolitotrófico facultativo, tem a capacidade de crescer em ambientes altamente contaminados e é considerada o modelo para os mecanismos de resistência bacterianos a metais tóxicos. Este microrganismo possui dois grandes plasmídeos, pMOL28 e pMOL30, onde se alojam uma série de genes e operões responsáveis pelos mecanismos de resistência a metais (Mergeay, Monchy et al. 2003). Estes formam um sistema complexo e eficiente de efluxo de metais, constituído por proteínas intramembranares, impedindo a sua acumulação no interior da célula.

Acoplado a este sistema de efluxo está um processo de bioprecipitação, que se presume ser uma estratégia pós-excreção, desenvolvida para impedir que os íons metálicos excretados voltem a entrar na célula. Devido à actividade do sistema de excreção de metais, forma-se uma zona super-saturada de metais em redor da célula. Com o aumento da concentração metálica, aumenta também o pH devido ao sistema de transporte de protões para o citoplasma que ocorre durante o mecanismo de excreção metálica. O dióxido de carbono, produzido pelo metabolismo celular, neste gradiente de pH, transforma-se em carbonatos e bicarbonatos, que logo precipitam com os catiões metálicos. Esta cristalização inicia-se ao nível das proteínas existentes na camada mais externa da membrana citoplasmática, que funcionam como núcleos de cristalização (Taghavi, Mergeay et al. 1997). O resultado final é uma acumulação metálica ao nível da zona externa da membrana citoplasmática da bactéria.

Os principais mecanismos de resistência a metais em bactérias baseiam-se em sistemas de excreção, redução ou complexação dos íons metálicos. No parágrafo anterior foi já referido um exemplo do primeiro caso. Na bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, o principal mecanismo de acumulação de metais, e concretamente de níquel, parece ser a sequestração em compartimentos intracelulares sob a forma de cristais de fosforetos e carbonetos,  $Ni_5P_4$ ,  $NiP_2$ ,  $Ni_{12}P_5$  e  $Ni_3C$  (Sar, Kazy et al. 2001). Estudos de microscopia electrónica de transmissão e energia dispersiva de raios-X demonstraram que cerca de 58% do níquel acumulado pela bactéria se encontra na zona periplasmática e 30% associado a componentes da membrana. Esta deposição localizada de níquel na zona membranar dever-se-á ao carácter aniónico da membrana, providenciado pelos grupos fosforilo e carboxilo existentes nos vários constituintes membranares (Sar, Kazy et al. 2001).

A cianobactéria *Synechococcus*, organismo unicelular fotossintético pertencente ao fitoplâncton oceânico, demonstrou acumular níquel em concentrações 100 a 10000 vezes superiores às do meio ambiente (Dupont, Barbeau et al. 2008). O seu crescimento em meio laboratorial demonstrou ser altamente dependente de níquel, provavelmente devido à exigência metabólica deste metal para a concatenação dos enzimas urease e superóxido dismutase, existentes neste microrganismo (Dupont, Barbeau et al. 2008).

Existirão, com certeza, outros casos de bioacumulação de níquel e outros metais não reportados neste trabalho. No entanto, todos estes estudos levantam várias questões: 1) como distinguir bioacumulação de contaminação ambiental? O organismo acumula o metal porque efectivamente tem necessidades metabólicas a serem satisfeitas ou a acumulação resulta apenas de um mecanismo de destoxificação? 2) Existirá níquel biodisponível suficiente para suplantar as necessidades metabólicas dos organismos? Alguns autores defendem a possibilidade da limitação de níquel em ambientes naturais (Dupont, Barbeau et al. 2008) e outros chegam mesmo a apontar esta limitação como o evento desencadeador da passagem para uma atmosfera rica em oxigénio (Konhauser, Pecoits et al. 2009); 3) Em organismos mutualísticos, como distinguir o organismo bioacumulador?

Para além do levantamento de questões cientificamente relevantes, o estudo do fenómeno da bioacumulação demonstrou já o seu impacto na biotecnologia, levando ao desenvolvimento ou servindo de inspiração para novos sistemas de bioremediação de ambientes contaminados.

### **3.1.3. Família *Clionidae* e espécie *Suberites carnosus***

A ordem Hadromerida, pertencente à classe Demospongia, compreende 13 famílias, entre as quais as famílias *Clionidae* e *Suberitidae*, e 26 subfamílias reconhecidas actualmente. As esponjas pertencentes a esta ordem caracterizam-se por uma distribuição uniforme de espículas siliciosas, são frequentemente esponjas massivas embora se incluam também formas perfurantes ou incrustantes. As fibras de espongina são geralmente pouco desenvolvidas, se presentes de todo, originando frequentemente uma consistência firme, pouco elástica e quebradiça. No entanto, em vários géneros, como é exemplo a *Suberites carnosus*, a espongina é abundante, fazendo com que estas esponjas sejam mais elásticas e compressíveis. São comuns as cores claras e apelativas, como amarelo, laranja e vermelho, mas estas não podem ser utilizadas como critério taxonómico e, em alguns casos, como nas esponjas incrustantes, a coloração exibida pela esponja pode ser proveniente da presença de simbiontes. A maioria dos grupos pertencentes a esta ordem reproduz-se de forma ovípara, com a

libertação dos ovos e posterior desenvolvimento larvar directamente na coluna de água (Hooper e Soest 2002).

### 3.1.3.1. *Suberites carnosus*



Figura 3.11 - Aspecto típico de uma esponja da espécie *Suberites carnosus* (Picton, Morrow et al. 2007)

Pertencente à família *Suberitidae*, esta espécie caracteriza-se pelo seu tamanho massivo, em forma de figo, oca e contráctil, fixando-se ao substrato através de uma espécie de pedúnculo. Possui, usualmente, apenas um ósculo, embora possa ter mais que um, sempre localizados na face superior da esponja. De superfície muito suave ao toque, quase aveludada, esta espécie pode apresentar colorações de vários tons desde amarelo claro, amarelo acastanhado, laranja claro e castanho. A sua consistência é extremamente macia quando completamente expandida dentro de água e firme e moderadamente elástica quando fora dela. Esta espécie encontra-se geralmente fixa a superfícies rochosas horizontais, crescendo verticalmente, ou em zonas lodosas, fixas a conchas ou pedras enterradas na lama (Picton, Morrow et al. 2007).

### 3.1.3.2. Família *Clionidae* e “Complexo *Cliona viridis*”

A família *Clionidae* compõe-se de 8 géneros, entre os quais se inclui aquele que lhe dá o nome: género *Cliona*. Historicamente, a família *Clionidae* era aplicada a

esponjas capazes de perfurar substratos calcáreos – esponjas escavantes, perfurantes ou incrustantes. No entanto, actualmente reconhecem-se outros grupos de esponjas, não relacionadas com o género *Cliona*, que possuem capacidade perfurante (Hooper e Soest 2002).

A perfuração do substrato ocorre de forma mecânica e química e é conseguida através da libertação de compostos químicos corrosivos, segregados por células especiais da esponja, que provocam a libertação de partículas diminutas que são depois expelidas na corrente exalante; a quantidade de carbonato de cálcio dissolvido, através da perfuração química do substrato, é três vezes superior à quantidade de partículas expelidas pela esponja resultantes do processo de bioerosão mecânica, ou seja, o principal produto desta bioerosão é carbonato de cálcio sob a forma dissolvida (Zundeleovich, Lazar et al. 2007). Esta perfuração resulta na formação de uma rede tridimensional de câmaras e galerias por debaixo da superfície do substrato, que são depois preenchidas por tecido da própria esponja e espículas sem orientação definida. A comunicação com a coluna de água é mantida através de papilas, munidas de óstios e ósculos, que se projectam ligeiramente da superfície do substrato, podendo formar uma crosta contínua de tecido de esponja. Estas papilas são, muitas vezes, fortalecidas por células contrácteis e espículas formando arranjos bem organizados (Hooper e Soest 2002).

Durante o seu crescimento, as esponjas perfurantes podem passar por três fases: forma alfa ( $\alpha$ ), forma beta ( $\beta$ ) e forma gama ( $\gamma$ ). Na forma  $\alpha$ , a maior parte do tecido vivo da esponja está oculto nos túneis e galerias formados no interior do substrato e apenas são visíveis as papilas inalantes e exalantes. Na forma  $\beta$ , a esponja, através da fusão das papilas, forma uma crosta, cobrindo a superfície do substrato perfurado. Na forma  $\gamma$ , a esponja torna-se massiva (López-Victoria, Zea et al. 2004), suplantando e englobando o substrato original (Hooper e Soest 2002). Algumas espécies permanecem na fase  $\alpha$ , outras começam por ser incrustantes (forma  $\beta$ ) e mantêm-se como tal e muito poucas atingem a fase  $\gamma$ . Não se sabe se as fases de crescimento são ditadas geneticamente e/ou controladas por factores ambientais (López-Victoria, Zea et al. 2004).



Figura 3.12 - Aspecto típico de uma *Cliona viridis* na forma  $\beta$  (retirado de [http://www.horta.uac.pt/species/Porifera/cf\\_Cliona\\_viridis/cf\\_Cliona\\_viridis.html](http://www.horta.uac.pt/species/Porifera/cf_Cliona_viridis/cf_Cliona_viridis.html))

Devido à sua capacidade perfurante, estas esponjas são também denominadas de esponjas bioerosivas, uma vez que a sua actividade escavante leva à degradação dos substratos rochosos calcáreos. Visto que estas esponjas se demonstraram capazes de colonizar as barreiras de corais, pensa-se que elas estejam entre alguns dos factores responsáveis pela erosão que se tem vindo a observar cada vez mais frequentemente nestes substratos e, principalmente, na Grande Barreira de Coral Australiana. Pensa-se que a actividade erosiva destas esponjas possa acelerar o declínio dos recifes de corais, originando um desvio de comunidades dominadas por corais para o domínio das esponjas perfurantes (Schönberg e Suwa 2007). Elas são também capazes de perfurar a concha calcárea dos bivalves (Rosell, Uriz et al. 1999), tornando-a mais frágil, e afectando de um modo geral a saúde do molusco e, obviamente, diminuindo o seu valor comercial. Por esta razão, estas esponjas são consideradas verdadeiras pragas em viveiros de bivalves.

Algumas das esponjas bioerosivas mais competitivas e destrutivas são as que contêm dinoflagelados simbiotes do tipo *zooxanthellae* (Sarà e Liaci 1964). A presença de *zooxanthellae* demonstrou melhorar o crescimento, taxa de sobrevivência e capacidade bioerosiva destas esponjas (Schönberg 2002). No entanto, tem existido grande confusão e desacordo entre a comunidade científica sobre o número de espécies bioerosivas e a sua identificação, pois muitas vezes a atribuição taxonómica a uma

determinada espécie pode ser extremamente complicada devido às semelhanças que as várias espécies de esponjas perfurantes possuem entre si. Por isso criou-se a designação “Complexo *Cliona viridis*”, onde se incluem todas as espécies de esponjas bioerosivas que possuam *zooxanthellae* associados. As características comuns às espécies pertencentes a este grupo incluem estilo de vida perfurante, coloração esverdeada a acastanhada, e presença de *zooxanthellae* (Schönberg 2002). Neste “complexo” incluem-se espécies como *Cliona viridis*, *Cliona caribbeae*, *C. nigricans*, *C. orientalis* e *Anthosigmella varians* (também designada por *Cliona varians*) (Schönberg 2002). Mais recentemente, foi também proposta como membro deste grupo a espécie *Cliona parenzani* (Vacelet, Bitar et al. 2008).

Nem todas as esponjas perfurantes possuem *zooxanthellae*. Dentro da família Clionidae, a espécie *Cliona celata* destaca-se pela sua coloração amarelo vivo e consistência forte, devido a um reforço de espículas no ectossoma (Hooper e Soest 2002). Embora seja reportada como possuindo um estilo de vida críptico e perfurante, ela não faz parte do “Complexo *Cliona viridis*” nem se observou a presença de dinoflagelados nos seus tecidos. Na costa portuguesa, esta esponja é quase sempre encontrada na sua fase gama, formando esponjas de tamanho considerável, massivas, irregulares, com papilas grandes e bem definidas (Joana Xavier, anotações pessoais). Curiosamente, esta espécie também se demarca da sua congénere *Cliona viridis* nos teores de níquel acumulados, possuindo concentrações deste metal na mesma ordem que os sedimentos da zona onde as esponjas foram recolhidas (Araújo, Conceição et al. 2003).

#### **3.1.4. Dinoflagelados *Zooxanthellae***

Na literatura científica, não é consensual a classificação taxonómica dos dinoflagelados. Para os botânicos, os dinoflagelados são algas microscópicas pertencentes à divisão *Dinophyta*; para os zoólogos, estes são eucariotas pertencentes ao filo *Dinoflagellata*. Estes organismos são, na sua grande maioria, unicelulares e possuem, na zona ventral, dois flagelos dissimilares. Cerca de 90% das espécies são marinhas, vivendo, as restantes, em habitats dulcícolas. Os dinoflagelados podem ser



fotossintéticos, possuindo cloroplastos e pigmentos fotossintéticos específicos que servem de critério para a sua identificação. No entanto, cerca de metade dos dinoflagelados não possuem cloroplastos e, portanto, são organismos heterotróficos obrigatórios, alimentando-se fagotrophicamente, ingerindo bactérias e pequenas algas planctónicas. Existem ainda formas heterotróficas facultativas (Hoek, Mann et al. 1995).

Embora a grande maioria dos dinoflagelados seja planctónica, existem espécies bentónicas que vivem embebidos nos tecidos de alguns invertebrados marinhos - como corais, anémonas e esponjas – foraminíferos e moluscos. No interior do tecido do hospedeiro, estes organismos ocorrem sob a forma de células cocoides, de coloração amarelo-acastanhado, que podem habitar intra ou inter-celularmente, e são denominados *zooxanthellae*, ou *zoochlorellae*, no caso dos endosimbiontes de cor verde que habitam hospedeiros de água doce (Hoek, Mann et al. 1995).

Os *zooxanthellae* possuem um núcleo grande, onde se encontra o seu material genético, e mitocôndrios que controlam a actividade metabólica celular. O plastídeo possui tilacóides, onde se encontram os pigmentos fotossintéticos, e o corpo pirenoide, rodeado por uma camada de amido. Em algumas células é possível observar uma bolsa redonda que parece vazia, denominada corpo lipídico. Estes são os principais produtos de reserva destes organismos: amido e lípidos. O pigmento fotossintético característico dos *zooxanthellae* é a peridinina, que lhes confere a coloração amarelada, e cuja detecção serve de indicação da presença de *zooxanthellae* por ser um pigmento exclusivamente específico deste grupo (Rudman 2000).

#### **3.1.4.1. *Symbiodinium spp.* – *zooxanthellae* associados a invertebrados marinhos**

Em 1962, Hugo Freudenthal, após estudos de microscopia óptica dos dinoflagelados associados à anémona *Cassiopeia*, observou que estes possuíam características morfológicas diferentes dos dinoflagelados assimbióticos (com um estilo de vida livre) e propôs a criação do género *Symbiodinium* (Freudenthal 1962). Inicialmente, pensava-se que todos os dinoflagelados simbióticos pertenciam a uma só espécie pandémica, *Symbiodinium microadriaticum*, mas, em estudos posteriores, descobriu-se que esta “espécie” é um conjunto complexo de diferentes estirpes (Hoek,

Mann et al. 1995) ou grupos filogenéticos, cada uma geneticamente distinta (Wilcox 1998) e que varia com uma série de parâmetros (Coffroth e Santos 2005) como o hospedeiro (Schönberg e Loh 2005), localização geográfica, temperatura, profundidade (Frade, Jongh et al. 2008) (que está relacionada com a intensidade luminosa) e até mesmo localização dentro do tecido do hospedeiro (Schönberg e Suwa 2007). Na maioria dos casos, estas microalgas são intracelulares, residindo em vacúolos complexos do hospedeiro; no entanto, alguns invertebrados alojam os seus simbioses intercelularmente em sistemas tubulares elaborados (Coffroth e Santos 2005).

As relações simbióticas envolvendo dinoflagelados foram já extensivamente estudadas em cnidários e moluscos mas ainda não foram totalmente exploradas em esponjas (Schönberg e Loh 2005). Em hospedeiros coralinos, sabe-se que a base desta simbiose é nutricional, desempenhando, os dinoflagelados, um papel significativo na nutrição e aspectos fisiológicos do hospedeiro. A presença de *Symbiodinium* facilita a assimilação e conservação do azoto, aumenta a velocidade de calcificação e a permuta de carbono fixado fotossinteticamente do simbiote para o coral (Coffroth e Santos 2005). Embora a transmissão vertical de *zooxanthellae* seja comum, na grande maioria dos invertebrados estudados, os novos indivíduos têm que ser “infectados” com dinoflagelados provenientes de ‘pools’ ambientais – transmissão horizontal – oferecendo, à progeria do hospedeiro, uma oportunidade de se associarem a *Symbiodinium* melhor adaptados às condições ambientais locais, o que pressupõe a existência de diversidade funcional e genética entre os simbioses (Trench 1997; Coffroth e Santos 2005).

Estudos filogenéticos realizados através de técnicas de hibridização, extração e amplificação e electroforese de DNA de gradiente desnaturante, inferidos a partir de diferentes moléculas - DNA ribossomal (Rowan e Powers 1992), mitocondrial (Takabayashi, Santos et al. 2004) e dos cloroplastos (Santos, Taylor et al. 2002) -, levaram à descoberta de uma variabilidade inesperadamente elevada das sequências de *Symbiodinium* (Rowan e Powers 1992; Wilcox 1998; López-García, Rodríguez-Valera et al. 2001; Pawlowski, Holzmann et al. 2001; Staay, Wachter et al. 2001). Esta observação levou à adopção e desenvolvimento de um novo esquema de classificação que divide o género *Symbiodinium* em vários outros grupos filogenéticos (‘clades’).

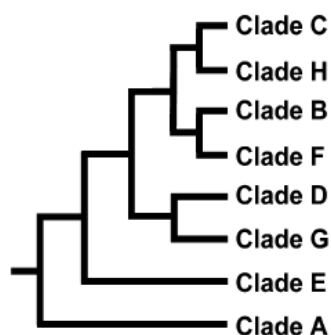


Figura 3.13 - Relações filogenéticas entre os principais grupos de *Symbiodinium*; a posição dos grupos B, C, F e H varia de acordo com o método de construção da árvore filogenética e das moléculas analisadas; todos os grupos filogenéticos, excepto as classes E e H, foram identificados em corais; os simbiontes pertencentes aos grupos A, B, C e D são predominantes em corais da classe Scleractinia, o grupo B é dominante em octocorais existentes nas Caraíbas e os grupos A e C são comuns em octocorais do Mar Vermelho e do Pacífico, respectivamente; o grupo E foi identificado numa anémone e os grupos F, G e H são comuns em foraminíferos (Coffroth e Santos 2005).

Assim, neste sistema, o grupo A forma um cluster com o grupo E, que é intermediário entre A e os outros grupos (B/C/D/F/G/H), que formam um segundo complexo filogeneticamente mais próximo. Entre estes, D/G são basais em relação a B/C/F/H, os grupos C e H são grupos-irmãos e mais próximos do grupo F. Dentro de cada um dos grupos existe ainda diversidade genética, fazendo com que cada grupo seja compreendido por múltiplas estirpes ou “espécies” (Coffroth e Santos 2005).

A diversidade de *Symbiodinium* presente em cada um dos hospedeiros parece ser ditada por um equilíbrio entre especificidade e flexibilidade. Enquanto que alguns estudos indicam que um determinado tipo de *Symbiodinium* se associa apenas a uma ou algumas espécies de hospedeiros – especificidade - em muitos casos, um dos parceiros é mais flexível, de modo que a espécie hospedeira se associa a vários tipos de simbiontes e alguns tipos de simbiontes são encontrados numa grande variedade de hospedeiros. Existem subtis diferenças bioquímicas entre tipos de células idênticas em espécies congêneres, fazendo com que cada uma delas possa ser considerada um nicho específico para *Symbiodinium* únicos. O hospedeiro não é, de modo algum, uma entidade estática e deve ser tido em conta como uma força selectiva poderosa na criação e manutenção da variabilidade genética de *Symbiodinium*. Também a coevolução pode ser uma força motora ou um resultado da evolução da especificidade de uma simbiose. No entanto,

esta ainda não foi convenientemente substanciada em sistemas hospedeiro-*Symbiodinium* (Coffroth e Santos 2005).

a) *Symbiodinium* spp. em esponjas marinhas

Em 1964, Sarà e Liaci reportavam, pela primeira vez, a existência de uma associação simbiótica entre *zooxanthellae* e duas esponjas marinhas do género *Cliona* (Sarà e Liaci 1964). Até àquela data, já havia sido reportada a presença destas algas microscópicas noutros organismos marinhos, como moluscos, ascídias, corais, anémonas, etc. (Zahl e McLaughlin 1957). Actualmente são conhecidas diversas associações entre esponjas e algas, como sejam cianobactérias unicelulares ou multicelulares, ou até macro-algas. Mas a presença de dinoflagelados *zooxanthellae* em esponjas só está documentada para a família *Clionidae* (Vacelet 1981), salvo algumas excepções das quais é exemplo a espécie *Haliclona* sp. (Garson, Flowers et al. 1998), e os aspectos morfológicos e fisiológicos desta associação estão ainda por desvendar. Embora as esponjas perfurantes desempenhem um papel ecológico fundamental nos recifes de coral, sendo agressivas competidoras espaciais e aumentando a bioerosão dos substratos bentônicos, os estudos sobre as relações simbióticas entre esponjas e dinoflagelados são escassos e muito recentes (Granados, Camargo et al. 2008).

As relações de proximidade e associação entre esponjas bioerosivas e corais levantam a questão da origem dos dinoflagelados presentes nas esponjas. Não se sabe se as esponjas adquirem os seus simbiosomas de organismos zooxantelados vizinhos – transmissão horizontal – ou se as populações de *Symbiodinium* são de origem parental – transmissão vertical. Também pode ser uma combinação de ambos. Os estudos realizados até agora não são consensuais. A identificação molecular dos dinoflagelados existentes na esponja *Cliona orientalis* aponta para uma extrema especificidade dos simbiosomas. Em regiões que distam mais de 1300 km, as identidades genéticas e diversidades populacionais dos *Symbiodinium* associados a esta esponja são consistentes, mesmo em condições ambientais díspares (Schönberg e Loh 2005). Para além disso, os dinoflagelados da esponja são bastante diferentes dos encontrados nos corais vizinhos. Estas observações suportam as ideias de que as simbioses entre esponjas bioerosivas e *Symbiodinium* se desenvolveram independentemente dos corais que elas invadem e que os simbiosomas adquiridos, nestas esponjas, são uma herança maternal (transmissão vertical) (Schönberg e Loh 2005). A transmissão vertical dos

*zooxanthellae* nas esponjas tinha já sido observada em trabalhos anteriores (Rosell 1993).

Os estudos de filogenia dos *Symbiodinium* associados às esponjas realizados até agora apontam para a presença de simbiontes pertencentes ao grupo filogenético G, tanto em esponjas provenientes do Pacífico como do Oceano Atlântico (Schönberg e Loh 2005; Granados, Camargo et al. 2008). Estas observações são surpreendentes e apontam para que estes sejam uma relíquia filogenética de ancestrais comuns em esponjas ou uma invasão de esponjas provenientes do Indo-Pacífico (Granados, Camargo et al. 2008). Este último trabalho (Granados, Camargo et al. 2008), reporta ainda a existência de *Symbiodinium* dos grupos A e B, mas estes são comuns em organismos existentes no Atlântico. Um outro estudo determinou que os dinoflagelados se movem no interior do tecido da esponja, concentrando-se à superfície desta durante o dia e adquirindo uma distribuição mais uniforme durante a noite (Schönberg e Suwa 2007). Os autores sugerem que este comportamento ajuda a maximizar o rendimento fotossintético dos simbiontes durante as horas de incidência luminosa, minimiza a perda de simbiontes durante a noite e pode ser utilizado em períodos de stress, movendo os simbiontes para zonas mais interiores do tecido da esponja e do substrato, constituindo, deste modo, uma forma de resistir a fenómenos de 'bleaching' (Schönberg e Suwa 2007).

## 3.2. PARTE EXPERIMENTAL

### 3.2.1. Materiais e Métodos

Tal como no capítulo anterior, todas as soluções utilizadas no decorrer deste trabalho foram preparadas em água MilliQ® da Wasserlab, excepto quando especificado. Todos os reagentes utilizados, excepto se especificado o contrário, possuíam grau de pureza analítico.

As esponjas utilizadas nesta secção encontram-se descritas na seguinte tabela:

Esponja	Espécie	Local e Data de Recolha	Condições de Armazenamento		
B21 (a)	<i>Cliona viridis</i>	Berlengas, 1998	Liofilizada, T <sup>a</sup> amb.		
B130 (a)			Congelada a -20°C		
B146 (a)					
B404 (a)					
B417 (a)					
B450 (a)					
Az05/1 (a)				Açores, 2005	
Az1206/1 (a)				Açores, 2006	
Az1206/2 (a)				Berlengas, 2007	
Ber07/1 (b)					
Ber07/2 (b)					
Ber07/3 (b)		Norte de Espanha, 2003	Liofilizada, T <sup>a</sup> amb.		
Ber07/100 (b)					
L'escala (c)		<i>Suberites carnosus</i>	Madeira, 1998	Congelada a -20°C	
Tenaciar (c)	<i>Cliona varians</i>		Bahamas, 2004		
B179 (a)			<i>Cliona celata</i>		Berlengas, 2004
Varians (a)					Ferrol, 2003
B418 (a)					<i>Cliona parenzani</i>
Fe03 (a)	Chipre, 2007				
Med07/1 (d)					
Med07/2 (d)					

Tabela 3.1 - Listagem das esponjas utilizadas no trabalho que consta no capítulo 3 da presente dissertação.

Após a sua recolha, as esponjas assinaladas por (a) foram colocadas em sacos de plástico individuais, com o devido código de identificação, transportadas até ao laboratório imersas em água do mar, em contentores refrigerados, onde foram posteriormente congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até à sua utilização. As esponjas assinaladas por (b) foram colocadas, após recolha e chegada ao laboratório, num aquário com água do mar com recirculação de água, dentro dos respectivos sacos de plástico, durante cerca de 1 semana. Posteriormente foram limpas e passadas por água do mar sintética estéril, foram-lhes retirados alguns pequenos pedaços que serviram para o estudos das comunidades microbianas associadas e, seguidamente, foram congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até posterior utilização. As esponjas assinaladas por (c) foram-nos gentilmente cedidas e enviadas por Ema Cebrian (Centre d'Estudis Avançats de Blanes – CEAB, Blanes, Espanha) tendo sido liofilizadas imediatamente após a sua recolha e limpeza e enviadas em frascos bem vedados, à temperatura ambiente. As esponjas assinaladas por (d) foram colocadas numa solução de formalina logo após a sua recolha, sem qualquer limpeza ou remoção prévia e foram gentilmente cedidas e enviadas por Jean Vacelet (Centre d'Océanologie de Marseille, Station Marine d'Endoume, Marseille, France). Foi retirado um 'voucher' de cada uma das amostras que foi conservado em etanol para a sua determinação taxonómica.

Antes de qualquer utilização, a esponja é limpa, sendo-lhes retirados macroorganismos que é comum existirem à superfície da esponja, como algas, pequenos crustáceos, moluscos com concha, etc, bem como outros detritos, como sedimentos e pequenas pedras.

### **3.2.1.1. Detecção qualitativa da presença de iões $\text{Ni}^{2+}$**

A dimetilglioxima (DMG) ou diacetildioxima, assim como outras  $\alpha$ -dioximas de fórmula geral  $\text{R}-\text{C}(\text{NOH})-\text{C}(\text{NOH})-\text{R}$ , forma um sal insolúvel de cor carmim na presença de iões  $\text{Ni}(\text{II})$ , em soluções neutras, amoniacais ou de ácido acético (Feigl 1958). O complexo que se forma, no caso da dimetilglioxima, tem a seguinte estrutura:

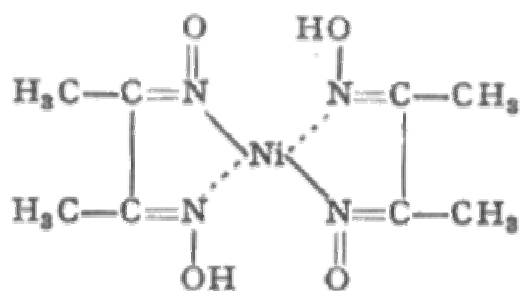


Figura 3.14 – Estrutura química do complexo Ni-DMG (Feigl 1958)

Preparou-se uma solução etanólica de dimetilglioxima 1% (p/v) adicionando 100 mL de etanol a 1 g de dimetilglioxima e aquecendo ligeiramente, com agitação, até à sua completa dissolução. Depois de arrefecida, esta solução foi armazenada à temperatura ambiente até à sua posterior utilização.

A solução de DMG 1% previamente preparada serviu para a detecção qualitativa de iões  $\text{Ni}^{2+}$  directamente no tecido da esponja, nos extractos aquosos e fracções cromatográficas e em géis de electroforese. Para a detecção de  $\text{Ni}^{2+}$  no tecido da esponja cortou-se um pequeno pedaço da esponja sobre o qual se depositaram directamente algumas gotas da solução de DMG; a formação de um precipitado carmim depositado sobre a superfície do tecido da esponja indica a presença de iões  $\text{Ni}^{2+}$ . Para a detecção de  $\text{Ni}^{2+}$  em extractos e fracções aquosos, embebeu-se uma folha de papel de filtro na solução de DMG, colocou-se na estufa até secagem completa, deixou-se arrefecer e colocou-se uma gota da amostra aquosa a analisar sobre este papel de filtro embebido; o aparecimento de uma coloração carmim na zona de contacto da amostra com o papel era indicativa da presença de iões  $\text{Ni}(\text{II})$ .

Para os géis de electroforese esta solução de DMG funcionou como uma espécie de método de coloração de géis específico para a detecção de  $\text{Ni}^{2+}$ ; após a corrida de electroforese, o gel foi imerso nesta solução de um dia para o outro ou até ao aparecimento de bandas de coloração carmim, que indicam a presença de iões  $\text{Ni}^{2+}$  nas amostras injectadas nos poços do gel.

As amostras nas quais se detectou a presença de iões  $\text{Ni}^{2+}$ , através do aparecimento da coloração carmim, foram designadas por DMG(+) e as amostras nas quais não se observou qualquer alteração de cor foram designadas por DMG(-).

Foi também realizado um ensaio de controlo em que se testou a reacção da dimetilglioxima com outros catiões dipositivos, como  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,



$\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mo}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{Se}^{2+}$ . Em nenhum deles se observou a formação de precipitado com cor de carmin.

### 3.2.1.2. Liofilização das esponjas e frações cromatográficas

A liofilização é um método de conservar amostras sob a forma de um pó que pode ser subsequentemente armazenado. Esta técnica é aplicada congelando rapidamente a amostra num banho frigorífico (mistura gelo seco/etanol ou azoto líquido) e depois sublimando o solvente, através da aplicação de vácuo. A liofilização pode ser também utilizada em líquidos, constituindo um método de concentração de amostras muito eficiente.

Para a liofilização da esponja, ou porção desta, foi deixada na câmara a  $4^{\circ}\text{C}$  até descongelação completa, após a qual, foi limpa de todos os detritos e macroorganismos. Seguidamente, foi cortada em pedaços, colocada em balões de liofilização previamente tarados, de modo a determinar o peso de biomassa. Estes balões foram parcialmente imersos num banho de azoto líquido para uma congelação rápida e completa do tecido. Os balões foram colocados no liofilizador (Sistema de liofilização Edwards com condensador Modulyo, acoplado a bomba de vácuo n<sup>o</sup>5) e a esponja foi deixada a liofilizar durante 5 dias, até secar completa, sob vácuo e a uma temperatura nunca superior a  $-40^{\circ}\text{C}$ . Finalmente, os balões de liofilização foram novamente pesados e foi determinada a massa de tecido liofilizado e consequente percentagem de redução de massa. A esponja liofilizada foi guardada à temperatura ambiente, em frascos de plástico bem fechados, até futura utilização.

Para a liofilização de amostras líquidas ou pequenos pedaços de esponja, a amostra foi colocada num tubo de plástico de 5 mL, ou num micro-tubo de 1,5 mL, sem tampa, que foi seguidamente imerso no banho de azoto líquido, na posição vertical, com a ajuda de uma pinça até à congelação da amostra. Estes tubos foram depois colocados um a um no balão de liofilização tentando mantê-los tão direitos quanto possível. O resto do procedimento é idêntico ao descrito anteriormente com a excepção de que para o cálculo da percentagem de redução de massa determina-se a massa antes e depois de liofilizar de cada tubo individualmente.

### 3.2.1.3. Preparação do extracto com choque t3rmico ('heat shock extract' – h.s.e.)

#### a) A partir de esponja congelada

A esponja, depois de limpa, foi cortada em pequenos pedaços e triturada em soluç3o-tamp3o Tris-Cl 20 mM pH=8,6 com 0,15 M de NaCl, na proporç3o de 1:2 (g de esponja congelada/mL de tamp3o), num homogeneizador com haste, em banho de gelo e durante alguns minutos, at3 à disrupç3o completa do tecido. Seguidamente, esta mistura foi deixada em homogeneizaç3o durante 30 minutos, numa c3mara a 4°C, ao que se segue uma centrifugaç3o a 30000 g durante 45 minutos. O precipitado, que cont3m esp3culas, detritos e res3duos celulares, foi desprezado. Este primeiro sobrenadante, designado por **extracto bruto**, foi submetido a um choque t3rmico, que consiste em coloc3-lo num banho a 80°C durante 13 minutos, com agitaç3o. Ap3s o choque t3rmico, o sobrenadante 3 imediatamente colocado num banho de gelo e, ap3s arrefecer, 3 novamente centrifugado a 30000 g durante 45 minutos. Este segundo precipitado 3 constitu3do principalmente por prote3nas sens3veis à temperatura que precipitaram durante o passo de choque t3rmico. O sobrenadante, constitu3do por mol3culas resistentes à temperatura e prote3nas de choque t3rmico, designado por extracto com choque t3rmico ou 'heat shock extract' (h.s.e.), foi dividido em 3 al3quotas de 1 mL para doseamentos de prote3na e gl3cidos totais, 1 al3quota de 20 µL para SDS-PAGE e o restante em al3quotas de 2,5 mL para separaç3o cromatogr3fica. Estas al3quotas foram armazenadas a -20°C at3 posterior utilizaç3o.

#### b) A partir de esponja liofilizada

A esponja 3 pulverizada num almofariz e o p3 3 ressuspenso em soluç3o-tamp3o Tris-Cl 20mM pH=8,6 com 0,15 M NaCl, na proporç3o de 1:20 (g de esponja liofilizada/mL de tamp3o). O restante procedimento 3 id3ntico ao descrito na secç3o anterior para a esponja congelada.

#### 3.2.1.4. Separação cromatográfica

Os extractos com choque térmico (h.s.e.) obtidos para cada uma das esponjas foram fraccionados por cromatografia de filtração em gel, com vista à obtenção de uma fracção cromatográfica correspondente à eluição do níquel presente na amostra.

A fase estacionária utilizada para as cromatografias de filtração em gel realizadas neste trabalho consistiu na resina Superdex 75 prep grade (Sigma-Aldrich), que é constituída por dextrano e agarose entrecruzados. Permite uma separação de proteínas globulares com pesos moleculares entre 3000 e 70000 Da. A coluna que lhe serviu de suporte possuía 1,6 cm de diâmetro e 40 cm de altura. O volume total de resina empacotada no interior da coluna era de cerca de 60 mL. O tampão utilizado na preparação do extracto constituiu a fase móvel, ou eluente, utilizada nas separações cromatográficas, com excepção para alguns ensaios cujo eluente foi água MilliQ; estes casos serão devidamente especificados. O eluente foi previamente filtrado e desarejado por ultra-sons durante 1 hora e as amostras foram filtradas, através de um filtro de difluoreto de polivinilideno (PVDF), antes da injeção na coluna. Antes de cada separação, a coluna foi equilibrada com 2 a 3 volumes de eluente. O volume de amostra injectado foi de 2 mL e o fluxo manteve-se igual a 0,5 mL/min. A eluição foi sempre isocrática, o que significa que a composição da fase móvel se manteve constante durante a separação. A separação foi seguida através de leituras de absorvância a um comprimento de onda de 280 nm no detector UV ligado ao sistema de 'Fast Protein Liquid Chromatography' (FPLC) e a eluição do níquel foi seguida através da sua detecção com DMG em intervalos regulares de 2 mL.

Esta coluna de cromatografia foi previamente calibrada através da injeção, em condições semelhantes às utilizadas durante a purificação, de uma mistura de padrões de massa molecular bem como duma solução de dicromato de potássio 0,01 M em tampão de eluição, para determinar o volume correspondente ao limite inferior de exclusão da coluna. Os dados desta calibração encontram no Anexo I-D.

### 3.2.1.5. Posteriores tentativas de fraccionamento

No sentido de tentar fraccionar posteriormente a fracção com níquel obtida após cromatografia de filtração em gel, tentaram-se duas abordagens diferentes: explorar a hidrofobicidade de uma putativa molécula com níquel através de extracções orgânicas sucessivas com dois solventes de polaridades diferentes ou explorar as suas características iónicas através de cromatografia de troca iónica em mini-coluna.

A amostra inicial utilizada nestes ensaios foi obtida do seguinte modo: pesaram-se 10 g da esponja B21 liofilizada que foi pulverizada num almofariz e ressuspensa em 100 mL de água MilliQ. Procedeu-se como descrito na secção 3.2.1.3.b) até à obtenção de 80 mL de h.s.e. A partir deste extracto foram feitas várias cromatografias, nas condições descritas em 3.2.1.4. com excepção para o eluente utilizado que, neste caso, foi água MilliQ, para reduzir ao mínimo eventuais interferências do tampão. As fracções com níquel recolhidas em cada uma das cromatografias foram juntas, liofilizadas e armazenadas num recipiente de plástico bem rolhado a -30°C até futura utilização.

#### a) Extracção orgânica da fracção com níquel

Pesaram-se 15 mg da amostra obtida através do procedimento descrito anteriormente e dissolveram-se em 1 mL de água MilliQ. Fizeram-se 3 extracções orgânicas sequenciais com acetato de etilo, testando, após cada extracção, cada uma das fases – aquosa e orgânica – quanto à presença de níquel através do teste qualitativo com DMG, como descrito na secção 3.2.1.1.. Repetiu-se este procedimento utilizando como solvente orgânico éter dietílico. A amostra inicial e a fase aquosa após a extracção orgânica com cada um dos solventes foram estudados por SDS-PAGE, segundo o procedimento descrito mais adiante na secção 3.2.1.8..

#### b) Cromatografias de Troca Iónica

Dissolveram-se 30 mg da amostra obtida segundo o procedimento descrito em 3.2.1.d) em 500 µL de água MilliQ e injectaram-se 50 µL desta solução em várias mini-colunas de cromatografia de troca iónica cujas especificações se encontram descritas no Anexo I-A. Cada coluna foi inicialmente eluída com 5 mL de água MilliQ, depois um gradiente contínuo de 10 mL de 0 a 3 M de NaCl e, finalmente, eluição com 5 mL de

uma solução de NaCl 3 M. A separação foi seguida através de leituras de absorvância a um comprimento de onda de 280 nm no detector UV ligado ao sistema de FPLC. Recolheram-se fracções de 1 mL que foram testadas qualitativamente para a presença de Ni(II) com DMG. O perfil do gradiente salino utilizado para todas as cromatografias pode ser esquematizado no seguinte gráfico:

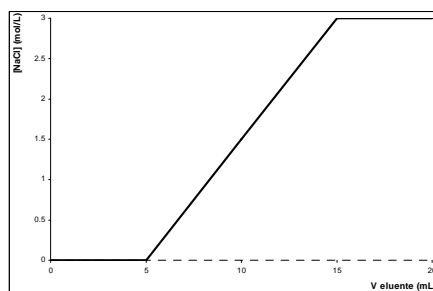


Figura 3.15 – Perfil do gradiente salino utilizado nas cromatografias de troca iónica em mini-coluna

Antes da cromatografia propriamente dita, procedeu-se à lavagem da coluna utilizando o mesmo perfil de gradiente salino mas sem injeção de amostra, seguida de um pré-equilíbrio de 5 mL com o eluente inicial, água MilliQ.

As fracções recolhidas foram liofilizadas de acordo com o procedimento descrito em 3.2.1.2. e estudadas por SDS-PAGE segundo o procedimento descrito mais adiante na secção 3.2.1.8..

### 3.2.1.6. Ensaio de lavagem da esponja

Cortou-se um pedaço com cerca de 4 g de cada uma das esponjas Az1206/2 e Ber07/1. Cada pedaço foi colocado num recipiente de plástico com cerca de 200 mL de água do mar sintética isenta de cálcio e magnésio (**CMFASW** – 27 g NaCl, 1 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,8 g KCl e 0,18 g de NaHCO<sub>3</sub>) e deixado com agitação suave na câmara fria a 4°C durante 2 dias, findos os quais se procedeu a uma mudança da água de lavagem e se deixou novamente em agitação. Ambas as águas de lavagem de cada uma das esponjas (1ª água e 2ª água) e também as esponjas foram testadas com DMG. As esponjas, depois de lavadas, foram cortadas em pedaços e ressuspensas em 10 mL de solução-tampão

Tris-Cl 20mM pH=8,6 com 0,15 M NaCl e repetiu-se o procedimento descrito em 3.2.1.3.a) para a preparação do extracto bruto, que foi também testado quanto à presença de Ni(II) com DMG.

Noutro ensaio, cortou-se um pedaço com cerca de 3,4 g da esponja Az1206/2 e colocou-se num recipiente de plástico com 100 mL de água do mar preparada no laboratório com a seguinte composição: 0,4186 M NaCl, 0,0596 M MgCl<sub>2</sub>, 0,0285 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,01 M KCl e 5 mM CaCl<sub>2</sub>. Deixou-se na câmara fria, a 4°C, com agitação suave, durante 5 dias, com mudanças diárias da água de lavagem, que foi sucessivamente testada com DMG após cada mudança. As águas de lavagem foram juntas e armazenadas num frasco de plástico a 4°C e, à esponja, após os 5 dias de lavagem, foi retirado um pequeno pedaço que foi testado com DMG e, a restante porção da esponja foi liofilizada e armazenada num tubo de plástico de 5 mL bem vedado até posterior utilização. A água de lavagem e a esponja liofilizada foram analisadas para determinação do respectivo conteúdo metálico em Zn, Fe e Ni por ICP-AES, como descrito mais adiante na secção 3.2.1.9..

### **3.2.1.7. Precipitação salina do extracto bruto**

Preparou-se um extracto bruto, de acordo com o procedimento descrito em 3.2.1.3.a), a partir de 14 g da esponja Az1206/2, tendo-se obtido 20 mL de volume final de extracto bruto. Este extracto foi sujeito a precipitação salina com sulfato de amónio (grau técnico) em duas etapas: a primeira até 50% de saturação e a segunda até 100%. Colocou-se o extracto num tubo de plástico de 50 mL, adicionou-se 5 g de sulfato de amónio e agitou-se no vortex durante alguns minutos, após o que se seguiu uma centrifugação a 6500 g durante 15 min. Ao sobrenadante adicionou-se de novo 5 g de sulfato de amónio, ao que se seguiu nova agitação e centrifugação. O extracto inicial, os dois sobrenadantes e o precipitado final redissolvido em água MilliQ foram testados quanto à presença de Ni(II) com DMG.

### **3.2.1.8. SDS-PAGE**

Salvo quando especificado em contrário, os estudos electroforéticos aplicados às várias amostras decorreram em condições SDS-nativas, em géis de composição 15% T e espessura de 0,75 mm, com uma voltagem de corrida de 100 V e aplicação de 10 µL de amostra em cada poço. Os géis foram corados, após a corrida electroforética, utilizando o método do Nitrato de Prata e/ou de Azul de Coomassie para a detecção de proteínas e pelo método da DMG (descrito na secção 3.2.1.1. para a detecção de iões Ni<sup>2+</sup>). Os métodos de preparação dos géis e da coloração utilizada para a detecção de proteínas encontram-se descritos nos Anexos II-B, II-C e II-D.

### **3.2.1.9. Determinação da Composição Elementar**

Foram determinadas as concentrações de zinco, ferro e níquel nas esponjas, extractos h.s.e. e fracções cromatográficas, através de espectroscopia de emissão atómica com acoplamento de plasma induzido (ICP-AES ‘Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy’). Estas determinações foram realizadas pela operadora Carla Rodrigues, pelo serviço de espectroscopia de emissão atómica do laboratório associado REQUIMTE, pertencente ao Centro de Química Fina e Biotecnologia da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa. As determinações foram realizadas utilizando um aparelho de ICP-AES da marca Horiba Jobin-Yvon Modelo Ultima, segundo as especificações e condições de operação que constam tabela apresentada de seguida. Os limites de detecção do aparelho para cada um dos metais são: 0,5 µg/L para o ferro, 1,8 µg/L para o níquel e 1,0 µg/L para o zinco.

Especificações do equipamento		Condições de operação	
Gerador RF	40.68 MHz	Potência	1100 kW
Monocromador	Czerny Turner	Caudal de Argon	12.0 L/min
Observação	Radial	Nebulizador	Mira Mist
Comprimento focal	1.00 m	Pressão do nebulizador	3 bar
		Velocidade da bomba	15 rpm

Tabela 3.2 – Especificações do aparelho e condições de operação utilizadas para a determinação da composição elementar de várias amostras por ICP-AES

Determinou-se o conteúdo em Zn, Fe e Ni nas esponjas que constam da tabela 3.1, excepto para a amostra B21. Utilizaram-se entre 40 a 150 mg, dependendo da amostra (tabela 3.3 mais abaixo), de cada uma das esponjas depois de liofilizadas. Analisaram-se também os respectivos extractos h.s.e., excepto para as esponjas B21, Med07/1 e Med07/2 cuja quantidade disponível não nos permitiu fazer extractos, e respectivas fracções com níquel após cromatografia de filtração em gel, como descrita na secção 3.2.1.4.. Utilizou-se 1 mL de cada um dos extractos h.s.e. e 2 mL de cada uma das fracções. Analisou-se ainda 0,1 g da esponja após o ensaio de lavagem, descrito na secção 3.2.1.6., e a respectiva água de lavagem (2 mL). Estas amostras fizeram-se acompanhar de vários brancos: um constituído apenas por 2 mL de água MilliQ, outro constituído por 1 mL da solução-tampão utilizado como eluente nas cromatografias de filtração em gel (Tris-Cl 20mM com 0,15 M NaCl pH=8,6) e outro constituído por 2 mL da água da mar preparada no laboratório utilizada no ensaio de lavagem da esponja. As amostras e brancos foram colocadas em tubos de ensaio de vidro aos quais se adicionou 5 mL de ácido nítrico 65% e evaporou-se até à secura num banho de areia Clifton Hotplate. Aos resíduos obtidos após evaporação adicionaram-se 5 mL de uma solução de ácido nítrico 30%, agitou-se num vortex até dissolução completa e transferiu-se para tubos de plástico de 5 mL. As amostras constituídas pelas esponjas após digestão ácida apresentavam um depósito constituído pelas espículas de sílica presentes constitutivamente no tecido da esponja, pelo que se decantou estas amostras antes de as transferir para os tubos de plástico.



Amostra	Massa de esponja (g)	Volume de h.s.e. (mL)	Volume de fracção (mL)		
B130	0,09	1	2		
B146	0,07				
B404	0,10				
B417	0,65				
B450	0,10				
Az05/1	0,15				
Az1206/1	0,10				
Az1206/2	0,08				
Ber07/1	0,05				
Ber07/2	0,09				
Ber07/3	0,08				
Ber07/100	0,08				
Tenaciar	0,06				
L'escala	0,09				
Varians	0,06				
B179	0,09				
B418	0,05				
Fe03	0,06				
Med07/1	0,04			Não se aplica	Não se aplica
Med07/2	0,18				
Az1206/2 lavada	0,10				
<b>Volume de branco (mL)</b>					
Água		2			
Tampão		1			
Água do mar		2			
Água de lavagem		2			

Tabela 3.3 – Quantidades utilizadas na preparação das amostras para determinação do conteúdo em Zn, Fe e Ni por ICP-AES

Todo o material utilizado na preparação das amostras foi previamente passado por ácido nítrico 65% e convenientemente lavado com água MilliQ para reduzir ao mínimo possíveis contaminações. Após lavagem, o material foi bem seco na estufa em local resguardado.

### 3.2.1.10 Doseamentos Colorimétricos

Nos extractos com choque térmico, fracções cromatográficas e outras amostras que se tenham demonstrado relevantes, a quantidade de proteína foi determinada pelo método de Bradford (Bradford 1976), utilizando como padrões várias soluções de albumina do soro bovino (BSA) de concentração compreendida entre 0 e 100  $\mu\text{g/mL}$ .

A quantidade de glícidos totais foi determinada pelo método do orcinol/ácido sulfúrico, que se baseia na reacção de hidrólise das ligações glicosídicas provocada pelo ácido sulfúrico concentrado e a subsequente reacção de desidratação dos monósidos libertados originando derivados do furfural, que reagem com o orcinol formando um produto corado que absorve a 420 nm (Chaplin e Kennedy 1986). Utilizou-se como padrões várias soluções de glucose de concentração compreendida entre 0 e 125  $\mu\text{g/mL}$ .

A determinação dos grupos tiol foi realizada pelo método de Ellman (Ellman 1959), que se baseia na reacção de oxidação dos grupos tiol pelo reagente cromogéneo DTNB (5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoato) formando-se um anião de coloração amarela, o TNB (5-tio-2-nitrobenzoato), que absorve a 412 nm (Eyer, Worek et al. 2003). Utilizaram-se como padrões várias soluções de D-L-cisteína de concentração compreendida entre 0 e 1 mM.

Em todas as determinações colorimétricas utilizou-se sempre um branco, constituído pela solução-tampão da amostra, para descontar possíveis interferências. Sempre que a amostra apresentasse maior absorvância que o padrão de maior concentração, esta foi diluída até que a sua absorvância se incluísse no intervalo de absorvâncias dos padrões. Foram feitos ensaios em triplicado para o doseamento de cada uma das amostras e os valores da sua concentração foram calculados por extrapolação nas respectivas curvas de calibração, utilizando o valor de absorvância da amostra correspondente à mediana.

### **3.2.1.11 Estudo das Comunidades Microbianas Associadas às Esponjas Acumuladoras de Níquel**

Uma vez que a bioacumulação de níquel, observada nas esponjas incrustantes pertencentes à família *Clionidae* e à espécie *Suberites carnosus*, pode ser derivada de um microrganismo consistentemente associado a estas esponjas e não devida à esponja em si, procedeu-se à identificação das comunidades microbianas associadas a estas esponjas. Utilizaram-se para este efeito duas estratégias diferentes: uma baseada no cultivo destes microrganismos através de métodos clássicos de microbiologia – métodos dependentes de cultura – e outra baseada na identificação filogenética do DNA genómico destes microrganismos embebidos no tecido da esponja – métodos independentes de cultura. O estudo dos consórcios microbianos pretendeu incidir principalmente sobre a comunidade bacteriana e sobre os dinoflagelados. Foi também feita uma tentativa de isolamento dos dinoflagelados por centrifugação em gradiente de densidade, que se insere nos métodos dependentes de cultura.

#### **a) Métodos dependentes de cultura**

As esponjas Ber07/1, Ber07/2 e Ber07/3 foram recolhidas na Reserva Natural das Berlengas em Setembro de 2007. Após a sua recolha, foram colocadas em sacos de plásticos individuais fechados e transportadas até ao laboratório num contentor refrigerado. Após a chegada ao laboratório, as esponjas, ainda dentro do seu respectivo saco de plástico, foram colocadas num aquário de água salgada, com recirculação de água, durante cerca de uma semana, até serem posteriormente processadas.

#### **i) Isolamento de bactérias e dinoflagelados por técnicas clássicas de microbiologia**

Para a cultura inicial de bactérias utilizaram-se dois meios líquidos diferentes: meio NB (Bactopeptona 5 g/L, extracto de levedura 1 g/L e sal do mar 36 g/L) e meio Simplex (MS – Glucose ou dextrose 5 g/L, extracto de levedura 2 g/L e sal do mar 36 g/L). O sal foi obtido por evaporação completa de água do mar. As esponjas foram previamente passadas por água do mar sintética esterilizada, foi-lhes cortado um

pequeno pedaço (cerca de 1 cm<sup>3</sup>) da zona interior da esponja com um bisturi estéril e colocado em cerca de 50 mL de cada um dos meios de crescimento líquido. As culturas foram deixadas à temperatura ambiente, sem agitação, durante uma semana, finda a qual se fizeram diluições em série de cada uma das culturas, desde 10<sup>-1</sup> até 10<sup>-10</sup>, e se plaquearam em meio sólido, com a mesma composição que o correspondente meio líquido mas adicionado de 15 g/L de agár. De cada uma das amostras, escolheu-se a placa cuja diluição apresentasse colónias bem definidas e separadas. Cada uma dessas colónias foi repicada com uma ansa estéril, ressuspensa em água do mar sintética estéril e novamente plaqueada, para o isolamento de cada uma das colónias. Foram depois feitas novas culturas em meio líquido de cada uma das colónias isoladas, durante uma semana à temperatura ambiente e sem agitação. Dividiram-se em alíquotas de 500 µL e armazenou-se em glicerol 50% (v/v) a -80°C. Todos estes passos foram executados em ambiente estéril numa câmara de fluxo laminar. Todo o material utilizado, bem como os meios de cultura, foi previamente esterilizado por autoclavagem.

Cada uma das culturas obtidas foi testada quanto à presença de níquel através do teste qualitativo com DMG. As culturas bacterianas puras foram enviadas para identificação filogenética no Instituto de Botânica da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto. Para tal, descongelou-se uma alíquota de cada uma das amostras e procedeu-se à extracção de DNA com o 'kit' 'Nucleospin Tissue' da Macherey-Nagel, de acordo com as especificações do fabricante.

Para a cultura de dinoflagelados, preparou-se um meio com uma solução de adubo líquido vegetal para plantas da marca Carrefour, na proporção recomendada na embalagem, em água do mar sintética e uma mistura de antibióticos: 625 mg de penicilina, 312,5 mg de estreptomicina e 62,5 mg de cloranfenicol por litro de meio de cultura. Procedeu-se da mesma forma que para as culturas bacterianas, tendo sido cortado um pequeno pedaço da zona interior de cada uma das esponjas com um bisturi estéril e colocado em cerca de 100 mL do meio de crescimento líquido para dinoflagelados. As culturas foram deixadas à temperatura ambiente, sem agitação, em local bem iluminado com luz natural exterior. Ao fim de cerca de dois meses, preparou-se um extracto bruto da esponja Ber07/1, como descrito na secção 3.2.1.3.a) mas na proporção de 1:10 (g de esponja/ mL de água MilliQ). Este extracto foi filtrado através de um filtro estéril de PVDF 0,22 µm para esterilização. A 5 mL do extracto esterilizado

adicionou-se a mistura de antibióticos (nas mesmas concentrações que o meio de cultura) e esta mistura foi adicionada à respectiva cultura de dinoflagelados da esponja Ber07/1, na tentativa de se conseguir obter uma cultura de possíveis dinoflagelados específicos para o hospedeiro que necessitassem de eventuais metabolitos do hospedeiro para o seu crescimento.

ii) Isolamento de dinoflagelados por centrifugação em gradiente de Percoll

Foram feitos vários ensaio de separação celular para tentar de isolar os dinoflagelados presentes no tecido da esponja Ber07/1, antes desta ter sido congelada, no sentido de tentar obter um inóculo para posterior cultivo em meio laboratorial e também testar quanto à presença de níquel. Esta separação baseou-se em dois métodos diferentes através da adaptação do procedimento descrito por Tytler & Davies (Tytler e Davies 1983), aplicado originalmente em anémonas – método 1 – e, para o método 2, foi adaptado o procedimento descrito por Garson *et. al.* (Garson, Flowers et al. 1998), utilizando um gradiente de densidade contínuo em Percoll a 50% e a 90%. Todos os ensaios de formação de gradiente por ultra-centrifugação foram acompanhados de um controlo realizado exactamente nas mesmas condições que a amostra mas onde foi inserida uma mistura de padrões de densidade ('Percoll Density Marker Bead Kit' da Pharmacia Fine Chemicals). No final, mediu-se com papel milimétrico a distância desde o menisco até cada uma das zonas de densidade formadas pelos padrões e, por extrapolação, determinou-se a densidade de cada uma das fracções formadas no tubo da amostra.

Para o Método 1, homogeneizou-se 4,7 g de esponja em 10 mL de uma solução salina tamponada de Tris-sorbitol (**TBSAS** - 0,5 M sorbitol, 0,15 M NaCl e 0,01 M KCl em solução-tampão 0,05 M Tris-Cl pH=7,8) num homogeneizador catalítico com haste, durante alguns minutos e em banho de gelo, até disrupção do tecido. O homogenato obtido foi centrifugado a 1300 g, durante 10 minutos a 10°C, e o precipitado obtido foi ressuspenso em 2 mL de TBSAS e inserido, com o auxílio de uma micropipeta, em 34 mL de uma solução salina tamponada de Tris-sorbitol-Percoll (**TBSPS** – TBSAS a 70% de Percoll). Centrifugou-se a 70 000 g durante 30 minutos, a 10°C, para a formação do

gradiente de densidade. Cada uma das bandas de densidade obtidas foi isolada individualmente por aspiração com uma micropipeta e testada com DMG e lavada três vezes com uma solução salina tamponada de Tris (TBS – 0,4 M NaCl, 0,04 MgSO<sub>4</sub>, 0,01 M KCl e 0,003 M de MgCl em solução-tampão 0,01 M Tris-Cl pH=7,8). Contrariamente ao descrito no protocolo original, nenhuma das soluções utilizadas continha EDTA para evitar a quelatação de iões Ni<sup>2+</sup> eventualmente presentes na amostra.

Para o Método 2, lavaram-se 17,85 g da esponja duas vezes com água do mar artificial isenta de cálcio e magnésio (CMFASW – ver secção ) previamente filtrada e autoclavada, cortou-se em pedaços pequenos e ressuspendeu-se numa solução de glutaraldeído 3% em CMFASW preparada a partir de uma solução de glutaraldeído 4% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,4. Deixou-se em agitação suave, na câmara fria a 10°C, durante cerca de 2 horas, espremendo o tecido esporadicamente com um pilão para ajudar à dissociação celular. Esta suspensão foi filtrada com gaze e centrifugada a 1500 g durante 5 minutos a 4°C e o precipitado de células dissociadas obtido, depois de lavado com CMFASW, foi ressuspenso em glutaraldeído 3% e deixado durante 2 dias a 4°C. Antes da separação em gradiente de Percoll, o sedimento celular foi lavado 3 vezes em CMFASW e aplicado na solução de Percoll, preparada como no método 1 e designada por TBSPS, mas nas percentagens de 50 e 90% do soluto formador do gradiente de densidade. O resto do procedimento seguiu como descrito para o método 1.

#### b) Métodos Independentes de Cultura - Identificação Filogenética de Bactérias e Dinoflagelados associados a esponjas marinhas

O actual conhecimento sobre a diversidade de microrganismos e a sua função na natureza é pobre, principalmente porque as técnicas tradicionais de microbiologia, tais como a cultura e a observação microscópica, possuem uma aplicação limitada na classificação e identificação de microrganismos. Cerca de 99% de todos os microrganismos existentes na natureza não são isoláveis em culturas puras devido principalmente à nossa ignorância quanto às condições de cultura sob as quais estes

microrganismos prosperam no seu ambiente natural (Muyzer 1999). Daí que tenha surgido a necessidade de utilizar ferramentas de biologia molecular como forma de complementar a informação proveniente das técnicas clássicas de microbiologia.

Uma vez que o isolamento e cultura de microrganismos directamente a partir do tecido do hospedeiro é uma abordagem com óbvias limitações, justifica-se a aplicação de métodos independentes de cultura no estudo da diversidade e da composição destas comunidades microbianas. Nestes estudos de diversidade o objectivo principal foi tentar esclarecer se existiria um microrganismo comum a todas as esponjas acumuladoras de níquel que não estivesse presente nas esponjas não-acumuladoras. A existência de um tal microrganismo poderia fornecer-nos pistas quanto à origem biológica da acumulação de níquel e constituir um potencial candidato a organismo responsável pela acumulação de níquel observada no tecido da esponja.

#### i) Extracção de ácidos nucleicos

O protocolo para a extracção de ácidos nucleicos das esponjas que constam na tabela 3.1 (secção 3.2.1.) foi adoptado a partir do procedimento descrito por Ferrara *et al.* (Ferrara, Murgia et al. 2006) com algumas modificações, seguido de extracção fenólica, de acordo com os protocolos vulgarmente utilizados. Foi retirada, de cada esponja, uma amostra de cerca de 50 mg de tecido liofilizado, tentando, tanto quanto possível, retirar-lo da zona mais interior do tecido animal. Cada uma destas amostras foi colocada num microtubo de 2 mL e deixada a incubar de um dia para o outro, à temperatura ambiente, numa solução de formaldeído 4% (v/v) em água do mar sintética. Seguidamente, foram centrifugadas numa centrífuga para microtubos à velocidade máxima permitida pelo aparelho durante 10 minutos, após o que se lavou o tecido duas vezes com a solução-tampão de lise (5 mM EDTA e 20 % (p/v) SDS em tampão Tris-Cl 10 mM pH 8,0). Ressuspendeu-se o tecido em 525 µL de tampão de lise, adicionou-se 25 µL de proteinase K 20 mg/mL e deixou-se novamente a incubar de um dia para o outro a 56°C. Procedeu-se à precipitação dos componentes proteicos através da adição de 100 µL de uma solução de acetato de sódio 6 M por cada 400 µL de lisado e centrifugou-se a 10000 g durante 20 minutos. O sobrenadante foi sujeito a duas

extracções orgânicas sequenciais, a primeira com igual volume de fenol e a segunda com uma mistura de clorofórmio/alcoól isoamílico na proporção de 24:1 (v/v). O DNA solubilizado na fase aquosa foi precipitado adicionando 2,5 volumes de etanol absoluto a  $-20^{\circ}\text{C}$  e deixando em repouso durante 30 minutos a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Centrifugou-se a 12000 g durante 30 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ , lavou-se o DNA precipitado com 1 mL de etanol a 70% (v/v) a  $-20^{\circ}\text{C}$ , centrifugou-se novamente durante 10 minutos e secou-se na estufa a  $37^{\circ}\text{C}$ . O resíduo nucleico foi então ressuspenso em 100  $\mu\text{L}$  de Tris-EDTA 10 mM pH 8,0 (TE), deixado a solubilizar *overnight* a  $4^{\circ}\text{C}$  e posteriormente armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ , em alíquotas de 25  $\mu\text{L}$ , até futura utilização.

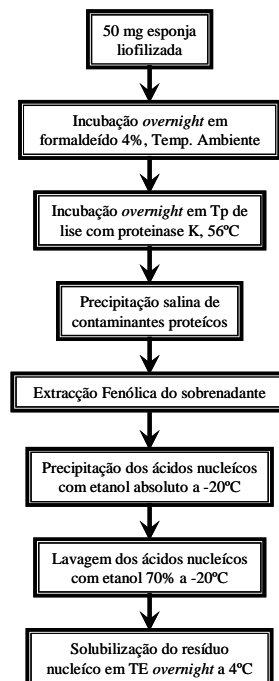


Figura 3.16 - Representação esquemática do procedimento seguido para a extração de ácidos nucleicos de esponjas marinhas

Para o estudo da comunidade de dinoflagelados foram ainda utilizados DNAs gentilmente cedidos por Joana Xavier (Institute for Biodiversity and Ecosystem Dynamics, University of Amsterdam, The Netherlands) cuja extração foi realizada através da aplicação de um 'kit' comercial de extração de ácido nucleicos ('Dneasy Tissue Extraction Kit' da QIAGEN), segundo as instruções do fabricante. A listagem destas amostras encontra-se na seguinte tabela:



Esponja	Espécie	Local de Recolha	Data de Recolha
FAI1	<i>Cliona viridis</i>	Faial, Açores	2005
FAI2			
FAI3			
FAI4			
MAD1		Funchal, Madeira	
MAD2			
MAD3			
BER1		Berlengas	
BER2			
BER3			
BER4			
PIX1		Pico, Açores	
PIX2			
PIX3			
PIX4			
SMG1		S. Miguel, Açores	
SMG2			
SMG3			
SMG4			
ESP1		Blanes, Espanha	
ESP2			
ESP3			
ESP4			
JCA1	D. João Castro, Açores		
JCA2			
JCA3			
JCA4			

Tabela 3.4 – Listagem das amostras de DNA enviadas por Joana Xavier

## ii) Amplificação

A amplificação dos fragmentos de DNA foi realizada por PCR num volume reaccional de 50  $\mu\text{L}$ : 1  $\mu\text{L}$  de uma diluição 1:10 do DNA original, 38,1  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O, 5  $\mu\text{L}$  PCR Buffer 10X, 2  $\mu\text{L}$  MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 0,5  $\mu\text{L}$  de cada um dos ‘primers’ (50 pmol/ $\mu\text{L}$ ), 1  $\mu\text{L}$  dNTPs 1 mM, 2,5  $\mu\text{L}$  BSA 10 mg/L e 0,2  $\mu\text{L}$  Taq Polymerase 5 U/mL.

O gene 28S do DNA que codifica para a subunidade grande ribossomal (28S LSU rDNA) foi amplificado, utilizando os ‘primers’ específicos para dinoflagelados LS1.5 e LS1.3 (Wilcox 1998), nas seguintes condições: 2 minutos a 94°C para a desnaturação inicial, 35 ciclos consistindo em 1 minuto a 92°C, 30 segundos a 58°C e 90 segundos a 72°C, e uma extensão final de 7 min a 72°C.

A região correspondente aos espaçadores intertranscripcionais (ITS1 e ITS2), e uma porção do gene 28S rRNA foram amplificados utilizando um ‘primer’ forward Dino18SF (5’-GGG AAG TTT CAT GAA CCT TAT CAC-3’), construído com base em alinhamentos de sequências de dinoflagelados disponíveis nas bases de dados (Chaves 2005), e um ‘primer’ reverse universal para eucariotas NL4. As condições de amplificação diferiram apenas na temperatura de ‘annealing’ (1 minuto a 55°C) e tempo de extensão (1 minuto a 72°C) e na concentração de BSA utilizada (0,5% (p/v)). A temperatura de ‘annealing’ foi previamente otimizada através de um ensaio de amplificação num intervalo de temperatura entre 54 e 66°C, de modo a reduzir tanto quanto possível eventos de ‘annealing’ não específico.

Os fragmentos obtidos após amplificação foram purificados através do ‘Jetquick PCR Product Purification Spin Kit’ (Genomed), de acordo com as instruções do fabricante, e a sequenciação foi realizada no Laboratório de Sequenciação e Análise de Fragmentos da Fundação para a Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, de acordo com os protocolos vulgarmente utilizados para o efeito. As sequências obtidas foram comparadas com a base de dados ‘GenBank Database’ do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) utilizando o sistema BLAST (Zhang, Schwartz et al. 2000).

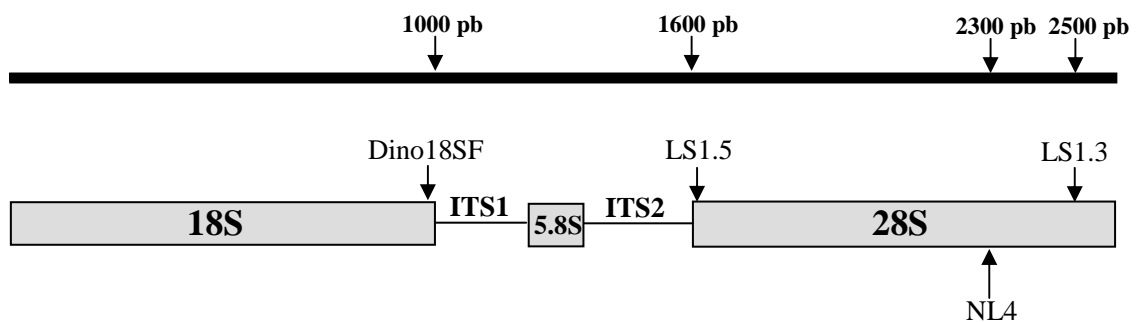


Figura 3.17 - Representação esquemática dos locais de hibridação dos vários ‘primers’ utilizados para amplificação do gene de rRNA de dinoflagelados.

iii) Identificação filogenética das comunidades microbianas associadas por TGGE

As técnicas de ‘fingerprinting’ genético fornecem um perfil ou padrão da diversidade da comunidade microbiológica com base na separação física de sequências únicas de ácidos nucleicos. A estratégia geral para o ‘fingerprinting’ genético de comunidade microbianas consiste primeiro na extracção dos ácidos nucleicos, depois na amplificação dos genes que codificam para o 16S rRNA e, finalmente, a análise dos produtos de PCR através de uma técnica de ‘fingerprinting’ como o DGGE ou o TGGE (Muyzer 1999).

Os fragmentos de DNA podem ser separados com base na sua sequência por electroforese em géis de poliacrilamida contendo um gradiente de formamida, ureia (Myers, Fischer et al. 1985), ou outro agente desnaturante (no caso do DGGE) ou um gradiente de temperatura (no caso do TGGE). As cadeias duplas de fragmentos de DNA movem-se através do gel com uma mobilidade constante determinada pela sua massa molecular até que chegam a uma determinada temperatura à qual o DNA começa a desnaturar-se. Nesta altura, a mobilidade do fragmento decresce abruptamente e a sua posição final é determinada pelo seu padrão de desnaturação. Assim, fragmentos de tamanho idêntico mas com sequências diferentes podem ser separados em géis com gradiente de temperatura, uma vez que a substituição de um único nucleótido altera suficientemente a desnaturação do fragmento de modo a permitir separações substanciais (Myers, Fischer et al. 1985). O acoplamento de uma sequência rica em nucleótidos de guanina e citosina (G e C) – GC ‘clamp’ - a um dos ‘primers’ utilizados na amplificação demonstrou aumentar a sensibilidade das separações em TGGE, impedindo a desnaturação completa do fragmento (Myers, Fischer et al. 1985).

As amostras analisadas por TGGE foram obtidas através da amplificação dos DNA previamente extraídos segundo o procedimento descrito na secção 3.2.1.11.b)i), utilizando os ‘primers’ específicos para o gene 16S de bactérias 341F e 534R (Muyzer, Hottentrager et al. 1996). Ao ‘primer’ 341F foi acoplada uma ‘clamp’ de GC de 40 nucleótidos. A dimensão esperada dos produtos era de cerca de 200 pares de bases.

A amplificação dos fragmentos de DNA foi realizada por PCR num volume reaccional de 50  $\mu$ L: 1  $\mu$ L de uma diluição 1:10 do DNA original, 37,3  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O, 5  $\mu$ L PCR Buffer 10X, 2  $\mu$ L MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 1  $\mu$ L de cada um dos ‘primers’ (50 pmol/ $\mu$ L), 1

$\mu\text{L}$  dNTPs 1 mM , 2,5  $\mu\text{L}$  BSA 10 mg/L e 0,2  $\mu\text{L}$  Taq Polymerase 5 U/mL. As reacções de amplificação ocorreram nas seguintes condições: 3 minutos a 94°C para a desnaturação inicial, 35 ciclos consistindo em 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 50°C e 1 minuto a 72°C, e uma extensão final de 3 min a 72°C. Os produtos obtidos na primeira amplificação foram novamente amplificados sob as mesmas condições e seguidamente aplicados no TGGE. Todas as manipulações com vista à preparação das misturas reaccionais para PCR foram feitas em ambiente estéril, com material previamente descontaminado por exposição a radiação UV durante 15 minutos. Aplicaram-se 5,5  $\mu\text{L}$  de amostra por poço, bem como um poço com um controlo positivo constituído por DNA  $\lambda$  50 ng/mL, um poço para o controlo negativo e dois poços com marcadores de massa molecular 100 bp DNA Ladder (Invitrogen), num gel horizontal de composição 6% acrilamida, 8 M ureia, 2% formamida em TAE 1X. Aplicou-se um gradiente térmico de 49 a 52°C, durante 20 horas e a 120 V, utilizando como tampão de corrida TAE 1X. A preparação do gel e utilização do aparelho (TGGE Maxy System – Biometra) foram feitas de acordo com as instruções do fabricante. Após a corrida electroforética, as bandas foram visualizadas através da coloração do gel pelo método de nitrato de prata para géis de TGGE (Chaves 2005).

As bandas de interesse foram excisadas do gel e eluídas em 50  $\mu\text{L}$  de TE durante 2 dias a 4°C. Estas bandas foram depois reamplificadas nas mesmas condições que as amplificações anteriores, utilizando 5  $\mu\text{L}$  do eluato obtido e o ‘primer’ 341F sem ‘clamp’. Os fragmentos amplificados foram purificados através do ‘Jetquick PCR Product Purification Spin Kit’ (Genomed) e seguidamente clonados, utilizando o ‘kit’ de clonagem ‘TOPO TA-cloning kit’, que inclui o vector pCR 2.1-TOPO (Invitrogen). A inserção dos fragmentos no vector foi promovida pelo enzima T4 DNA Ligase (Invitrogen) e a estirpe hospedeira foi *E. Coli* XL1-Blue MRF’ (Stratagene). As células competentes foram preparadas e transformadas por choque térmico, tal como descrito por (Chung, Niemela et al. 1989). Foram seleccionadas duas colónias brancas de cada plaqueamento, ressuspensas em 50  $\mu\text{L}$  de TE com 0,2% de Tween, as células foram lisadas a 100°C durante 10 minutos e os clones posteriormente amplificados com os ‘primers’ incluídos no ‘kit’ de clonagem, específicos para o vector usado, utilizando 4  $\mu\text{L}$  de lisado e restantes condições de amplificação idênticas às utilizadas anteriormente nesta secção. Os produtos de PCR obtidos através da amplificação dos clones foram

purificados e sequenciados como descrito anteriormente, de acordo com os protocolos vulgarmente utilizados para o efeito. As sequências obtidas foram comparadas com a base de dados ‘GenBank Database’ do NCBI utilizando o sistema BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

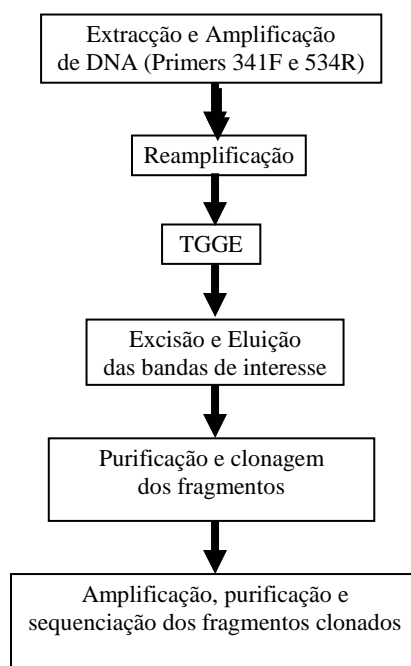


Figura 3.18 – Esquema resumido da estratégia seguida para a identificação filogenética das comunidades bacterianas associadas às esponjas

As sequências de cada um dos ‘primers’ utilizados na amplificação de fragmentos de DNA quer de dinoflagelados quer de bactérias encontram-se no Anexo I-F. Os ácidos nucleicos extraídos e fragmentos amplificados foram sujeitos a separação electroforética em gel de agarose 1% (p/v), para aferir quanto à sua quantidade e qualidade. O gel obtido foi corado com brometo de etídeo (15 minutos mergulhado numa solução de 5 µg/mL de brometo de etídeo, seguido de lavagem por submersão em água destilada) e as bandas visualizadas através de um transiluminador de luz ultravioleta. Os géis obtidos foram fotografados através do software de aquisição de imagem Kodak 1D.

### 3.2.2. Resultados e Discussão

Todas as esponjas que constam da tabela 3.1 foram testadas quanto à presença de níquel, através do método da DMG descrito na secção 3.2.1.1.. Observou-se a presença de níquel em todas as amostras, excepto nas esponjas B418, Fe03 e Med07/1. Quanto às primeiras duas amostras, B418 e Fe03, este resultado coincide com o esperado, uma vez que estas esponjas pertencem à espécie *Cliona celata* que, em estudos anteriores, já tinha demonstrado não possuir elevados teores de níquel (Araújo, Conceição et al. 2003). A inclusão destas duas amostras neste trabalho funcionou como uma forma de “controlo negativo”. A esponja Med07/1, pertencente à espécie *Cliona parenzani*, não demonstrou possuir níquel em quantidade suficiente para ser detectado através do teste qualitativo com DMG. Mais adiante, os resultados da quantificação de metais por ICP confirmam este resultado, demonstrando que esta esponja possui teores de níquel muito inferiores aos da sua congénere Med07/2. Não são conhecidos estudos que tenham visado a determinação do conteúdo metálico em esponjas da espécie *Cliona parenzani* e, por isso, não nos é possível esclarecer ou retirar qualquer conclusão quanto à acumulação de níquel nesta espécie. Para além disso, o facto destas amostras (Med07/1 e Med07/2) terem sido conservadas numa solução de formalina e de a quantidade de tecido da esponja Med07/1 ser diminuta, pode ter influenciado estes resultados, quer pela pouca quantidade de amostra disponível para analisar, quer pela solução de conservação ter funcionado como uma espécie de agente de lixiviação da esponja, provocando a diluição do níquel. No entanto, elas estão referidas como sendo esponjas incrustantes, zooxanteladas, pertencentes ao “complexo *Cliona viridis*” (Vacelet, Bitar et al. 2008) sendo, portanto, bastante provável que esta espécie seja também bioacumuladora de níquel. Contudo, estas hipóteses carecem de uma análise mais abrangente de indivíduos desta espécie. Esta questão levanta-se também para as amostras Varians e B179, pertencentes às espécies *Cliona varians* e *Suberites carnosus*, respectivamente. Embora ambas apresentem teores consideráveis de níquel, são representantes únicos da sua espécie neste estudo, o que não nos permite generalizações.

Em relação à espécie *Cliona viridis*, a acumulação de níquel é consistente, independentemente do local ou data de recolha. Todas as amostras pertencentes a esta espécie demonstraram a presença de níquel através do teste com DMG. As amostras

testadas incluem 5 épocas de recolha – 1998, 2003, 2005, 2006 e 2007 – e 3 localizações geográficas distintas inseridas na zona costeira do Oceano Atlântico – Berlengas, Açores e Norte de Espanha. Não foi possível incluir neste estudo indivíduos desta mesma espécie provenientes da zona do Oceano Pacífico, uma vez que nessa zona esta espécie é muito pouco abundante. Da mesma forma, espécies características do Pacífico, como a *Cliona nigricans*, *C. orientalis*, *C. varians*, etc., raramente são encontradas na zona do Atlântico. No entanto, todas as esponjas pertencentes à espécie *Cliona viridis* analisadas neste estudo, independentemente da localização geográfica ou da época de recolha, demonstraram ser DMG(+), indicando a presença de níquel.

A partir destes resultados, várias foram as questões que se levantaram e que este trabalho procurou responder, nem sempre com sucesso. Pretendíamos saber se os teores de níquel acumulado eram da mesma ordem de grandeza em todas as esponjas DMG(+), independentemente da espécie, local e época de recolha. Pretendemos também esclarecer sob que forma estava acumulado este níquel e se era a mesma em todas as amostras. Finalmente, conseguir atribuir uma origem biológica a esta acumulação, esclarecendo se será a esponja ou um putativo simbiote o responsável pela acumulação de níquel.

### **3.2.2.1. Separação cromatográfica da fracção com níquel**

Nos animais, em algumas plantas e em eucariontes superiores, são sintetizadas metalotioninas como resposta a vários tipos de stress, particularmente à exposição a elevados teores de metais. Com base na hipótese de que o níquel presente nas esponjas pudesse estar associado a uma metalotionina, adaptou-se um protocolo estabelecido para o isolamento de metalotioninas em bivalves (Simes 1997; Simes, Bebianno et al. 2003). Prepararam-se então os extractos com choque térmico, de acordo com o protocolo descrito na secção 3.2.1.3., que foram depois fraccionados por cromatografia de filtração em gel na coluna Superdex 75, segundo o procedimento descrito na secção 3.2.1.4.. Todos os extractos com choque térmico preparados, excepto os obtidos a partir das esponjas pertencentes à espécie *Cliona celata*, demonstraram a existência de níquel através do teste com DMG. Os cromatogramas obtidos para cada uma das amostras

encontram-se no Anexo III-A. Com exceção para as esponjas pertencentes à espécie *Cliona celata*, todos os outros cromatogramas são bastante semelhantes entre si e a eluição da fracção com níquel, seguida através da detecção com DMG, é perfeitamente reprodutível. Apresenta-se de seguida, na figura 3.19, o cromatograma típico obtido.

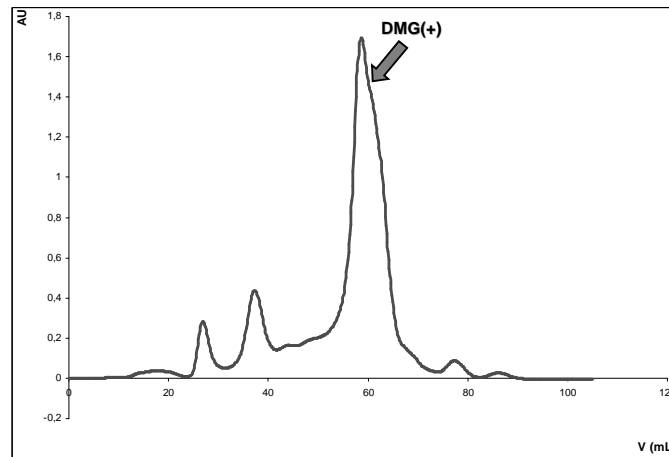


Figura 3.19 - Cromatograma típico obtido para o fraccionamento dos extractos com choque térmico DMG(+) na coluna Superdex75

Em todas as amostras, o níquel foi sempre eluído no pico de maior absorvância a 280 nm, devidamente assinalado no cromatograma representado na figura anterior. Os resultados respeitantes ao fraccionamento cromatográfico de cada uma das amostras apresentam-se na seguinte tabela:



Amostra	Conc. h.s.e. (g esponja/ mL) <sup>(a)</sup>	V fracção com Ni recolhida (mL)	V eluição correspondente ao max. Abs. do pico cromatográfico (mL)
B130	0,52	8,6	58,81
B146	0,68	10,7	58,62
B404	0,49	9,0	60,44
B417	0,48	7,6	59,12
B450	0,52	7,8	58,63
Az05/1	0,56	5,3	59,27
Az1206/1	0,75	8,0	58,90
Az1206/2	0,71	9,4	58,65
Ber07/1	0,53	7,8	59,06
Ber07/2	0,53	11,4	58,81
Ber07/3	0,49	8,0	59,54
Ber07/100	0,53	7,8	58,42
L'escala	0,05 <sup>(b)</sup>	11,2	58,68
Tenaciar	0,10 <sup>(b)</sup>	10,4	58,80
B179	0,49	9,4	58,29
Varians	0,24	11,0	57,91
Média			58,87

Tabela 3.5 - Dados relativos aos extractos com choque térmico e respectivos fraccionamentos cromatográficos; (a) valor calculado pelo quociente entre a massa de esponja utilizada para preparar o extracto e o volume final obtido do respectivo extracto;  
(b) extracto preparado a partir de esponja liofilizada

Ao observar atentamente os resultados obtidos para o volume de eluição correspondente ao máximo de absorvância do pico cromatográfico onde é eluído o níquel (última coluna da tabela 3.5), constatamos que a eluição deste é perfeitamente reprodutível em todos os fraccionamentos, mesmo para as amostras pertencentes à espécie *Cliona varians* e *Suberites carnosus* (B179). Esta observação leva-nos a pensar que o níquel se encontrará acumulado sob a mesma forma em todas as amostras, independentemente da espécie, localização geográfica ou época de recolha das esponjas.

Na calibração prévia da coluna cromatográfica, determinou-se que o limite de exclusão inferior da resina (3000 Da) corresponde a um volume de eluição de 58,98 mL. Este valor foi determinado através da injeção de 200 µL de uma solução 0,01 M de

dicromato de potássio e respectiva eluição nas mesmas condições em que decorreram os fraccionamentos cromatográficos das amostras. Isto significa que esta coluna de cromatografia não permite uma separação eficiente de moléculas cuja massa molecular seja inferior a 3000 Da, sendo estas eluídas num volume próximo ao determinado para o dicromato de potássio. Observando os resultados obtidos para a eluição do níquel nas várias amostras, vemos que este é eluído a um volume bastante próximo do correspondente ao limite inferior de exclusão da coluna. Tal resultado indica que o níquel presente nas amostras poderá estar associado a uma molécula de massa molecular inferior a 3000 Da ou estará na sua forma iónica livre.

Estes resultados parecem ainda indicar que o níquel não estará associado a metalotioninas. A primeira razão prende-se com o facto de as metalotioninas serem proteínas que não absorvem a 280 nm, uma vez que não possuem resíduos de aminoácidos aromáticos. Como se pode ver pelos cromatogramas obtidos, o níquel é eluído numa fracção que absorve intensamente a 280 nm. Para além disso, as metalotioninas possuem uma massa molecular entre 7 e 11 kDa; como discutido no parágrafo anterior, o níquel é eluído já após o limite de exclusão inferior da resina, numa fracção correspondente a massas moleculares inferiores a 3 kDa.

Quanto ao fraccionamento cromatográfico dos extractos obtidos a partir das esponjas pertencentes à espécie *Cliona celata*, obtiveram-se os seguintes cromatogramas:

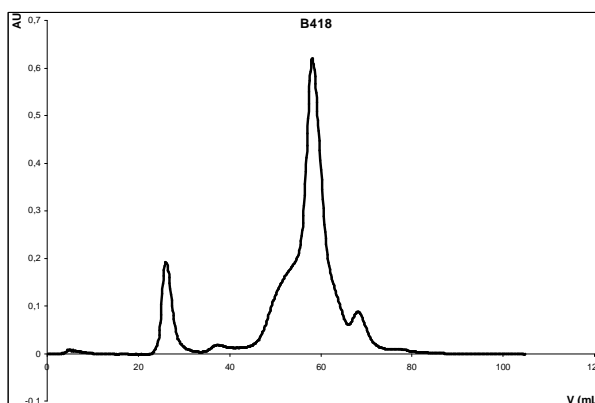


Figura 3.20 - Cromatograma obtido para o fraccionamento cromatográfico, na coluna Superdex75, do extracto com choque térmico da esponja B418.

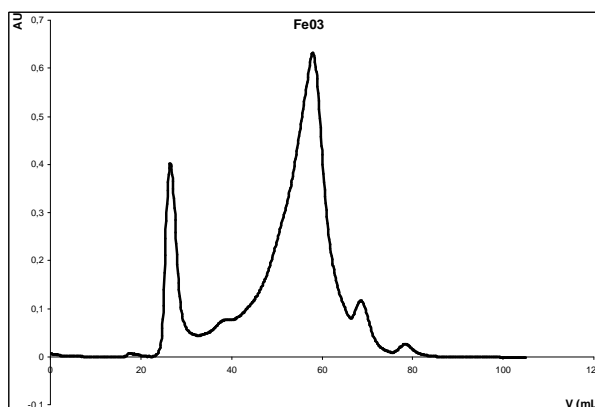


Figura 3.21 - Cromatograma obtido para o fraccionamento cromatográfico, na coluna Superdex75, do extracto com choque térmico da esponja FeO3.

Embora estas esponjas não possuam níquel, o fraccionamento cromatográfico dos seus extractos apresenta também um pico de absorvância a 280 nm, próximo do limite de exclusão da coluna de cromatografia, onde são eluídas todas as moléculas presentes no extracto cuja massa molecular seja inferior a 3000 Da. A fracção correspondente a este pico cromatográfico foi recolhida, testada com DMG, tendo-se revelado DMG(-) tal como se esperava, e posteriormente sujeita às mesmas determinações feitas para as fracções com níquel (determinação do conteúdo metálico por ICP e doseamento de proteínas e de glícidos totais), representando uma espécie de “controlo negativo”.

As fracções cromatográficas com níquel foram estudadas por SDS-PAGE, de acordo com o procedimento descrito em 3.2.1.8.; os géis foram sempre preparados em duplicado e a separação electroforética feita na mesma corrida, sendo um corado para proteína, pelo método do nitrato de prata, e outro para níquel, com DMG, tal como descrito na secção 3.2.1.1.. Pretendia-se esclarecer se existiria alguma banda proteica correspondente à banda corada com DMG que pudesse representar a molécula à qual estivesse associado o níquel acumulado pela esponja. Obtiveram-se os seguintes géis:

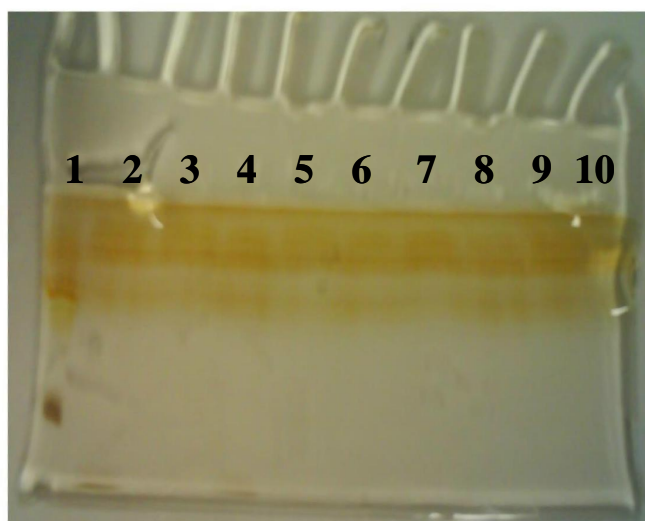


Figura 3.22 - Gel SDS-PAGE das frações com níquel recolhidas após cromatografia de filtração em gel na coluna Superdex 75; coloração pelo método de Nitrato de Prata; Poço 1 – padrões de massa molecular para SDS-PAGE extra low molecular weight (Sigma-Aldrich); Poço 2 – B130; Poço 3 – B146; Poço 4 – B404; Poço 5 – B417; Poço 6 – B450; Poço 7 – Ber07/1; Poço 8 – Ber07/2; Poço 9 – Ber07/3; Poço 10 – apenas tampão de amostra.



Figura 3.23 - Gel SDS-PAGE das frações com níquel recolhidas após cromatografia de filtração em gel na coluna Superdex 75; coloração com DMG; Poço 1 – solução de  $\text{NiCl}_2$  0,01 M; Poço 2 – B130; Poço 3 – B146; Poço 4 – B404; Poço 5 – B417; Poço 6 – B450; Poço 7 – Ber07/1; Poço 8 – Ber07/2; Poço 9 – Ber07/3; Poço 10 – apenas tampão de amostra.

Os géis das restantes amostras (Ber07/100, l'escala, tenaciar, varians e B179) não serão aqui apresentados uma vez que, em termos de presença de níquel, são reprodutíveis com as restantes amostras e o gel corado para proteínas não apresentou

qualquer banda, excepto para os padrões de massa molecular. Em relação ao gel de proteínas apresentado na figura 3.22, vemos que, para além dos padrões de massa molecular, apenas as fracções cromatográficas das amostras B130 e B404 apresentam bandas proteicas. No poço 2, correspondente à fracção da amostra B130, é possível distinguir duas bandas proteicas e no poço 4, correspondente à fracção da amostra B404, observa-se apenas uma banda proteica de baixa massa molecular, perto do limite inferior do gel. No gel apresentado na figura 3.23, corado com DMG para detectar a presença de níquel, embora não seja muito visível na imagem apresentada, observou-se a existência de bandas coradas de rosa intenso, sinal positivo para a presença de níquel, em todas as amostras, sendo mais intensas numa amostra que noutras. O arrastamento que se observa no poço 1, correspondente ao padrão de  $\text{NiCl}_2$ , deve-se provavelmente à elevada concentração de níquel existente na amostra. A zona corada de azul corresponde à frente de migração do gel, identificada pela migração do corante Azul de Bromofenol presente no tampão de tratamento da amostra para SDS-PAGE.

Nestes géis podemos então ver que (1) não há uma correspondência consistente em todas as amostras entre bandas proteicas e bandas de níquel, (2) a migração das bandas coradas com DMG é perfeitamente reprodutível para todas as amostras e (3) esta migração é também correspondente à do padrão de  $\text{NiCl}_2$ . Estas observações mais uma vez confirmam a hipótese de que o níquel estará acumulado sob a mesma forma em todas as amostras e levam-nos a pensar que este estará ou no seu estado iónico sob a forma de  $\text{Ni}^{2+}$  ou associado a uma molécula de massa molecular demasiado baixa para ser resolvida por electroforese ou ainda a uma molécula não proteica não detectável através dos protocolos normais de coloração de géis de electroforese.

A amostra B21, obtida de acordo com o procedimento descrito na secção 3.2.1.5. e utilizada para posteriores tentativas de fraccionamento e eventual caracterização de uma putativa molécula com níquel, apresentou, no entanto, um comportamento electroforético distinto em relação às outras amostras, embora em termos cromatográficos ela seja perfeitamente reprodutível. Apresentam-se de seguida, na figura 3.24, os géis SDS-PAGE correspondentes ao perfil de migração da fracção (recolhida na cromatografia de filtração em gel na coluna Superdex 75) da amostra B21, após liofilização e ressuspensão em água MilliQ.

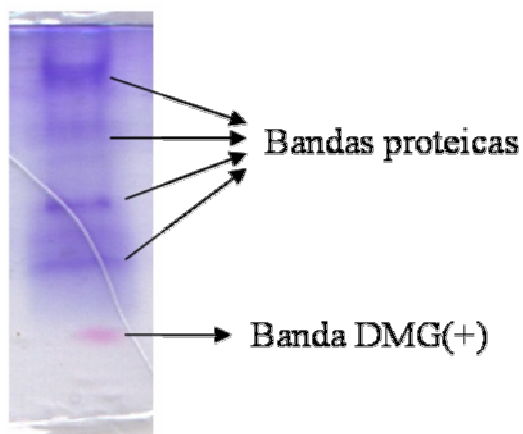


Figura 3.24 - Sobreposição dos géis SDS-PAGE corados para proteína (método Azul de Coomassie) e para níquel (método DMG) da fracção da amostra B21 após liofilização e ressuspensão em água MilliQ.

Como se pode observar na figura anterior, a fracção cromatográfica da amostra B21 apresenta 4 bandas proteicas mais intensas, não correspondendo, no entanto, nenhuma delas à banda com níquel. O facto de existirem bandas proteicas de peso molecular elevado numa fracção cromatográfica eluída próximo do limite inferior de exclusão da coluna, onde deveriam ser eluídas apenas moléculas com massa molecular inferior a 3 kDa, leva-nos a pensar que a amostra poderá ter sido contaminada ou que estas moléculas estabeleceram com a resina algum tipo de interacção adsorptiva, levando ao atraso da sua eluição.

No sentido de esclarecer se o níquel se encontrará na esponja sob a forma iónica livre, eventualmente adsorvido a algum componente extracelular ou sob a forma de grânulos em vesículas intracelulares, ou associado a alguma pequena molécula, fizeram-se algumas posteriores tentativas de fraccionamento, quer do extracto com choque térmico, quer da própria fracção recolhida na cromatografia de filtração em gel na coluna Superdex 75, depois de devidamente concentrada por liofilização e redissolução. Para estes estudos utilizou-se a amostra B21 por ser aquela que existia em maior quantidade e por a sua fracção representar um maior desafio em termos de fraccionamento, visto possuir várias bandas proteicas.

### 3.2.2.2. Posteriores tentativas de fraccionamento

#### a) Extracção orgânica da fracção com níquel

As fases aquosas e orgânicas, resultantes da extracção realizada segundo o procedimento descrito em 3.2.1.5.a), foram testadas com DMG, tendo revelado que o níquel se manteve sempre na fase aquosa, independentemente do solvente orgânico utilizado (acetato de etilo ou éter dietílico). A escolha destes solventes prendeu-se com o facto de possuírem polaridades bastante distintas.

Seguidamente, as fases aquosas provenientes de cada uma das extracções foram liofilizadas, redissolvidas em água MilliQ e estudadas por SDS-PAGE para determinar se, embora não tivesse havido partição do níquel, teria havido posterior separação das moléculas presentes na fracção. Para a extracção com éter dietílico, não se obteve nenhuma banda proteica nem corada com DMG; provavelmente terá havido perda de amostra durante o processo de liofilização. Para a extracção com acetato de etilo apresentam-se de seguida os géis obtidos:

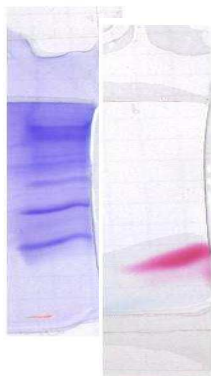


Figura 3.25 - Géis SDS-PAGE da fase aquosa após extracção orgânica com acetato de etilo da fracção cromatográfica da amostra B21; à esquerda, coloração com azul de coomassie; à direita, coloração com DMG

Como se pode ver no gel da esquerda, corado para proteínas pelo método de Azul de Coomassie, mantêm-se as quatro bandas proteicas iniciais. Sendo assim, descartou-se a extracção orgânica como uma possível forma de fraccionamento posterior da fracção cromatográfica uma vez que não houve qualquer melhoria em termos de separação das moléculas existentes na amostra.

b) Cromatografias de Troca Iónica

A fracção recolhida na cromatografia de filtração em gel na coluna Superdex 75 da amostra B21, depois de liofilizada e redissolvida em água MilliQ na proporção de 15 mg de fracção liofilizada por mL de água, foi seguidamente sujeita a várias cromatografias de troca iónica em mini-coluna, na tentativa de conseguir separar as várias proteínas presentes na amostra e, eventualmente, obter uma fracção com níquel pura. Os cromatogramas obtidos encontram-se na seguinte figura:

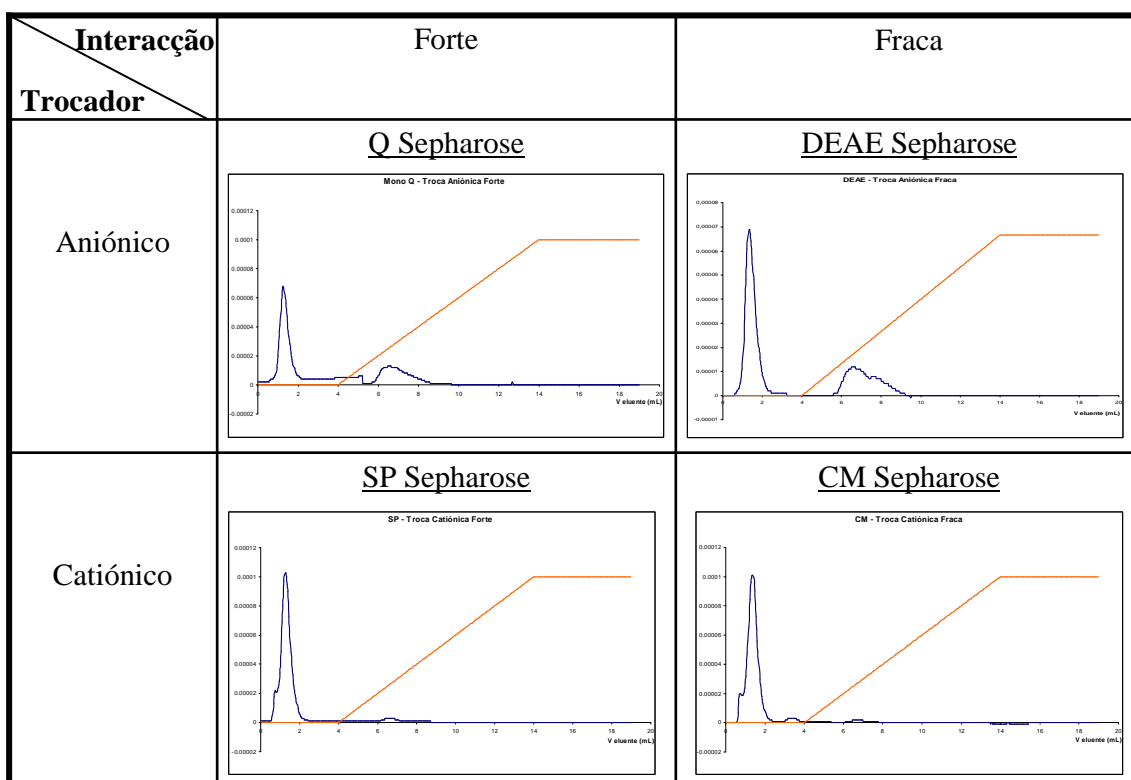


Figura 3.26 - Cromatografias de troca iónica em mini-coluna; Amostra: fracção com níquel após filtração em gel obtida a partir da esponja B21 (15 mg/mL); Injecção: 50 µL; Eluente: água MilliQ; Gradiente: 0 a 3 M NaCl em 10 mL; recolhidas fracções de 1 mL; cromatografia seguida a 280 nm.

Fracções DMG(+):

- DEAE Sepharose (trocador aniónico fraco) – 2 e 3
- Q Sepharose (trocador aniónico forte) – 2 e 3
- CM Sepharose (trocador catiónico fraco) – 2 e 3; 12 a 15
- SP Sepharose (trocador catiónico forte) – 2; 9 e 10



Os picos cromatográficos que se observam logo no início dos cromatogramas, ainda antes do início do gradiente, são constituídos por moléculas que não foram captadas pelos grupos iónicos que constituem a resina ou poderão ser devidos a saturação da coluna, em que a quantidade de amostra ultrapassa a capacidade de captação da resina. Nas colunas de troca aniónica, são eluídos antes do gradiente os cátions e captados os aniões; nas colunas de troca catiónica são eluídos antes do gradiente os aniões e captados os cátions.

Em ambas as cromatografias de troca catiónica, foram eluídas fracções com níquel em duas zonas distintas: antes do gradiente e a meio (SP Sepharose) ou no final do gradiente salino (CM Sepharose). A eluição de fracções com níquel antes do gradiente salino deve-se provavelmente a saturação da coluna. A eluição de fracções com níquel a meio ou no final do gradiente salino significa que, ou o níquel estará associado a uma molécula catiónica, ou que este se encontra na forma de  $Ni^{2+}$ . Neste último caso, pode também ter acontecido o níquel ter sido “arrancado” à eventual molécula a que esteja associado. O estudo, por SDS-PAGE, das fracções recolhidas nestas cromatografias, após a sua liofilização e redissolução em água MilliQ, revelou não existirem bandas proteicas nas fracções com níquel eluídas a meio ou no final do gradiente salino. Assim sendo, mais uma vez se colocam várias hipóteses: (1) o níquel está associado a uma molécula não proteica, não detectável através dos métodos usuais de coloração de géis de electroforese; (2) o níquel foi “arrancado” da molécula à qual estaria associado; (3) o níquel encontra-se na sua forma iónica livre. Também o facto de as fracções DMG(+) não absorverem a 280 nm, como se pode ver nos cromatogramas, é indicativo de que, a existir uma molécula à qual estará associado o níquel, ela não será proteica, ou pelo menos não será uma proteína típica. Posto estes resultados, decidiu-se que a cromatografia de troca catiónica não seria uma boa opção de fraccionamento da amostra.

Nas cromatografias de troca aniónica, DEAE e Q Sepharose, as fracções com níquel foram eluídas antes do início do gradiente salino, zona na qual são eluídas as moléculas catiónicas. Esta observação mais uma vez confirma os dados obtidos anteriormente: a molécula à qual o níquel está associado é de natureza catiónica ou o níquel encontra-se na forma de  $Ni^{2+}$ . A existência de outros picos cromatográficos,

eluídos já a meio do gradiente salino, indica que provavelmente terá havido algum fraccionamento e possível separação das várias bandas proteicas observadas inicialmente. As fracções recolhidas nestas cromatografias foram também liofilizadas e redissolvidas em água MilliQ, como forma de concentrar as amostras. Seguidamente foram estudadas por SDS-PAGE. Apenas os geis correspondentes às fracções 1 a 10, eluídas na cromatografia DEAE Sepharose, apresentaram resultados relevantes e por isso se apresentam na figura seguinte:

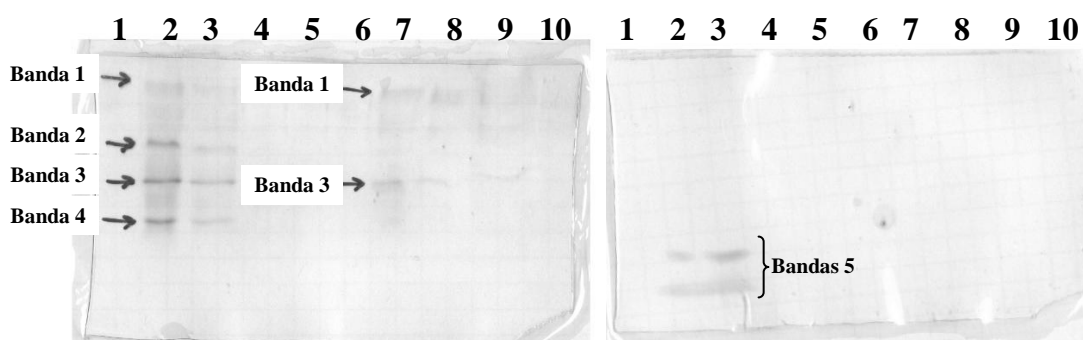


Figura 3.27 - Géis SDS-PAGE das fracções 1 a 10 recolhidas na cromatografia mini DEAE Sepharose; os números dos poços correspondem aos números das fracções; à esquerda, gel corado pelo método de Azul de Coomassie; à direita, gel corado com DMG.

Observando o gel corado para detectar proteínas (figura 3.27 à esquerda), vemos que há de facto alguma separação, visto que nas fracções 7,8 e 9 são eluídas as proteínas correspondentes às bandas 1 e 3 existentes inicialmente na amostra. O facto de existirem as 4 bandas proteicas iniciais nas fracções 2 e 3 significa que houve saturação da coluna e, portanto, uma porção da amostra injectada foi também totalmente eluída nestas fracções. No gel corado para DMG observamos a existência de uma banda dupla que confirma a existência de níquel nas fracções 2 e 3. A existência de uma banda dupla terá provavelmente a ver com um excesso de concentração do níquel, visto que se observou anteriormente que o  $\text{NiCl}_2$ , utilizado como padrão, forma também um arrastamento ou banda dupla nos géis de electroforese. No entanto, vemos que, mais uma vez, não há qualquer correspondência entre bandas DMG(+) e bandas proteicas. Para além disso, nenhuma das cromatografias de troca iónica demonstrou ser eficiente na obtenção de uma fracção com níquel pura, que garantisse a integridade de uma putativa molécula com níquel.

Embora o ensaio de fraccionamento da amostra por cromatografia de troca iónica não tenha levado à obtenção de grandes resultados em termos de fraccionamento, ele permitiu, no entanto, esclarecer que o níquel é eluído numa fracção catiónica. Este resultado indica que, caso o níquel esteja realmente associado a uma molécula, esta é de natureza catiónica; não foi, contudo, possível descartar a hipótese de o níquel estar simplesmente na sua forma iónica.

### **3.2.2.3. Ensaio de precipitação e extracelularidade**

Estes ensaios tiveram o intuito de tentar esclarecer duas questões que se levantaram e às quais não conseguimos responder satisfatoriamente com os ensaios aplicados anteriormente: (1) estará realmente o níquel associado a uma molécula proteica de baixa massa molecular e de características muito diferentes da maioria das proteínas conhecidas? (2) este níquel será acumulado intracelularmente ou estará eventualmente adsorvido a algum componente extracelular? Para responder a estas questões, aplicámos uma precipitação salina ao extracto bruto, preparado a partir de uma das esponjas, e realizámos um ensaio de lavagem da esponja, como forma de tentar esclarecer a primeira e segunda questão, respectivamente.

#### **a) Precipitação salina do extracto bruto**

No sentido de tentar esclarecer se o níquel estaria associado a uma proteína de baixa massa molecular que não fosse detectável pelos métodos comuns (absorvância a 280 nm e colorações de géis SDS-PAGE), preparou-se um extracto bruto a partir da esponja Az1206/2 que foi depois sujeito a precipitação salina com sulfato de amónio, segundo o procedimento descrito na secção 3.2.1.7.. Este ensaio foi realizado com o pressuposto de que, se o níquel estivesse associado a uma molécula proteica, esta precipitaria e o níquel ficaria concentrado no precipitado. Observou-se que, após a precipitação salina até 50% de saturação, o níquel manteve-se no sobrenadante; após a precipitação até 100% de saturação, o sobrenadante manteve-se DMG(+), indicando a presença de níquel. No entanto, nesta etapa, também o precipitado se apresentou DMG(+), provavelmente devido à precipitação de sulfato de níquel ( $\text{NiSO}_4$ ), cuja solubilidade é inferior à do sulfato de amónio. A observação de que o níquel se manteve

no sobrenadante leva-nos a concluir que este não estará associado a uma proteína. Poderá, no entanto, estar associado a uma outra molécula de natureza não proteica.

#### b) Ensaio de lavagem da esponja

Este ensaio baseou-se no pressuposto de que se o níquel estiver simplesmente adsorvido a um componente extracelular da esponja ou microrganismo associado, ele passará facilmente para o meio de lavagem. Se, pelo contrário, o níquel for intracelular, ele manter-se-á no interior das células e não será lixiviado no processo de lavagem. Obviamente que nem todas as células se terão mantido intactas; terá havido disrupção de algumas células com conseqüente passagem do níquel para o meio de lavagem, mas ainda assim a maior proporção de níquel dever-se-á manter no tecido da esponja.

Na primeira abordagem, realizada através deste ensaio, aplicada às esponjas Az1206/2 e Ber07/1, ambas as águas de lavagem, provenientes de cada uma das esponjas, demonstraram ser DMG(+). As esponjas, depois de lavadas, e respectivos extractos brutos, preparados a partir do tecido após lavagem, demonstraram ser DMG(-). Estes resultados preliminares pareceram apontar para a total extracelularidade do níquel. No entanto, carecem de uma determinação mais rigorosa dos teores de níquel que passou para o meio de lavagem e do que se manteve no tecido (se é que algum lá se manteve).

Na segunda abordagem, mais rigorosa, os resultados foram reprodutíveis em relação ao primeiro ensaio. A água de lavagem corou positivo para níquel através do teste com DMG e a esponja, depois de lavada, não apresentou qualquer sinal indicativo da presença de níquel através do teste com DMG.

<b>Amostra</b>	<b>Fe (µg)</b>	<b>Ni (µg)</b>	<b>Zn (µg)</b>
Az1206/2 antes de lavar	724	684	208
Az1206/2 lavada	1738	348	249
Água de lavagem	124	1240	85

Tabela 3.6 - Resultados da determinação do conteúdo metálico por ICP das amostras do ensaio de lavagem da esponja; valores em quantidades de metal (µg) na totalidade da amostra utilizada no ensaio de lavagem

A soma do conteúdo metálico da esponja lavada com o da água de lavagem deveria ser igual ao valor determinado na esponja antes de lavar. No entanto, há alguma discrepância nos valores determinados, como consta da tabela 3.6, que poderá ser devida a alguma contaminação que tenha ocorrido no processo de tratamento das amostras para ICP. De facto, a quantidade de níquel presente na água de lavagem é cerca de duas vezes superior à determinada inicialmente na esponja antes de lavar. O mesmo acontece em relação ao ferro, cuja quantidade na esponja lavada é cerca de 2,5 vezes superior à determinada inicialmente. Devido a estas discrepâncias, não se podem retirar conclusões definitivas, mas os resultados parecem apontar para que a maior parte do níquel presente na esponja tenha sido, de facto, lixiviado e tenha passado, na sua maioria, para a água de lavagem. A repetição deste ensaio adicionando EDTA à água de lavagem, por forma a quelatar todo o níquel que possa estar adsorvido, poderá esclarecer estes resultados. A confirmarem-se, então o níquel (ou a sua maioria) encontrar-se-á num espaço exterior à célula, possivelmente adsorvido a um componente extracelular, que poderá ser a membrana celular (quer de células da esponja ou de algum microrganismo associado), as fibras de esponjina que compõem o tecido da esponja, as espículas...

#### **3.2.2.4. Determinação do conteúdo metálico (Fe, Zn e Ni)**

As amostras de esponjas, extractos com choque térmico (h.s.e.) e fracções com níquel recolhidas na cromatografia de filtração em gel Superdex 75, foram tratadas de acordo com o procedimento descrito na secção 3.2.1.9., para posterior determinação do conteúdo metálico por ICP-AES. Os resultados obtidos que constam do relatório de análise que nos foi enviado encontram-se no Anexo III-B. Estes resultados foram tratados e efectuaram-se os cálculos necessários de modo a que os valores obtidos pudessem ser comparados entre si. Para tal, adoptou-se como valor de referência o kg de esponja liofilizada, sendo necessário, para o efeito, entrar em conta com os dados referentes ao ensaio de liofilização das esponjas.

a) Cálculo da percentagem de redução de massa das esponjas liofilizadas

As esponjas foram liofilizadas de acordo com o procedimento descrito na secção 3.2.1.2.. Na tabela seguinte encontram-se os resultados desta liofilização, com vista ao cálculo da percentagem de redução de massa de cada uma das amostras.

<b>Amostra</b>	<b>Massa de esponja congelada (g)</b>	<b>Massa de esponja liofilizada (g)</b>	<b>% redução de massa</b>
B130	0,894	0,218	24,4
B146	1,373	0,230	16,8
B404	1,511	0,300	19,9
B417	1,786	0,488	27,3
B450	1,736	0,588	33,9
Az05/1	1,540	0,987	64,1
Az1206/1	1,521	0,420	27,6
Az1206/2	1,878	0,702	37,4
Ber07/1	1,200	0,210	17,5
Ber07/2	1,551	0,331	21,3
Ber07/3	1,735	0,619	35,7
Ber07/100	1,318	0,397	30,1
B179	2,168	0,838	38,7
<i>C. varians</i>	0,992	0,455	45,9
B418	1,158	0,220	19,0
Fe03	1,202	0,227	18,9
Med07/1	0,256	0,064	25,0
Med07/2	1,071	0,495	46,2
<b>Média</b>	-	-	<b>30,5</b>

Tabela 3.7 - Dados do ensaio de liofilização das esponjas e cálculo das respectivas percentagens de redução de massa (massa de esponja liofilizada/massa de esponja congelada x 100)

O valor da percentagem de redução de massa corresponde à massa real de esponja existente em cada 100 g de tecido congelado; a diferença corresponde à massa de água que existe no tecido do animal. Assim, temos que, em média, em cada 100 g de esponja congelada, cerca de 30 g correspondem à massa real de esponja e 70 g correspondem à água existente no tecido. Estes valores foram tidos em conta para os cálculos da concentração de metais em cada uma das amostras.

b) Análise, Tratamento e Discussão dos Resultados obtidos por ICP-AES

Os resultados obtidos por ICP-AES foram sujeitos a tratamento matemático de modo a obterem-se valores que pudessem ser comparados entre si e ao longo do processo de fraccionamento das amostras (desde a esponja até à fracção). Para isso, adoptou-se como referência o kg de esponja liofilizada. O primeiro passo dos cálculos foi descontar os valores obtidos para os brancos aos valores obtidos para cada uma das amostras. Seguidamente, para as amostras obtidas a partir da esponja, foi calculada a concentração metálica na quantidade de esponja liofilizada utilizada em cada uma das amostras. Para as amostras constituídas pelos h.s.e., entrou-se em conta com a quantidade de esponja utilizada para preparar o extracto (calculando a sua quantidade em termos de esponja liofilizada através do respectivo valor de percentagem de redução de massa calculado no ponto anterior) e o volume final de extracto obtido. Para as amostras constituídas pelas fracções cromatográficas utilizou-se o volume total de fracção recolhida, a quantidade de extracto h.s.e. injectado na coluna de cromatografia e a proporção esponja liofilizada/volume final deste mesmo extracto. Os resultados obtidos após este tratamento matemático encontram-se resumidos na seguinte tabela:

Amostra	Ni (mg/kg esponja liof.)			Fe (mg/kg esponja liof.)			Zn (mg/kg esponja liof.)		
	esponja	h.s.e.	fracção	esponja	h.s.e.	fracção	esponja	h.s.e.	fracção
<b>B130</b>	1096	892	851	912	21	7	2144	553	482
<b>B146</b>	735	1504	1425	645	56	25	1472	1293	1173
<b>B404</b>	1996	986	738	2027	17	6	2174	301	175
<b>B417</b>	129	631	564	97	22	3	158	247	199
<b>B450</b>	186	284	229	242	13	2	268	45	39
<b>Az05/1</b>	34	45	34	285	5	0	184	124	74
<b>Az1206/1</b>	352	742	627	267	42	4	65	28	24
<b>Az1206/2</b>	538	441	479	570	14	5	164	16	18
<b>Ber07/1</b>	391	305	271	369	4	1	539	4	11
<b>Ber07/2</b>	541	1121	1264	444	27	12	362	548	480
<b>Ber07/3</b>	837	271	274	397	6	3	1112	3	12
<b>Ber07/100</b>	654	316	367	583	10	8	511	12	22
<b>L'escala</b>	3794	3508	9683	3604	123	151	5193	3383	7486
<b>Tenaciar</b>	2097	1194	2705	1817	27	7	2822	986	1604
<b>Varians</b>	715	373	695	280	14	11	27	2	21
<b>B179</b>	450	1086	2711	1569	30	5	1109	1101	1964
<b>B418</b>	88	0	0	247	3	1	60	0	15
<b>Fe03</b>	5	0	0	55	9	1	5	3	8
<b>Med07/1</b>	75	n.a.	n.a.	902	n.a.	n.a.	79	n.a.	n.a.
<b>Med07/2</b>	121	n.a.	n.a.	985	n.a.	n.a.	76	n.a.	n.a.
<b>Média Total<sup>(a)</sup></b>	742	761	1273	815	25	14	926	480	767
<b>Média Corrigida<sup>(b)</sup></b>	1257	881	593	882	27	16	1270	540	310

Tabela 3.8 - Resumo dos resultados obtidos para a determinação do conteúdo metálico em Ni, Fe e Zn por ICP-AES; valores calculados para kg de esponja liofilizada; n.a. – não aplicável: a quantidade de esponja disponível não permitiu a preparação desta amostra; células a sombreado - valores discrepantes; (a) média de todos os valores obtidos; (b) média calculada excluindo os valores discrepantes e os respeitantes às amostras das espécies *C. celata* (B418 e Fe03) e *C. parenzani* (Med07/1 e Med07/2).

Antes de qualquer análise e discussão destes resultados, deve frizar-se que este ensaio não visou a obtenção de um rigor analítico ou valores absolutos dos teores de metais analisados. Pretendeu-se, com estas determinações, comparar o conteúdo metálico entre as várias esponjas, observar se existiriam diferenças entre espécies e determinar a percentagem de metal ao longo do processo de fraccionamento (extracto e



cromatografia). Pretendeu-se também comparar os teores de níquel com os de metais mais vulgares, como o ferro e o zinco; o ferro é o metal maioritário que compõe a crosta terrestre e, portanto, existe também em sedimentos que a esponja eventualmente incorpore no seu tecido, e o zinco existe constitutivamente em múltiplas moléculas biológicas, nomeadamente em vários enzimas envolvidos em vias metabólicas essenciais e também em estruturas “dedos de zinco”, existentes em proteínas que interagem com o DNA na célula.

Ao observar atentamente os valores obtidos, vemos que, em alguns casos, existem valores que não são consistentes, nos quais a concentração do metal na fracção cromatográfica ou no extracto é superior à concentração inicial desse mesmo metal na esponja. Estas discrepâncias poderão ter sido devidas a contaminação da amostra de fracção ou extracto (levando a aumento da concentração do metal) ou a perda de amostra de esponja (conduzindo a uma diminuição da concentração metálica), durante o processo de tratamento que precedeu a análise por ICP-AES. Estes valores foram considerados discrepantes e devidamente assinalados na tabela por sombreado cinzento. Por razões óbvias, estes resultados não concordantes foram ignorados no que diz respeito à análise e discussão de resultados. Nos casos em que o conteúdo metálico entre extracto e fracção seja concordante e o da esponja inferior, considerou-se que houve perda de amostra de esponja; este valor foi ignorado e apenas foram tidos em conta os valores para extracto e fracção (exemplos para níquel: B146, B417, B450, Az1206/1 e Ber07/2). Nos casos em que o conteúdo metálico na fracção ou extracto seja muito superior ao da esponja e não sejam concordantes entre si, ou seja, o conteúdo metálico na fracção é superior ao existente no extracto ou o conteúdo no extracto seja muito superior ao da fracção e esponja, considerou-se que houve contaminação da amostra e esse valor foi considerado discrepante (exemplos para níquel: l'escala, tenaciari e B179). A única excepção a estas “regras” é a esponja Az05/1 que, embora os valores do conteúdo de níquel na esponja, extracto e fracção não sejam muito discordantes entre si, a quantidade de níquel presente é anormalmente baixa. Por esta razão, estes valores foram igualmente ignorados.

Entre as esponjas pertencentes à espécie *Cliona viridis*, os teores de níquel, ferro e zinco variam entre 391 e 3794, 97 e 3604 e 65 e 5193 mg/kg de esponja liofilizada,

respectivamente. Em média, esta espécie apresenta teores de níquel, ferro e zinco de cerca de 1425, 876 e 1387 mg/kg de esponja liofilizada, respectivamente. Vemos, então, que esta espécie acumula níquel numa concentração cuja ordem de grandeza é comparável à de metais mais comuns como o ferro e o zinco. Dentro das esponjas pertencentes à espécie *Cliona viridis*, as esponjas recolhidas na costa Norte de Espanha – l'escala e tenaciari – são as que apresentam maior concentração metálica. Esta observação poderá estar relacionada com a localização da esponja ou com o facto de estas terem sido liofilizadas imediatamente após a sua recolha, o que poderá ter levado a uma menor perda durante o processo de armazenamento da esponja.

O conteúdo metálico das esponjas pertencentes às espécies *Cliona varians* e *Suberites carnosus* (B179) inclui-se perfeitamente na gama de concentrações observada para a espécie *Cliona viridis*, excepto no teor de zinco da *Cliona varians*, que está abaixo do limite inferior determinado para a espécie *Cliona viridis*. No entanto, no que respeita à concentração de níquel, os valores são bastante reprodutíveis nas 3 espécies. Assim, designaremos estas três espécies - *Cliona viridis*, *Cliona varians* e *Suberites carnosus* - como espécies acumuladoras de níquel. Nestas, os teores médios de níquel, ferro e zinco rondam os 1257, 882 e 1270 mg/kg de esponja liofilizada, respectivamente. Embora estes valores sejam inferiores aos reportados por Araújo *et. al.* - 2700 a 3500 mg/kg para Ni e 4700 a 6700 mg/kg para Zn (Araújo, Conceição *et al.* 2003) -, há que ter em conta a utilização de técnicas diferentes para a determinação do conteúdo metálico e de amostras distintas e maior número de espécimens pertencentes à espécie *Cliona viridis*. A preparação prévia das amostras, exigida pela técnica de ICP-AES, submete-as a um maior risco de contaminação e perda de amostra.

No entanto, os valores médios, determinados neste trabalho, para a concentração de níquel e zinco nas esponjas liofilizadas mantêm-se bem acima das suas concentrações nos sedimentos, determinadas por Araújo *et. al.* (abaixo de 10 mg/kg de esponja liofilizada para o níquel e cerca de 12 mg/kg de esponja liofilizada para o zinco) e também dos valores médios encontrados nas águas do Oceano Atlântico e Pacífico, como reportado na tabela 3.9. Embora não tenham sido determinadas as concentrações destes metais na coluna de água das zonas de recolha das esponjas e sedimentos analisados, pressupõe-se a existência de um equilíbrio entre as concentrações na coluna de água e nos sedimentos. Em relação ao ferro, as concentrações deste metal na esponja estão bem abaixo da concentração presente nos sedimentos reportada por Araújo *et. al.*,

que é de cerca de 0,35% (ou seja, 35000 mg/kg ou ppm), bem como dos valores encontrados na crosta terrestre (<http://environmentalchemistry.com>). Nas esponjas estudadas neste trabalho, o teor médio de ferro, nas esponjas pertencentes à espécie *Cliona viridis*, é de 876 mg/kg de esponja liofilizada, um valor também inferior ao determinado por Araújo et al, e que se justifica da mesma forma que para o níquel e o zinco.

		Ferro (ppm)	Zinco (ppm)	Níquel (ppm)
<b>Abundância no ambiente</b>	Crosta terrestre	41000	75	80
	Oceano Atlântico (superfície/ profundidade)	0,001 / 0,004	0,00005 / 0,0001	0,0001 / 0,0004
	Oceano Pacífico (superfície/ profundidade)	0,00001 / 0,0001	0,00005 / 0,00052	0,0001 / 0,00057
<b>Níveis em humanos</b>	Sangue (mg/L)	447	7	0,01-0,05
	Ossos	3-380	75-170	<0,7
	Fígado	250-1400	240	0,02-1,8
	Músculo	180	240	1-2
	Intake diário na dieta (mg)	6-40	5-40	0,3-0,5
	Massa total	60	33	0,21

Tabela 3.9 - Concentrações de ferro, níquel e zinco vulgarmente encontradas no ambiente e no organismo humano (Barbalace 1995)

Observamos então que há uma bioacumulação de níquel e zinco no tecido das esponjas acumuladoras em relação às concentrações presentes no ambiente (sedimentos e coluna de água). Em relação ao ferro, as concentrações encontradas no tecido do animal estão bem abaixo daquelas encontradas no ambiente. Parece então existir uma especificidade em relação ao metal bioacumulado nas espécies bioacumuladoras.

Enquanto as necessidades do organismo animal para o zinco estão bem documentadas, a essencialidade do níquel só agora começa a ser desvendada. Para além disso, os estudos efectuados sobre a essencialidade de metais em seres vivos incidiram principalmente sobre organismos terrestres; pouco se sabe sobre este assunto em

organismos marinhos, nos quais as necessidades metabólicas para estes metais poderão ser diferentes. Como se pode ver na tabela 3.9, a concentração de zinco no organismo humano é cerca de 150 vezes superior à concentração de níquel. Não nos surpreendem os valores elevados de zinco presentes nas esponjas mas sim os de níquel. Perante a proximidade dos valores de concentração de níquel e zinco determinados nas esponjas, colocam-se várias questões: (1) quanto à especificidade da bioacumulação de níquel - terão estas esponjas (ou algum microrganismo associado) uma necessidade metabólica especial que necessite uma elevada biodisponibilidade de níquel, levando o animal a acumulá-lo? Ou, pelo contrário, o níquel é acumulado através de mecanismo menos específicos utilizados para a entrada de outros metais biologicamente mais comuns como o zinco? (2) quanto à função do níquel no organismo - o níquel acumulado servirá para a concatenação de enzimas envolvidos em vias metabólicas específicas destas esponjas incrustantes? Ou será acumulado apenas como mecanismo de defesa? (3) quanto à localização do níquel - mais uma vez se levanta a questão da sua intra ou extracelularidade; o níquel entrará na célula através de transportadores (específicos ou não) e outros mecanismos de entrada na célula (descritos na secção 3.1.1.3.c)? Ou estará apenas adsorvido a algum componente extracelular? (4) quanto à origem biológica da bioacumulação - será realmente a esponja o organismo responsável pela bioacumulação? Ou estas espécies bioacumuladoras possuirão um consórcio microbiológico específico que é o verdadeiro bioacumulador? Todas estas questões representam um grande desafio para a sua resolução. No entanto, será essencial que sejam esclarecidas para que se possa compreender realmente o mecanismo de bioacumulação observado.

Em relação às esponjas pertencentes à espécie *Cliona parenzani* - Med07/1 e Med07/2 - o seu conteúdo em níquel e zinco é muito baixo. Não obstante, em relação ao níquel, os resultados reproduzem a observação anterior resultante do teste com DMG, no qual a esponja Med07/2 corou positivo para níquel. De facto, a concentração de níquel nesta esponja, determinada por ICP-AES, é superior à da esponja Med07/1. Contudo, a pouca quantidade de amostra disponível e o método de conservação utilizado (em solução de formalina) não nos permitem retirar posteriores conclusões.

Quanto às esponjas pertencentes à espécie *Cliona celata*, tal como esperado, a concentração de níquel é muito baixa, bem como a de zinco, e os teores de ferro são também consideravelmente inferiores aos das espécies acumuladoras de níquel.

Vejamos agora a variação da concentração metálica ao longo do processo de fraccionamento, desde a esponja até à fracção cromatográfica obtida após filtração em gel. Para que o seguimento das concentrações ao longo do fraccionamento seja mais fácil e directo, calculou-se a percentagem de cada um dos metais existente no extracto e na fracção em relação à concentração inicial na esponja e também a percentagem da concentração de metal presente na fracção em relação ao extracto. Os resultados encontram-se resumidos na tabela 3.10.

Amostra	% h.s.e. /esponja			% fracção/h.s.e.			% fracção/esponja		
	Ni	Fe	Zn	Ni	Fe	Zn	Ni	Fe	Zn
<b>B130</b>	81	2	26	95	33	87	78	1	22
<b>B146</b>	205	9	88	95	45	91	194	4	80
<b>B404</b>	49	1	14	75	35	58	37	0	8
<b>B417</b>	489	23	156	89	14	81	437	3	126
<b>B450</b>	153	5	17	81	15	87	123	1	15
<b>Az05/1</b>	132	2	67	76	2	60	100	0	40
<b>Az1206/1</b>	211	16	43	85	10	86	178	1	37
<b>Az1206/2</b>	82	2	10	109	36	113	89	1	11
<b>Ber07/1</b>	78	1	1	89	13	275	69	0	2
<b>Ber07/2</b>	207	6	151	113	44	88	234	3	133
<b>Ber07/3</b>	32	2	0	101	50	400	33	1	1
<b>Ber07/100</b>	48	2	2	116	80	183	56	1	4
<b>L'escala</b>	92	3	65	276	123	221	255	4	144
<b>Tenaciar</b>	57	1	35	227	26	163	129	0	57
<b>Varians</b>	52	5	7	186	79	1050	97	4	78
<b>B179</b>	241	2	99	250	17	178	602	0	177
<b>B418</b>	0	1	0	0	33	0	0	0	25
<b>Fe03</b>	0	16	60	0	11	267	0	2	160
<b>Média*</b>	64	5	36	87	34	80	66	2	30

Tabela 3.10 – Cálculo da percentagem do conteúdo metálico ao longo do processo de fraccionamento; célula a sombreado cinzento – valor discrepante; \* média calculada excluindo os valores discrepantes e os respeitantes às amostras das espécies *C. celata* (B418 e Fe03).

Todos os valores cuja percentagem seja superior a 100% foram considerados discrepantes, uma vez que não poderá existir maior quantidade de metal na amostra final do que a inicialmente existente na esponja ou no extracto. Esta discrepância de valores terá a ver, provavelmente, como já foi dito anteriormente, com algumas contaminações ou perdas durante o processo de preparação das amostras para posterior análise por ICP.

O primeiro resultado que mais chama a atenção é a baixa percentagem de ferro existente no extracto e fracção em relação à esponja. Este resultado vem confirmar o que já foi dito anteriormente, que o conteúdo de ferro presente na esponja se deverá provavelmente a sedimentos incorporados no tecido. Quando se procede à primeira centrifugação, durante a preparação do extracto, estes sedimentos ficarão no precipitado e serão descartados.

A segunda observação importante é a de que, tanto o extracto como a fracção provenientes das amostras pertencentes à espécie *Cliona celata*, não possuem níquel e os valores respeitantes aos restantes metais são também muito baixos. Estes resultados estão de acordo com o esperado e são concordantes com os resultados anteriormente reportados (Araújo, Conceição et al. 2003). O facto de as esponjas desta espécie provirem das mesmas localizações geográficas (B418 das Berlengas e Fe03 do Norte de Espanha) que algumas esponjas da espécie *Cliona viridis*, serve de confirmação de que estamos de facto perante um mecanismo de bioacumulação de níquel por parte das espécies bioacumuladoras e não perante um fenómeno de contaminação ambiental. Se existisse contaminação por metais na zona de recolha das esponjas, então também estas amostras teriam valores aumentados de níquel, o que não se verifica.

Em relação aos resultados obtidos para as espécies bioacumuladoras, vemos que, em média, 36% do zinco e 64% do níquel presentes inicialmente na esponja mantêm-se no extracto. Se considerarmos a fracção, temos 30% e 66% (para zinco e níquel, respectivamente) do conteúdo presente inicialmente na esponja. Então, a proporção da quantidade de níquel ao longo do fraccionamento em relação à quantidade de metal inicialmente presente na esponja é cerca do dobro daquela observada para o zinco. Ou seja, no final do processo de fraccionamento obtivemos uma fracção que possui cerca de 60% do conteúdo inicial de níquel existente na esponja. Tendo em conta que, ao longo de todo o processo de fraccionamento, existirão perdas, este é um valor suficientemente

elevado para podermos afirmar que o níquel existente na esponja é (quase?) na sua totalidade recolhido na fracção cromatográfica. Esta observação torna-se ainda mais consistente se observarmos os valores entre fracção e extracto, nos quais 87% do níquel presente no extracto é recolhido na fracção. Para o zinco, esta relação é de 80%. Observando estes valores, podemos dizer que o passo do fraccionamento que levará a maiores perdas será o da preparação e obtenção do extracto. Para o níquel, a maior parte (se não a totalidade) deste metal será recolhido na fracção; para o zinco, há um particionamento mais uniforme ao longo do processo de fraccionamento, na medida em que apenas 30% do zinco é recolhido na fracção. Reveste-se, portanto, de interesse caracterizar esta fracção tanto quanto possível. No entanto, o facto de esta fracção não se encontrar pura, uma vez que todos os componentes celulares de baixa massa molecular serão eluídos nesta fracção, dificulta a tarefa de caracterização. As ferramentas de espectroscopia tornam-se inúteis ou de difícil interpretação devido à variedade de contaminantes presentes na amostra que obviamente interferirão com a análise e interpretação dos resultados. Assim, a caracterização das fracções cromatográficas passou por métodos de doseamento colorimétricos, como forma de termos alguma informação preliminar acerca destas amostras.

#### **3.2.2.5. Doseamentos colorimétricos**

Foi determinada, em extractos com choque térmico (h.s.e.) e fracções cromatográficas, a quantidade de proteína, glícidos totais e grupos tiol. Em todos os doseamentos foi utilizado um branco, constituído pelo tampão de amostra, cuja absorvância foi devidamente descontada. Nenhuma das amostras demonstrou a existência de grupos tiol. Quanto ao conteúdo proteico e de glícidos totais, os resultados encontram-se resumidos na seguinte tabela:

Amostra	[Proteína] ( $\mu\text{g/mL}$ )		[Glicídios] ( $\mu\text{g/mL}$ )	
	h.s.e.	fracção	h.s.e.	fracção
B130	801	0	767	48
B146	916	0	806	43
B404	501	0	563	45
B417	431	0	462	30
B450	631	0	651	41
Az05/1	131	0	153	25
Az1206/1	1248	0	569	63
Az1206/2	1259	0	1107	123
Ber07/1	639	0	502	43
Ber07/2	336	0	244	14
Ber07/3	844	0	674	49
Ber07/100	783	0	686	61
L'escala	245	0	227	13
Tenaciar	202	0	140	14
B179	402	0	313	15
Varians	463	0	611	40
B418	11	0	424	30
Fe03	373	0	914	108

Tabela 3.11 - Concentração proteica e glicídica (em  $\mu\text{g/mL}$  de amostra) de extractos h.s.e. e fracções cromatográficas

A representação gráfica destes valores encontra-se na figura 3.28:

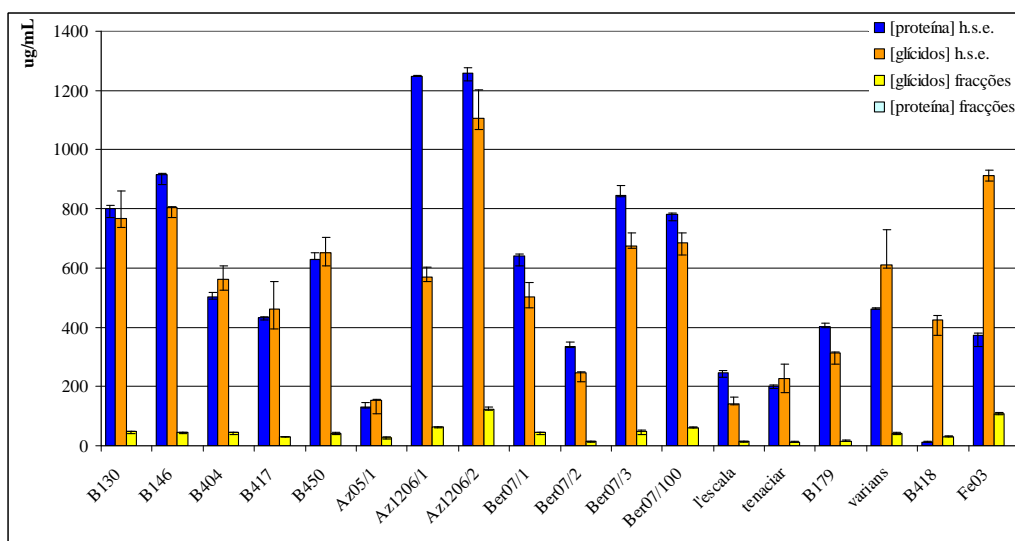


Figura 3.28 - Representação gráfica dos valores de concentração de proteína e glicídios (em  $\mu\text{g/mL}$  de amostra) nos extractos h.s.e. e fracções cromatográficas



Para que os valores de concentração proteica e glicídica de cada uma das amostras possam ser comparados entre si, é necessário proceder a uma normalização matemática destes valores, uma vez que as concentrações de proteína e glícidos presentes no extracto dependem de vários factores: (1) da esponja, ou seja, da composição da amostra inicial (o tecido da esponja); (2) da quantidade de esponja utilizada, isto é, da concentração do extracto h.s.e. em termos de quantidade de esponja por mL de extracto obtido; (3) da eficiência da extracção. Por esta razão, procedeu-se ao cálculo das concentrações de proteína e glícidos presentes nos extractos em termos de mg de proteína (ou glícidos) por g de esponja liofilizada. Os resultados estão representados na figura seguinte:

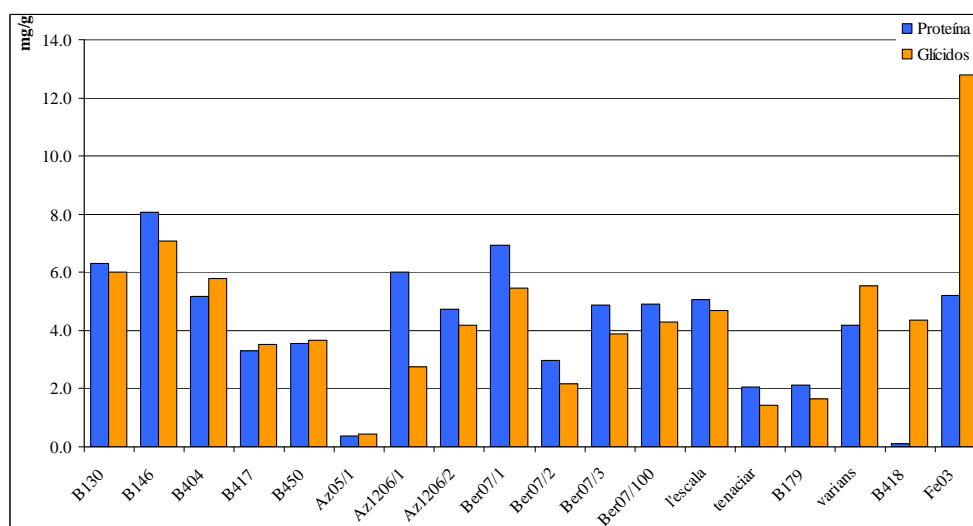


Figura 3.29 - Representação gráfica das concentrações de proteína e glícidos presentes nos extractos h.s.e., em mg de proteína ou glícidos por g de esponja liofilizada.

Da análise destes resultados, a primeira observação que se destaca é o baixo conteúdo glicídico e proteico existente no extracto h.s.e. da amostra Az05/1. Na secção anterior tínhamos já visto que as amostras provenientes desta esponja apresentavam também baixo conteúdo metálico. Estes resultados levam-nos a pensar que a extracção poderá ter sido pouco eficiente ou o tecido da esponja apresentava um elevado conteúdo de contaminantes cuja presença não foi identificada durante a limpeza da esponja.

Os outros dois resultados que nos chamam à atenção são a elevada concentração glicídica da amostra Fe03 e o baixo conteúdo proteico da amostra B418. Estas observações são consistentes com o facto de estas esponjas pertencerem a uma espécie diferente das restantes.

Neste gráfico observa-se também a importância da normalização dos valores de concentração de glúcidos e proteína determinados nos extractos h.s.e.; os valores são muito mais concordantes entre as várias esponjas do que pareciam à partida antes deste tratamento matemático. As amostras como Az1206/1 e Az1206/2, cujos extractos pareciam, no gráfico da figura 3.28, ter concentrações de proteína e glúcidos muito superiores às das restantes esponjas, revelaram no gráfico da figura 3.29, após a normalização, que os seus conteúdos são bastante semelhantes aos das restantes amostras. Assim, o principal factor que afecta a concentração de glúcidos e proteínas nos extractos é a quantidade de esponja utilizada na sua preparação. Vemos então que a concentração de proteína nos extractos h.s.e. preparados a partir de esponjas bioacumuladoras varia entre os valores de cerca de 2 e 8 mg de proteína por g esponja liofilizada e a concentração de glúcidos entre 1,5 e 7 mg de glúcidos por g esponja liofilizada.

Quanto à concentração de glúcidos e proteína nas fracções cromatográficas com níquel, não se detectou proteína (por esta ser inexistente ou estar abaixo do limite de detecção do método – 10 µg/mL) e a concentração glicídica inclui-se entre 13 e 123 µg/mL de fracção. Nas fracções, as concentrações glicídica e proteica dependerão principalmente da separação cromatográfica e, por isso, não se aplicou o mesmo tratamento matemático a que foram sujeitos os resultados relativos aos extractos.

Analisaram-se estes resultados em conjunto com os resultados obtidos na determinação do conteúdo metálico de cada uma das amostras no sentido de determinar se existiria alguma interdependência entre eles. Não se encontrou qualquer correlação entre as concentrações proteica e glicídica e as concentrações metálicas. Esta observação leva-nos a pensar que nem proteína nem glúcidos estarão envolvidos no mecanismo de bioacumulação de níquel. Se este estiver associado a alguma molécula, os resultados indicam que provavelmente ela não será de natureza glicídica nem proteica.

### 3.2.2.6. Estudo dos Consórcios Microbianos – Métodos Dependentes de Cultura

#### a) Isolamento de estirpes microbianas heterotróficas

Das culturas e isolamentos realizados segundo o procedimento descrito na secção 3.2.1.11.a)i), resultaram 14 estirpes microbianas. As características das colónias isoladas encontram-se na seguinte tabela:

<b>código</b>	<b>origem</b>	<b>meio</b>	<b>colónia</b>	<b>Características morfológicas</b>
NB1-1	Ber07/1	NB	1	Isolada de diluição $10^{-10}$ ; colónia pequena, redonda e translúcida
NB1-2	Ber07/1	NB	2	Isolada de diluição $10^{-10}$ ; colónia branca, de tamanho médio, que forma círculos concêntricos
NB2-1	Ber07/2	NB	1	Isolada de diluição $10^{-6}$ ; pequena, redonda e translúcida
NB2-2	Ber07/2	NB	2	Isolada de diluição $10^{-6}$ ; grande e “penugenta”, tem aspecto de algodão
NB3	Ber07/3	NB	Única	Diluição $10^{-9}$ ; cheio de colónias fluorescentes, impossíveis de distinguir a olho nu
MS1-1	Ber07/1	MS	1	Diluição $10^{-10}$ ; assemelha-se a algodão e forma um pontinho no centro da colónia
MS1-2	Ber07/1	MS	2	Diluição $10^{-10}$ ; mancha branca de rebordo irregular com círculo no meio
MS1-3	Ber07/1	MS	3	Diluição $10^{-8}$ ; disforme e translúcida
MS2-1	Ber07/2	MS	1	Diluição $10^{-10}$ ; círculo perfeito com aspecto leitoso
MS2-2	Ber07/2	MS	2	Diluição $10^{-10}$ ; mancha grande, rebordo irregular com círculo no meio
MS2-3	Ber07/2	MS	3	Diluição $10^{-10}$ ; tamanho médio que “desenha” uma espécie de trevo
MS3-1	Ber07/3	MS	1	Diluição $10^{-10}$ ; redonda, brilhante, com aspecto granuloso
MS3-2	Ber07/3	MS	2	Diluição $10^{-10}$ ; redonda, opaca e aspecto leitoso
MS3-3	Ber07/3	MS	3	Diluição $10^{-10}$ ; colónia grande de rebordo irregular

Tabela 3.12 - Descrição e características das estirpes microbianas isoladas por métodos dependentes de cultura a partir das amostras Ber07/1, Ber07/2 e Ber07/3, segundo o procedimento descrito na secção 3.2.1.11.a) i)

Da esponja Ber07/1 foram obtidos 5 isolados – NB1-1, NB1-2, MS1-1, MS1-2 e MS1-3; da esponja Ber07/2 foram obtidos também 5 isolados – NB2-1, NB2-2, MS2-1, MS2-2 e MS2-3; da esponja Ber07/3 obtiveram-se 4 isolados microbianos – NB3, MS3-1, MS3-2 e MS3-3. Embora estes meios de crescimento estejam direccionados para a cultura de estirpes bacterianas, algumas das estirpes isoladas poderão ser fungos. Este é o caso da estirpe MS3-2, que apresenta características morfológicas de fungo filamentosos. Esta questão poderá ser respondida após identificação filogenética das estirpes isoladas. Após a repicagem e isolamento de cada uma destas estirpes, cada uma das culturas parecia-nos pura, ou seja, cada placa correspondia a apenas uma estirpe

bacteriana. No entanto, não se descarta a existência de mais que um microrganismo que possa crescer a velocidade mais lenta que a estirpe dominante e que, por isso, não tenha formado colónias visíveis. Mais uma vez, a biologia molecular será uma ferramenta indispensável para esclarecer esta questão.

Após a extracção de DNA de cada uma das estirpes microbianas isoladas, os ácidos nucleicos extraídos foram sujeitos a separação electroforética em gel de agarose 1% (p/v), para aferir quanto à sua quantidade e qualidade. O gel obtido foi corado com brometo de etídeo (15 minutos mergulhado numa solução de 5 µg/mL de brometo de etídeo, seguido de lavagem por submersão em água destilada) e as bandas visualizadas através de um transiluminador de luz ultra-violeta. A aquisição de imagem do gel obtido foi realizada através do software Kodak 1D e apresenta-se na figura seguinte:

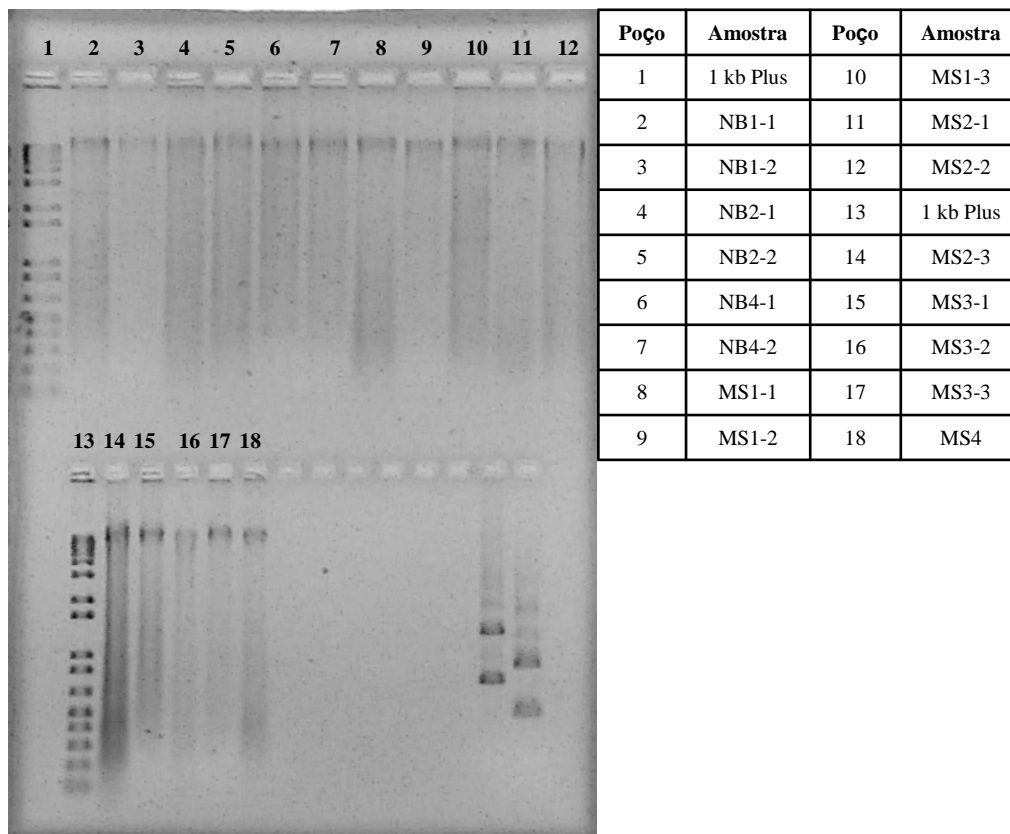


Figura 3.30 - Gel de agarose obtido após separação electroforética dos ácidos nucleicos extraídos das estirpes microbianas isoladas a partir das esponjas Ber07/1, Ber07/2 e Ber07/3.

Não foi possível, no entanto, obter a identificação filogenética destas estirpes microbianas isoladas em tempo útil para que esses resultados pudessem ser incluídos neste trabalho, devido ao elevado estado de degradação dos ácidos nucleicos aquando da sua chegada ao Instituto de Botânica da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto. Sabe-se, contudo, que o isolado NB3 possuía mais do que uma estirpe bacteriana; esta amostra era, de facto, constituída por duas estirpes bacterianas diferentes, uma fluorescente e outra não. Esta estirpe fluorescente, devido a esta sua característica tão visualmente apelativa, foi mais intensamente estudada, tendo dado origem a um outro trabalho, que foi desenvolvido em paralelo, por Rute André, no Laboratório de Bioquímica Inorgânica Marinha da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (André 2008).

Nenhuma das culturas demonstrou a presença de níquel através do teste com DMG. Este facto pode ser devido à bioacumulação de níquel não estar realmente relacionada com um microrganismo associado ou, o organismo responsável pela bioacumulação não é cultivável, pelo menos nas condições em que se realizaram estas culturas.

Em relação aos dinoflagelados, não se observou qualquer crescimento no meio de cultura, mesmo após a sua suplementação com o extracto do hospedeiro. Estes resultados não são surpreendentes, uma vez que estes organismos são extremamente específicos para o hospedeiro e dificilmente cultiváveis em condições laboratoriais.

#### b) Isolamento de dinoflagelados por centrifugação em gradiente de densidade

Dos três ensaios realizados segundo os procedimentos descritos na secção 3.2.1.11.a)ii) (Método 1 com gradiente de Percoll a 90% e Método 2 com gradientes de Percoll a 50 e 90%), aquele que demonstrou ser eficiente em termos de separação celular foi o Método 2 com gradiente de Percoll a 90%. As especificações da calibração de densidade associada a este ensaio encontra-se no Anexo I-E. Formaram-se 6 zonas de densidade descritas e caracterizadas na seguinte tabela, da fracção mais densa para a menos densa:

<b>Fracção</b>	<b>Intervalo de densidade</b>	<b>Características</b>
0	1,323 – 1,238	Zona límpida com coloração ligeiramente esverdeada
1	1,238 – 1,178	Pequenos detritos verdes em suspensão
2	1,178 – 1,145	Zona mais opaca de coloração castanho esverdeada
3	1,145 – 1,126	Zona límpida e transparente
4	1,126 – 1,106	Zona mais opaca de coloração castanho esverdeada
5	1,106 – 1,086	Coloração esbranquiçada de aspecto leitoso
6	Abaixo de 1,086	Zona completamente límpida e transparente

Tabela 3.13 - Zonas de densidade e respectivas características obtidas na separação por centrifugação em gradiente de Percoll a 90% através do Método 2.

Nenhuma das fracções demonstrou a presença de níquel através do teste com DMG. Após a lavagem de cada uma das fracções isoladas por aspiração, foi colocada uma gota numa lamela e observada ao microscópio óptico. Nenhuma das fracções apresentou células intactas e viáveis que pudessem constituir um inóculo para posterior cultura.

### **3.2.2.7. Estudo dos Consórcios Microbianos – Métodos Independentes de Cultura**

Os métodos independentes de cultura, baseados em ferramentas de biologia molecular, aplicados ao estudo das comunidades microbianas representam sempre uma mais-valia, uma vez que os resultados obtidos não dependem das condições de cultivo, permitindo obter um conhecimento mais aprofundado e fiável da diversidade microbiana do ecossistema em estudo. As técnicas de biologia molecular constituem verdadeiras armas de prospecção microbiológica extremamente valiosas e fundamentais para o estudo de sistemas complexos como é o “microcosmos” de uma esponja marinha. Através de ensaios de extracção, amplificação, clonagem e sequenciação de fragmentos genómicos e da correspondente optimização destes estudos para os organismos em questão, vislumbrámos um pouco do complexo mundo microbiano de uma esponja marinha, na busca de um putativo bioacumulador de níquel. Os resultados obtidos encontram-se nas secções que se seguem.

a) Dinoflagelados

i) Região 28S rRNA – ‘Primers’ LS1.5/LS1.3

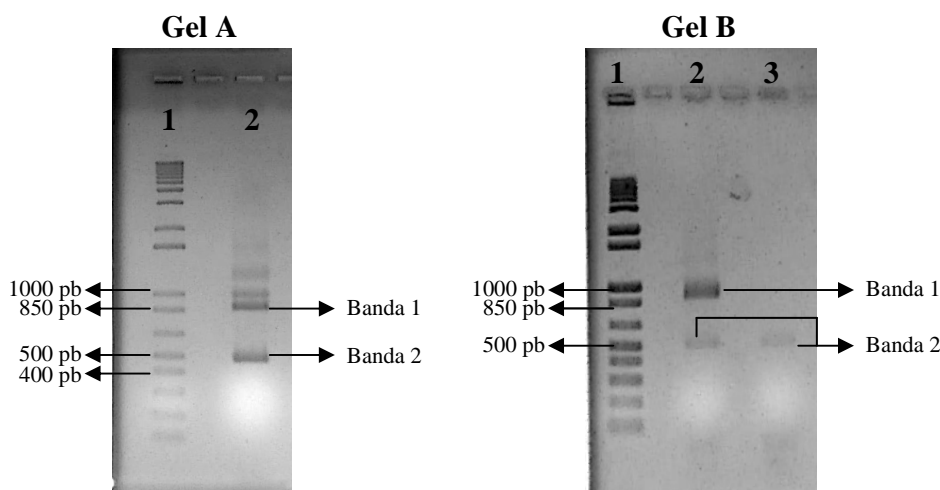


Figura 3.31 - Géis de agarose 1% (p/v) após separação electroforética dos fragmentos da gene 28S rRNA obtidos por amplificação com o par de ‘primers’ LS1.5/LS1.3; **Gel A:** Poço 1 – 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); Poço 2 – *varians*; **Gel B:** Poço 1 - 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); Poço 2 – Az1206/1; Poço 3 – B179 (*Suberites carnosus*).

Da amplificação a partir dos ácidos nucleícos extraídos das esponjas *C. varians*, Az1206/1 (*C. viridis*) e B179 (*Suberites carnosus*), do gene que codifica para a subunidade 28S rRNA, resultaram 2 fragmentos de tamanho diferente (cerca de 500 e 900 pares de bases) para as amostras *varians* e Az1206/1 e apenas 1 fragmento para a amostra B179 (cerca de 500 pares de bases), como se pode observar na figura 3.31. Segundo Ferrara e seus colaboradores, o fragmento de maior tamanho seria devido a ‘annealing’ não específico dos ‘primers’ com o DNA do hospedeiro e o de menor tamanho correspondente à amplificação do gene 28S rRNA dos dinoflagelados (Ferrara, Murgia et al. 2006). Para as amostras em que se obtiveram dois fragmentos, *varians* e Az1206/1, excisou-se uma porção de cada uma das bandas do gel, eluiu-se em tampão TE e utilizou-se este eluato para reamplificação de cada um dos fragmentos separadamente. Para a amostra B179, uma vez que se obteve apenas um fragmento, este foi directamente purificado e sequenciado.

Observou-se, contudo, que, nas amostras em que se obtiveram dois fragmentos, a reamplificação do fragmento de maior tamanho dava origem novamente a dois





Quanto ao fragmento de maior tamanho obtido a partir da amostra *C. varians*, este demonstrou, ao contrário do reportado por Ferrara e colaboradores, pertencer também à espécie *Symbiodinium sp.* e não ao hospedeiro. Este fragmento não apresenta deleção e alinha perfeitamente com o fragmento mais pequeno, excepto na zona de deleção (ver alinhamento 1, Anexo III-C). Esta observação leva-nos a pensar que a existência da deleção no fragmento mais pequeno se deverá a um artefacto experimental como, por exemplo, a formação de estruturas secundárias ou a existência de ‘annealing’ não específico.

Os resultados da amplificação da porção do gene 28S para as restantes amostras encontram-se na seguinte figura:

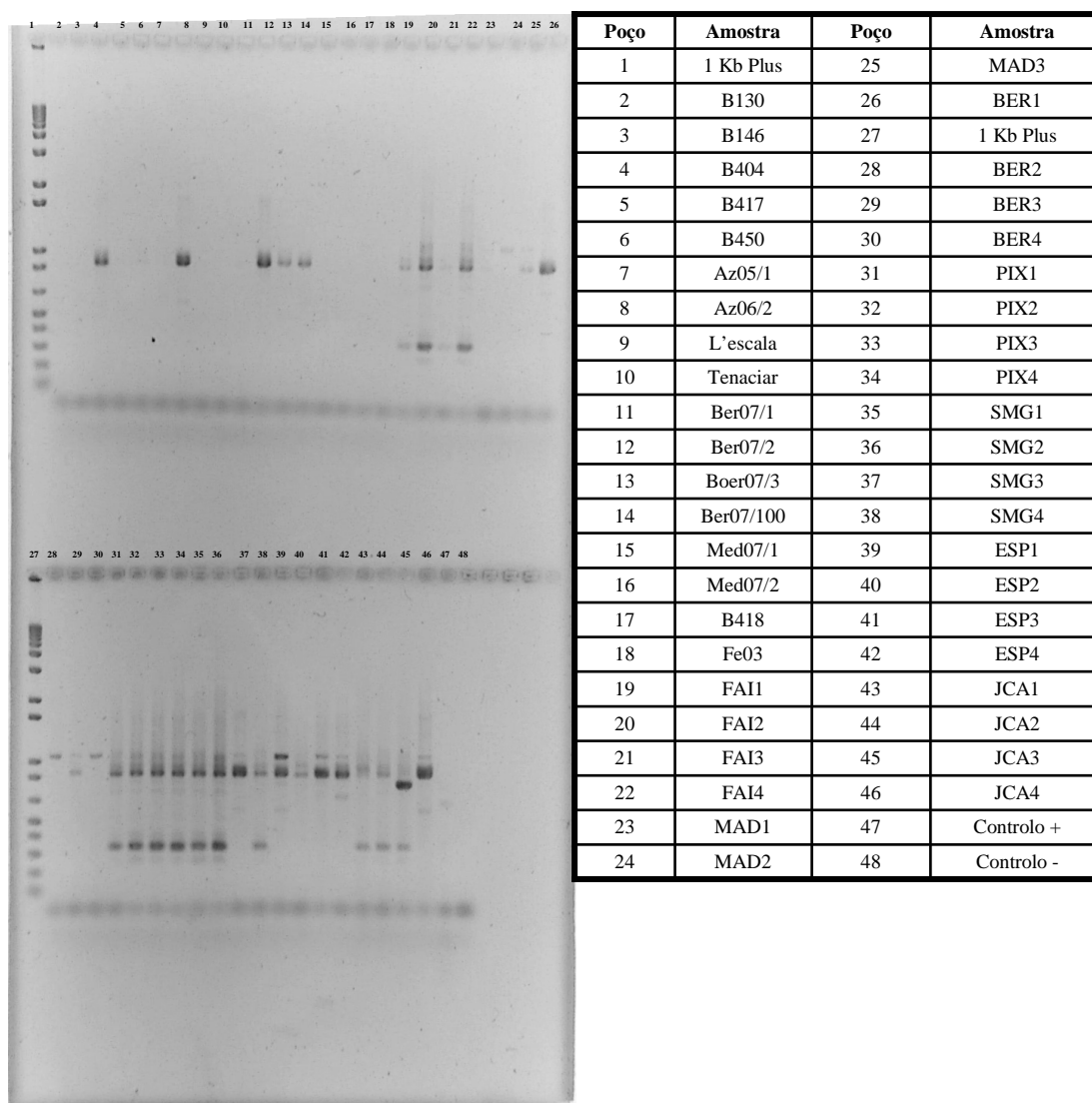


Figura 3.33 - Gel de agarose 1% (p/v) após separação electroforética dos fragmentos 28S rRNA obtidos por amplificação com o par de ‘primers’ LS1.5/LS1.3 e tabela com correspondência poço/amostra.

Como se pode ver na figura 3.33, a amplificação do gene 28S de rRNA com o conjunto de ‘primers’ seleccionados resulta na obtenção de um ou mais fragmentos, dependendo da amostra. Nalgumas amostras observa-se ainda que não houve qualquer amplificação, o que pode ser atribuído a pouca quantidade de DNA ou elevada degradação ou ainda a não existência de dinoflagelados, como se esperaria para as amostras B148 e Fe03, uma vez que estas pertencem à espécie *Cliona celata* que não está descrita como sendo uma espécie zooxantelada. Nas amostras Ber07/2, Ber07/3 e Ber07/100, obteve-se apenas um fragmento com cerca de 900 pares de bases que foi sequenciado directamente após a sua purificação. Nas amostras cuja amplificação resultou na obtenção de mais que um fragmento (amostras FAI2, FAI4, SMG1, SMG2 PIX2, PIX3, PIX4, ESP1 e ESP3), procedeu-se à sua clonagem segundo o mesmo procedimento utilizado para a obtenção de fragmentos de rDNA de bactérias (secção 3.2.1.11.b)iii)) com o intuito de se obter as sequências de ambos os fragmentos (grande e pequeno). Nestas amostras os fragmentos obtidos possuíam cerca de 900 e 350 pares de bases, para o fragmento grande e pequeno, respectivamente. No entanto, a sequenciação destes fragmentos revelou-se extremamente difícil e não resultou em sequências com qualidade passível de posterior análise de homologia entre si ou com a base de dados.

#### ii) Região ITS+28S rRNA – ‘Primers’ Dino18SF/NL4

Uma vez que as sequências resultantes da amplificação do gene 28S possuíam uma deleção de cerca de 300 a 400 pares de bases em relação às sequências encontradas nas bases de dados, o que, de alguma forma, dificultou a determinação de homologia entre as sequências, amplificou-se uma zona mais extensa do DNA ribossomal que nos permitisse esclarecer a existência real da deleção e excluir, ou não, a ocorrência de um artefacto relacionado com o par de ‘primers’ LS1.5/LS1.3. Os géis seguintes apresentam os resultados obtidos desta amplificação.

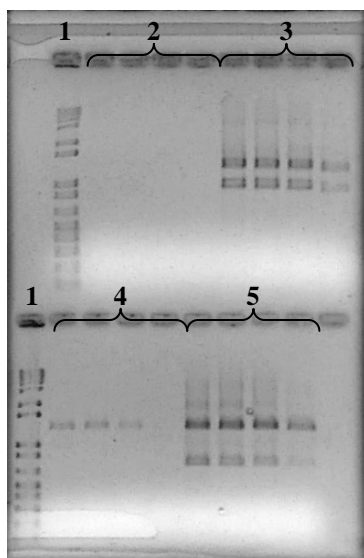


Figura 3.34 - Gel de agarose 1% (p/v) após separação electroforética dos fragmentos obtidos por amplificação com o par de 'primers' Dino18SF/NL4; Poços 1 – 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen), Poços 2 – B179 (*Suberites carnosus*), Poços 3 – varians, Poços 4 – Ber07/1, Poços 5 – Ber07/2.

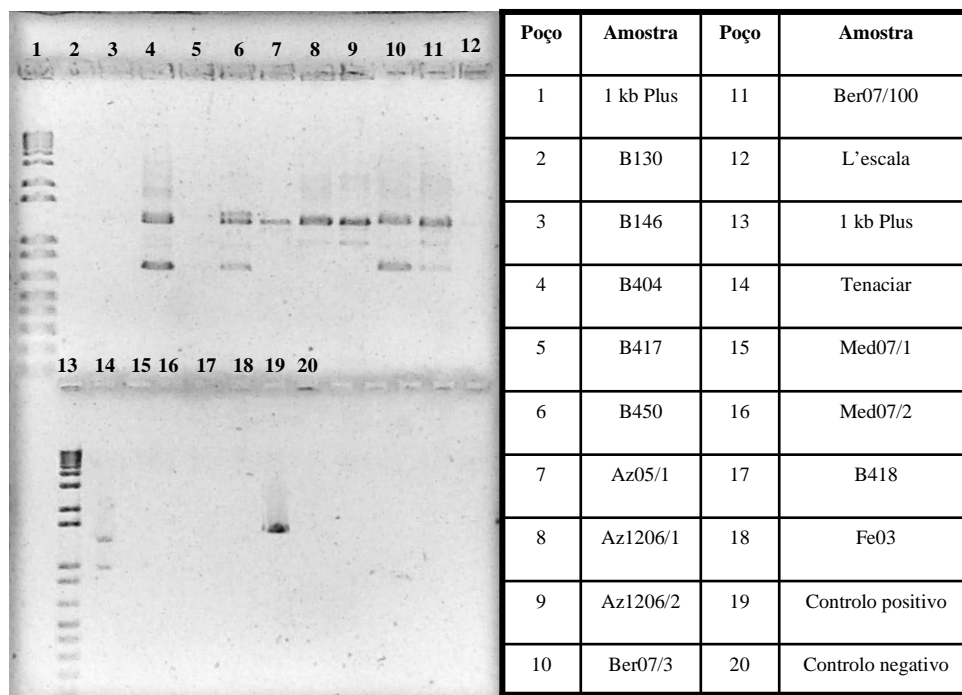


Figura 3.35 - Gel de agarose 1% (p/v) após separação electroforética dos fragmentos obtidos por amplificação dos restantes ácidos nucleicos por nós extraídos com o par de 'primers' Dino18SF/NL4 e respectiva legenda.

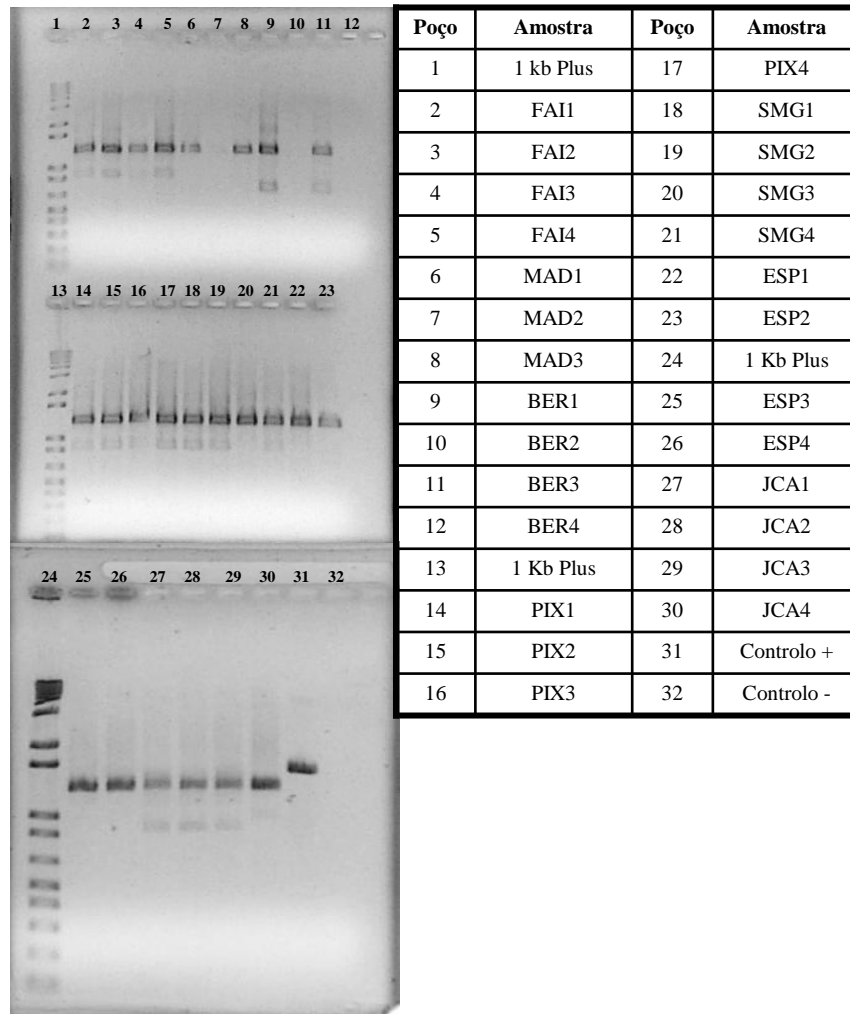


Figura 3.36 - Géis de agarose 1% (p/v) após separação electroforética dos fragmentos obtidos por amplificação dos ácidos nucleicos enviados por Joana Xavier com o par de 'primers' Dino18SF/NL4 e respectiva legenda.

Como se pode observar nas figuras anteriormente apresentadas, a amplificação com este par de 'primers' resultou também na obtenção de um ou dois fragmentos, dependendo da amostra amplificada. Tal como no ensaio anterior e pelas mesmas razões, existem também amostras das quais não resultou qualquer fragmento de amplificação. Este é o exemplo da amostra B179 (*Suberites carnosus*), cuja amplificação se revelou impossível, provavelmente devido a um estado de elevada degradação do DNA (Figura 3.34). Nas amostras Med07/1 e Med07/2 não terá havido amplificação devido a uma extracção pouco eficiente de ácidos nucleicos e nas amostras Fe03 e B418 era já esperada a não existência de amplificação por esta espécie não estar reportada na literatura como espécie hospedeira de dinoflagelados.

Das amostras que constam no gel apresentado na figura 3.35, a amplificação do DNA da amostra pertencente à *Cliona varians* deu origem a dois fragmentos, um com cerca de 900 e outro com cerca de 1400 pares de bases. A partir da amostra Ber07/1, a amplificação resultou apenas num fragmento com cerca de 1400 pares de bases. Para a amostra Ber07/2, obtiveram-se também dois fragmentos, um com cerca de 700 e outro com 1400 pares de bases. Nas amostras em que se observou a existência de dois fragmentos, aplicou-se novamente a estratégia de excisão parcial de bandas e reamplificação. Tal como no ensaio anterior, a reamplificação do maior fragmento dava origem novamente a dois fragmentos. Assim, reamplificou-se o fragmento mais pequeno das amostras *C. varians* e Ber07/2, purificou-se e sequenciou-se.

A fraca qualidade das sequências obtidas para o fragmento mais pequeno resultante da amplificação da amostra *C. varians* não permitiu uma comparação fiável com as sequências da base de dados e, portanto, nada se pôde concluir quanto à existência ou não de uma deleção.

Para a amostra Ber07/1, a amplificação resultou num único fragmento com cerca de 1400 pares de bases que foi directamente purificado e sequenciado, tendo sido obtida uma sequência com cerca de 900 pares de bases. Esta sequência foi, então, comparada com as sequências depositadas na base de dados ‘GenBank’ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) através do software BLAST (Zhang, Schwartz et al. 2000).

Na amostra Ber07/2, a sequência obtida para o fragmento mais pequeno demonstrou, por comparação com as sequências depositadas na base de dados, possuir uma deleção de cerca de 550 pares de bases.

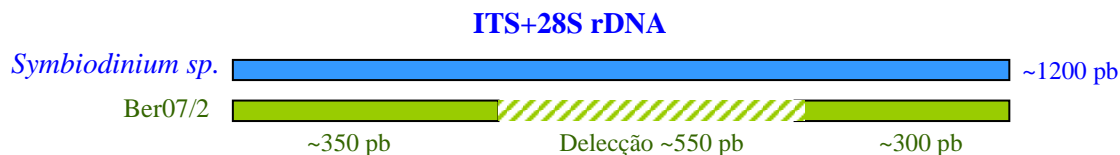


Figura 3.37 – Representação esquemática da deleção encontrada na sequência do fragmento ITS+28S rDNA mais pequeno obtido através da amplificação da amostra Ber07/2 com o par de ‘primers’ Dino18SF/NL4.

O fragmento grande, obtido por amplificação da amostra Ber07/2 com o par de 'primers' Dino18SF/NL4, foi clonado e obtiveram-se duas sequências, uma 'forward' (Ber07/2 SP6), com cerca de 700 pares de bases, e uma 'reverse' (Ber07/2 T7), com cerca de 500 pares de bases, que, dada a extensão do fragmento, não são sobreponíveis. No entanto, após comparação com as sequências depositadas na base de dados, nenhuma das sequências obtidas aponta para a existência de uma deleção. A sequência do fragmento mais pequeno, obtida por sequenciação directa, foi dividida em duas partes, uma a montante da deleção (Ber07/2 Dino18SF.1) e outra a jusante (Ber07/2 Dino18SF.2) e estas depois alinhadas com as sequências obtidas para o fragmento grande. Obteve-se um alinhamento quase perfeito das sequências, excepto na zona da deleção com cerca de 550 pares de bases. Estes alinhamentos encontram-se esquematizados na figura seguinte (Fig. 3.38) e podem ser consultados no Anexo III-C (ver alinhamentos 2.1. e 2.2.).

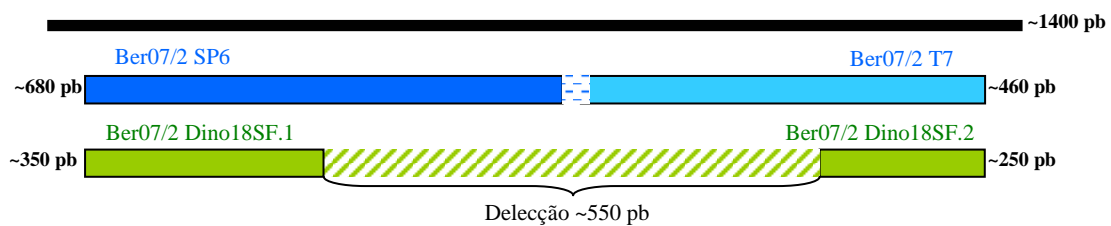


Figura 3.38 – Representação esquemática dos alinhamentos entre as sequências dos fragmentos obtidos após amplificação da amostra Ber07/2.

Mais uma vez, pensamos que esta observação se deverá à existência de um artefacto experimental, provavelmente devido à formação de estruturas secundárias.

Quanto às outras amostras amplificadas, que constam no gel da fig. 3.35, nesta primeira abordagem, e até que conseguíssemos esclarecer a real existência da deleção, optou-se por não sequenciar nenhuma, por todas elas terem originado mais do que um fragmento após amplificação.

Das amostras provenientes da colecção de Joana Xavier (fig. 3.36), foram seleccionadas para sequenciação todas aquelas cuja amplificação resultou na obtenção de apenas um fragmento: FAI3, MAD3, SMG3, ESP3 e JCA4. Estes fragmentos, com cerca de 1400 pares de bases, foram purificados e sequenciados e as sequências obtidas comparadas com as depositadas na base de dados.

Os resultados da amplificação e sequenciação de cada uma das amostras e da comparação das sequências obtidas com as sequências depositadas na base de dados encontram-se resumidos na figura 3.39. Sempre que disponível, utilizou-se a sequência que não apresentava deleção. Para as amostra Az1206/1 e B179 utilizaram-se as sequências com deleção por não ter sido possível obter a sequência do fragmento maior, no primeiro caso, e por termos obtido apenas um fragmento, no caso da B179.

Amostra	Região rDNA amplificada	Dimensão do fragmento amplificado (pb)	Dimensão da sequência com homologia (pb)	Sequência com identidade máxima	Identidade (%)
<i>C. varians</i>	28S	900	867 (sem deleção)	AJ291539 <i>Symbiodinium sp.</i> 1584	93
Az1206/1	28S	500	475 (deleção ~300 pb)	EU315917 <i>Symbiodinium sp.</i> <i>haspestincognitum</i>	95
B179	28S	500	385 (deleção ~400 pb)	AY725461 <i>Symbiodinium sp.</i> OI-S26	98
Ber07/1	ITS+28S	1400	927	AY074940 <i>Symbiodinium sp.</i> type A	99
Ber07/2	ITS+28S	1400	482	EU106360 <i>Symbiodinium sp.</i> Okul1	85
FAI3	ITS+28S	1400	579	EU106360 <i>Symbiodinium sp.</i> Okul1	85
MAD3	ITS+28S	1400	500	EU106360 <i>Symbiodinium sp.</i> Okul1	86
SMG3	ITS+28S	1400	500	EU106360 <i>Symbiodinium sp.</i> Okul1	86
ESP3	ITS+28S	1400	645	EU106360 <i>Symbiodinium sp.</i> Okul1	86
ICA4	ITS+28S	1400	509	EU106360 <i>Symbiodinium sp.</i> Okul1	86

Figura 3.39 – Tabela resumo das sequências obtidas após amplificação de DNA extraído de algumas amostras de esponjas marinhas com ‘primers’ específicos para dinoflagelados e correspondentes homologias com as sequências depositadas na base de dados ‘Genbank’.

Embora os resultados obtidos não permitam a realização de uma análise filogenética, devido quer à baixa percentagem de identidade de algumas sequências quer à existência de deleção, existem algumas observações que é importante salientar. Em primeiro lugar, todas as sequências obtidas apresentam identidade com sequências de *Symbiodinium spp.*, confirmando a existência destes microrganismos nas esponjas

bioacumuladoras. Esta observação não é nova; foi já reportada por vários autores a existência de dinoflagelados em esponjas escavantes pertencentes ao género *Cliona*. Mas, até à data, ainda não tinha sido observada a existência destes microrganismos fotossintéticos em esponjas da espécie *Suberites carnosus*. Na amplificação do gene 28S de rDNA para amostra B179, pertencente à espécie *Suberites carnosus*, obteve-se uma sequência que apresenta máxima identidade (em cerca de 98%) com a sequência de um dinoflagelado isolado de uma esponja marinha pertencente à espécie *Cliona orientalis* (Schönberg e Loh 2005). Contudo, as generalizações deverão ser feitas com cautela, uma vez que, neste trabalho, foi analisada apenas uma amostra pertencente a esta espécie.

A região ITS (do inglês ‘internal transcribed spacer’ ou espaçador interno transcrito) refere-se a uma porção de DNA não funcional, existente entre genes contíguos e que, durante a maturação do rRNA, são excisados e rapidamente degradados. Actualmente, a comparação de sequências da região ITS é uma das mais utilizadas em análises filogenéticas devido ao seu elevado grau de variabilidade, mesmo entre espécies muito próximas. Esta elevada variabilidade da região ITS pode ser explicada com base na baixa pressão selectiva a que estas sequências não funcionais estão sujeitas, uma vez que a sua transcrição não resulta na formação de componentes vitais para a célula. Assim, tal como seria de esperar, as sequências correspondentes apenas à amplificação parcial do gene 28S de rRNA possuem maior identidade com as sequências depositadas na base de dados do que aquelas que incluem a região ITS+28S rDNA. De facto, as regiões intragénicas (ITS) apresentam uma elevada variabilidade que, em alguns estudos, permitiu até distinguir sub-grupos de dinoflagelados e relacioná-los com a profundidade a que se encontrava o organismo hospedeiro (Frade, Jongh et al. 2008). No entanto, outros autores defendem que esta variabilidade pode constituir uma desvantagem quando se trata de análises filogenéticas, uma vez que poderá erradamente conduzir à conclusão de que a variabilidade intraespecífica do organismo é muito superior àquela que existe na realidade, confundindo as estimativas de biodiversidade (Thornhill, Lajeunesse et al. 2007). Será essencial um estudo mais aprofundado, com sequências maiores e obtidas para um maior número de amostras, para esclarecer qual a região de amplificação mais apropriada que permita estabelecer uma filogenia adequada dos dinoflagelados existentes nestas esponjas. Para além disso,



a deleção encontrada nalgumas sequências poderá influenciar fortemente os estudos de homologia com as sequências da base de dados.

É também interessante notar que, nas sequências correspondentes à região ITS+28S rDNA, e com excepção para a amostra Ber07/1, a identidade com as sequências depositadas na base de dados é inferior a 87% mas, entre si, estas sequências possuem homologias da ordem dos 98%. Esta observação parece apontar para a existência de dinoflagelados específicos para a espécie *Cliona viridis*, independentemente da sua localização geográfica. Para as espécies *Cliona varians* e *Suberites carnosus* nada podemos concluir, uma vez que as sequências obtidas não incluem a zona ITS. De novo, esta observação de especificidade de estirpes de *Symbiodinium spp.* presentes nestas esponjas carece de um estudo mais aprofundado.

Para a maioria das sequências obtidas, a máxima identidade foi encontrada com sequências da base de dados provenientes de *Symbiodinium spp.* potencialmente livres isolados a partir de sedimentos existentes em barreiras de coral no Japão (Hirose, Reimer et al. 2008). É bastante curiosa esta observação, já que as sequências da base de dados provêm de organismos isolados no Oceano Pacífico e as esponjas analisadas no presente trabalho são provenientes do Oceano Atlântico. Contudo, salvaguarda-se o facto de o grau de identidade ser baixo e de que a maioria dos estudos filogenéticos realizados em *Symbiodinium spp.* focarem organismos provenientes do Oceano Pacífico ou região Indo-Pacífico, o que obviamente leva a que o número de sequências disponíveis nas bases de dados respeitantes a organismos isolados noutras regiões esteja em clara inferioridade e possa ser causa de conclusões desviadas da realidade.

Como conclusão, dos resultados obtidos neste ensaio podemos então dizer que:

i) As esponjas bioacumuladoras de níquel, pertencentes às espécies *Cliona viridis*, *Cliona varians* e *Suberites carnosus*, possuem dinoflagelados; estes resultados confirmam as conclusões já reportadas por outros autores quanto à presença de dinoflagelados nas espécies escavantes *C. varians* e *C. viridis* mas, tanto quanto se sabe, até agora ainda não tinha sido reportada a existência de *Zooxanthellae* na espécie *Suberites carnosus*;

ii) Os dinoflagelados presentes nestas esponjas pertencem ao género *Symbiodinium*; a elevada homologia entre as sequências obtidas neste estudo e o baixo grau de identidade com as sequências depositadas na base de dados, apontam para a existência de um dinoflagelado comum e específico nestas esponjas; no entanto, os resultados obtidos não nos permitem concluir com segurança quanto à sua especificidade ou existência ou não de simbiose com o hospedeiro;

iii) Não foi possível detectar dinoflagelados nas esponjas não acumuladoras de níquel, pertencentes à espécie *Cliona celata*;

iv) Não é possível, com base nos resultados obtidos, estabelecer ou afastar a hipótese de existir uma correlação entre a presença de dinoflagelados na esponja e o fenómeno de bioacumulação de níquel; no entanto, a elevada homologia entre as sequências obtidas e a sua baixa percentagem de identidade com as sequências existentes na base de dados, parecem apontar para a existência de dinoflagelados específicos nas espécies de esponjas bioacumuladoras, que poderiam constituir os verdadeiros organismos bioacumuladores. Será necessário um estudo mais aprofundado, com maior número de amostras, para esclarecer estes resultados.

De facto, o envolvimento de dinoflagelados simbióticos em fenómenos de acumulação de metais não é novo. Já em 1981 se reconhecia a participação crucial destes organismos fotossintéticos na acumulação de arsénico encontrada em várias espécies de invertebrados marinhos da Grande Barreira de Coral (Benson e Summons 1981). Em 1990, Harland e Nganro, perante a descoberta da acumulação de cobre na anémone *Anemonia viridis*, propõem o envolvimento dos seus zooxanthellae simbiotes na regulação das concentrações de cobre no hospedeiro (Harland e Nganro 1990). Mais tarde, outros investigadores debruçaram-se sobre a acumulação de metais pesados em anémonas zooxanteladas e, também eles, concluíram que esta acumulação se correlacionava directamente com o estado simbiótico do hospedeiro (Mitchellmore, Verde et al. 2003). Na mesma altura, era reportado o papel fundamental de zooxantellae simbióticos na acumulação e regulação de vários metais em corais (Reichelt-Brushett e McOrist 2003). Todos estes exemplos, em conjunto com os resultados obtidos, levam-nos a crer que a hipótese da existência de um putativo dinoflagelado simbiótico específico nas esponjas bioacumuladoras de níquel e da sua responsabilidade, pelo

menos parcial, no fenómeno de bioacumulação, será plausível e uma proposta a ter em conta em estudos futuros.

b) Bactérias

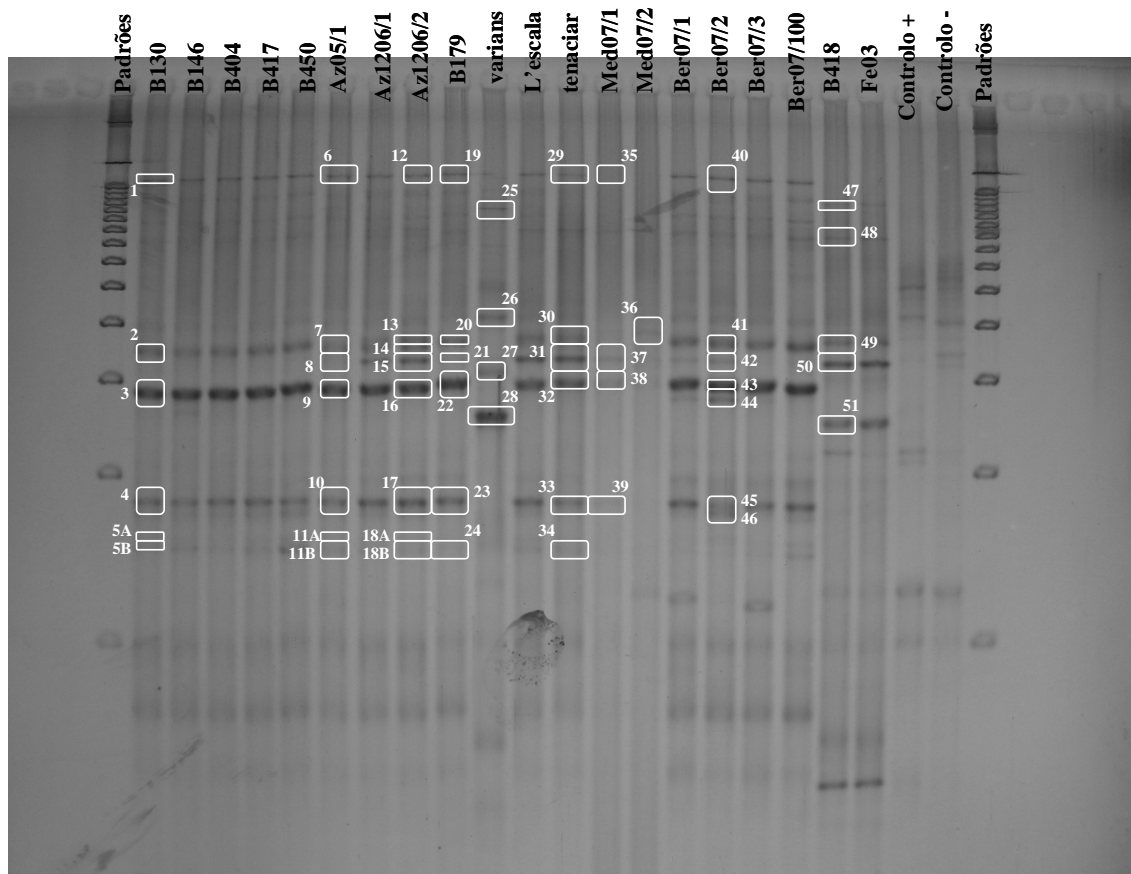


Figura 3.40 - Gel de TGGE obtido para a análise dos fragmentos resultantes da amplificação do gene 16S rDNA das bactérias associadas às esponjas marinhas; padrões – marcadores de massa molecular 100 bp DNA Ladder (Invitrogen).

Observando atentamente o gel de TGGE obtido (Fig. 3.40), vemos que existem várias bandas comuns entre todas as esponjas bioacumuladoras que não estão presentes nas amostras que correspondem às esponjas que não apresentam teores consideráveis de níquel (amostras pertencentes à espécie *C. celata* – B418 e Fe03). Estas bandas comuns são as correspondentes às bandas 1, 2, 3 e 4 assinaladas para a amostra B130.

Nas amostras provenientes dos Açores, Az1206/1 e Az1206/2, existe uma banda dupla correspondente à banda 2 e ainda uma banda adicional assinalada com o nº 15.

Na amostra B179, pertencente à espécie *Suberites carnosus*, existe também uma banda correspondente à banda 15, para além das outras 4 bandas comuns a todas as amostras de espécies bioacumuladoras.

Na amostra pertencente à espécie *C. varians*, parece existir um deslocamento de todas as suas bandas em relação às bandas comuns. Assim, a banda 25 da amostra *C. varians* corresponderá à banda 1 da amostra B130, a banda 27 à banda 2 e a banda 28 à banda 3. Não é observável a banda correspondente à banda 4 mas existe uma banda adicional assinalada com o nº 26.

As amostras provenientes do Norte de Espanha, l'escala e tenaciar, apresentam também uma banda adicional, para além das 4 bandas comuns já referidas, assinalada, para a amostra tenaciar, pelo nº 31, que parece corresponder à banda 15 da amostra Az1206/2.

Nas amostras provenientes do mediterrâneo – Med07/1 e Med07/2 –, pertencentes à espécie *Cliona parenzzani*, as bandas observáveis são muito ténues mas é possível encontrar as 4 bandas comuns às esponjas bioacumuladoras bem como uma banda adicional correspondente à banda 31 da amostra tenaciar, assinalada pelo nº 37. O facto de, nestas amostras, as bandas serem menos intensas estará relacionado com uma extracção de DNA pouco eficiente, devido a estas terem sido conservadas numa solução de formalina, o que terá dificultado a disrupção celular e, conseqüentemente, a extracção dos ácidos nucleicos.

Nas amostras Ber07 observa-se, para além das 4 bandas comuns, nas amostras Ber07/1 e Ber07/2 duas bandas adicionais, assinaladas com os números 42 e 44. A banda 42 é correspondente à banda 31 existente na amostra tenaciar. Na amostra Ber07/2 observa-se ainda a existência de uma banda dupla (45 e 46) na zona correspondente à banda 4 da amostra B130.

Nas amostras pertencentes à espécie *Cliona celata*, B418 e Fe03, existem duas bandas comuns às existentes nas espécies bioacumuladoras: a banda 49, correspondente

à banda 2 da amostra B130 e a banda 50 correspondente à banda 31 da amostra tenaciar. As bandas 47 e 51 não encontram correspondência entre as bandas existentes nas amostras de espécies bioacumuladoras, embora a banda 51 apresente um padrão de migração semelhante ao da banda 28 existente na amostra varians. Quanto à banda 48, existem algumas bandas correspondentes nas outras amostras embora não sejam tão nítidas.

As bandas que apresentassem correspondência com bandas existentes nos controlos positivo (+) e negativo (-) foram ignoradas, por constituírem provavelmente contaminação ou artefactos experimentais.

Todas as bandas assinaladas foram excisadas do gel e eluídas mas apenas as bandas 1, 2, 3, 4, 9, 16, 22, 25, 26, 27, 28, 32, 38, 43, 47, 48, 49, 50 e 51 foram clonadas e sequenciadas, segundo o protocolo descrito na secção 3.2.1.11.b)iii). Dos 19 fragmentos clonados, apenas 4 resultaram em sequências cuja identidade foi possível determinar:

- Banda 1, proveniente da esponja B130, pertencente à espécie *Cliona viridis* e acumuladora de níquel;
- Banda 25, proveniente da esponja varians, pertencente à espécie *Cliona varians* e também acumuladora de níquel;
- Bandas 47 e 48, provenientes da esponja B418, pertencente à espécie *Cliona celata* e não acumuladora.

As restantes bandas poderão ter resultado da formação de quimeras e constituem, portanto, artefactos experimentais. Ressalva-se, no entanto, o facto de não terem sido sequenciados todos os fragmentos correspondentes a bandas existentes no gel. Com as sequências obtidas para os fragmentos clonados das bandas 1, 25, 47 e 48 e as sequências mais próximas retiradas da base de dados foi construído o dendrograma que se apresenta na figura 3.41, através do software Mr. Bayes e utilizando o método de ‘neighbor joining’ (Huelsenbeck e Ronquist 2001).

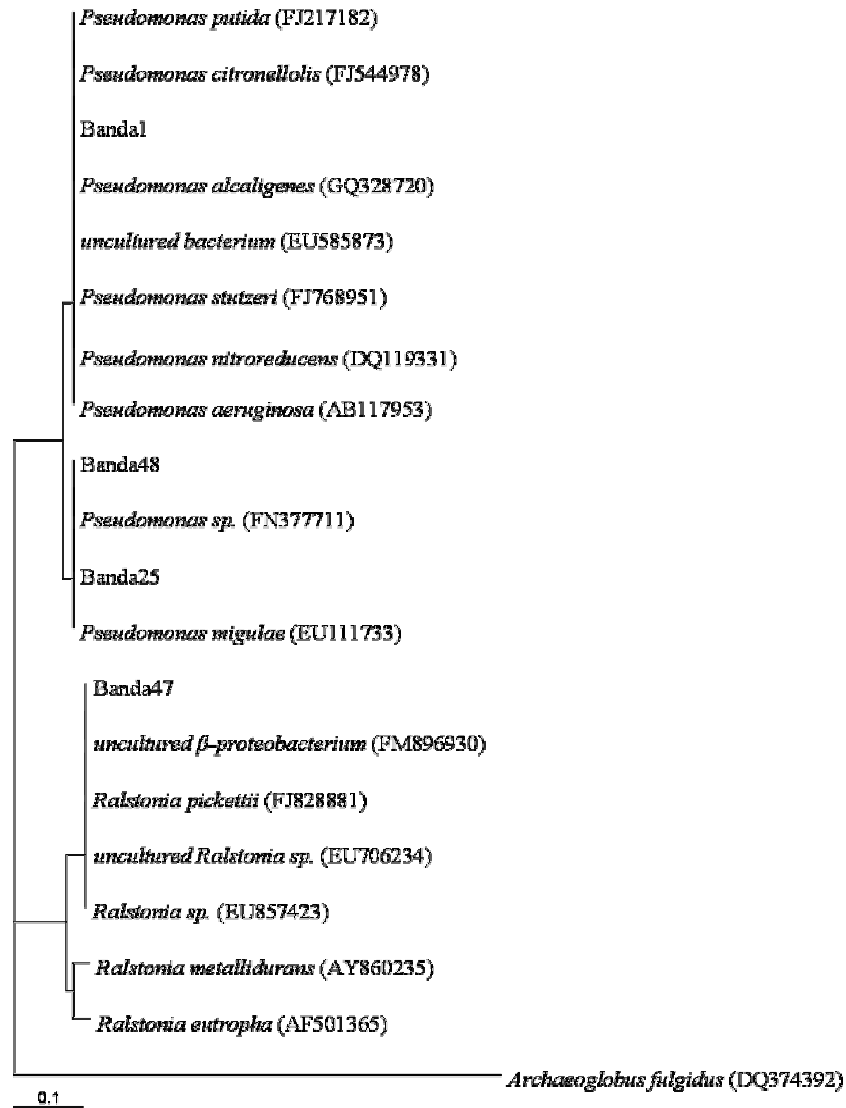


Figura 3.41 – Construção filogenética baseada em sequências parciais 16S rDNA de fragmentos clonados isolados a partir de excisão de bandas de TGGE de bactérias associadas a esponjas marinhas

A análise filogenética dos fragmentos obtidos através da clonagem das bandas 1, 25 e 48 aponta para a presença de bactérias do género *Pseudomonas*, sendo que a banda 1 é filogeneticamente mais aparentada com a espécie *Pseudomonas aeruginosa* e as bandas 25 e 48 com a espécie *Pseudomonas migulae*, pertencente ao grupo tipo *Pseudomonas fluorescens* (Anzai, Kim et al. 2000). Esta observação não é surpreendente, uma vez que estes microrganismos são comuns no meio ambiente, em solos, sedimentos e águas. A espécie *Pseudomonas aeruginosa* está também reportada como um agente patogénico oportunista, responsável por infecções respiratórias graves

em humanos, contaminante em ambiente hospitalar e causador de infecções nosocomiais (Todar 2008).

São vários os estudos que se têm debruçado sobre a acumulação de metais por microrganismos do género *Pseudomonas* e a sua potencial aplicação na bioremediação de solos e águas contaminados (Sar, Kazy et al. 2001; Gupta, Kumar et al. 2004; Patel, Patel et al. 2006; Tripathi e Srivastava 2006) (entre outros). No entanto, a existência de microrganismos do género *Pseudomonas* tanto em esponjas não acumuladoras (Banda 48 da esponja B418 – *Cliona celata*) como em esponjas acumuladoras de níquel (Banda 1 da esponja B130 – *Cliona viridis* e Banda 25 da espécie *Cliona varians*), não sustenta a hipótese de que estes sejam os potenciais bioacumuladores de níquel nas esponjas que apresentam elevados teores deste metal.

Quanto ao fragmento correspondente à banda 47, obtido a partir da amostra B418, uma das esponjas não acumuladoras de níquel pertencente à espécie *Cliona celata*, os resultados provenientes da análise da sua filogenia apontam para um microrganismo do género *Ralstonia*. Tanto a espécie *Ralstonia metallidurans* (também designada na literatura por *Ralstonia eutropha*) como a espécie *Ralstonia pickettii* são comuns em locais de elevada contaminação ambiental, sendo que a primeira aparece quase sempre associada a contaminação com metais pesados (Mergeay, Monchy et al. 2003) e a segunda em locais de contaminação com hidrocarbonetos e solventes orgânicos altamente tóxicos (Ryan, Pembroke et al. 2007). Os seus mecanismos de resistência e tolerância à poluição são, hoje em dia, alvo de diversos estudos que têm em vista, não só um conhecimento mais aprofundado sobre os processos bioquímicos envolvidos, como também a sua eventual aplicação biotecnológica na área da bioremediação. Contudo, este não será um candidato provável a um putativo microrganismo bioacumulador de níquel associado às esponjas marinhas, uma vez que foi encontrado numa esponja cujos teores de níquel são baixos.

Esta pesquisa por um procariota eventualmente responsável pela bioacumulação de níquel observada nas esponjas marinhas tinha como critérios principais: i) que este estivesse consistentemente associado a todas as esponjas com elevados teores de níquel pertencentes ao “complexo *Cliona viridis*”, independentemente da espécie e da sua localização geográfica, e ii) não estar presente em esponjas não acumuladoras. Neste

estudo não foi possível encontrar um microrganismo com estas características. Fica por esclarecer se um eventual organismo procariota poderá ser parcial ou totalmente responsável pela bioacumulação observada nestas esponjas. A clonagem e sequenciação das restantes bandas excisadas do gel de TGGE poderá revelar novos resultados importantes. A realização desta mesma estratégia experimental utilizando mais espécimens de esponjas marinhas pertencentes às espécies *Cliona varians*, *Suberites carnosus* e *Cliona celata*, bem como de outras espécies pertencentes ao género *Cliona*, poderá também tornar este estudo muito mais consistente e dele poder-se-ão, então, retirar conclusões mais fidedignas.



### 3.3. NOTAS CONCLUSIVAS DO CAPÍTULO 3

Em 1996, a população mundial atingia já os seis mil milhões; estima-se que em 2100 este número duplicará, tendo em conta o aumento da longevidade, alcançado através dos constantes avanços da ciência na área da saúde humana. Com o aumento da população, aumentará também a diversidade e a quantidade de substâncias químicas, muitas delas tóxicas e perigosas, que são libertadas no meio ambiente. Estes compostos incluem químicos utilizados quotidianamente nas nossas casas, como também resíduos industriais, cujos materiais ou os seus produtos de degradação se acumulam no solo e contaminam fontes de água e sedimentos.

Existe um alerta crescente para o facto de muitas das doenças que assolam a espécie humana estarem associadas a uma componente ambiental que poderia ter sido prevenida. O aumento da contaminação ambiental representa, hoje em dia, um desafio à escala global da nossa sociedade no sentido de encontrar medidas de descontaminação e remediação que permitam reverter este impacto que ameaça severamente o meio ambiente e a saúde humana.

A bioremediação consiste na utilização total ou parcial de organismos naturais, seleccionados ou geneticamente modificados, na limpeza de ambientes poluídos, através da redução da biodisponibilidade dos compostos tóxicos ou da sua conversão em produtos potencialmente menos perigosos. Esta abordagem revelou já ser uma medida económica e viável na descontaminação de combustíveis, metais, pesticidas, etc. No entanto, continua a ser imperativa a pesquisa por novas soluções integradas que acompanhem, em termos de descontaminação, a indústria e tecnologia contaminantes.

A par de políticas de protecção ambiental em grande escala, são também essenciais campanhas de biomonitorização sérias e sustentadas que permitam avaliar, em tempo útil para uma intervenção eficaz e minimizando os impactos irreversíveis, o risco ambiental dos ecossistemas.

Neste capítulo, pretendeu-se estudar a bioacumulação de níquel observada em várias espécies de esponjas marinhas pertencentes à família *Clionidae* e na espécie *Suberites carnosus*. Este estudo visou aprofundar o conhecimento sobre o mecanismo e função desta bioacumulação na perspectiva duma eventual aplicação na área da biomonitorização e bioremediação.

Na avaliação dos riscos ambientais através de campanhas de biomonitorização, os organismos devem ser criteriosamente seleccionados, no sentido de reflectirem realmente as condições ambientais e não constituírem excepções em termos de metabolismos especiais que levem a conclusões desviadas da realidade ambiental do ecossistema em estudo. A observação de que a bioacumulação de níquel por parte destas esponjas é independente da sua localização geográfica e da contaminação ambiental, leva-nos a pensar que estas espécies não constituirão indicadores fidedignos em estudos de biomonitorização. Os resultados obtidos apontam para que esta bioacumulação seja resultado do metabolismo do animal, ou de um consórcio microbiano, cuja função não foi possível esclarecer.

Os estudos desenvolvidos no presente trabalho poderão, porém, constituir uma potencial alternativa com aplicação biotecnológica em termos de bioremediação. Contudo, será essencial esclarecer qual a origem biológica da bioacumulação. Se se determinar que o organismo bioacumulador é um microrganismo cultivável, o seu cultivo e inoculação em locais contaminados poderá constituir uma forma de remoção e até de recuperação deste ou de outros metais. Se a esponja for realmente responsável pela bioacumulação de níquel, a sua utilização total como organismo vivo e eventual introdução em águas contaminadas não constituirá uma alternativa viável, uma vez que o cultivo destes animais se reveste de extrema dificuldade. No entanto, depois de elucidado o mecanismo de bioacumulação utilizado pelo animal, este poderá constituir fonte de inspiração para a síntese e/ou biossíntese de moléculas com aplicação em biofiltros. Contudo, terão que ser ainda empregues muitos esforços até que este objectivo final consiga ser atingido.

Os resultados obtidos ao longo do trabalho desenvolvido, descrito neste capítulo, revelaram algumas evidências que nos motivam para a continuação desta linha de investigação, mas muito trabalho fica ainda por fazer. Parece existir uma bioacumulação de níquel que é específica e concomitante em todas as espécies pertencentes ao “complexo *Cliona viridis*”, independentemente da sua localização geográfica e não relacionada com contaminação ambiental. Estas espécies possuem teores médios de níquel de cerca de 1300 ppm, valores cerca de 16 vezes acima dos encontrados naturalmente na crosta terrestre, e equiparáveis aos valores de metais mais comuns em organismos, como o ferro e o zinco. A reprodutibilidade destes valores em todos os espécimens, independentemente do seu local e data de recolha, aponta para que esta

bioacumulação não esteja correlacionada com uma possível contaminação ambiental, nem com um putativo simbionte local e/ou sazonal. Estas observações são sustentadas pelo facto de esponjas de outra espécie recolhidas nas mesmas zonas não possuírem teores de níquel comparáveis.

Com base nos resultados obtidos, não foi possível esclarecer o mecanismo nem a função desta bioacumulação. No entanto, os resultados sustentam a hipótese de o níquel poder estar na sua forma iónica livre,  $\text{Ni}^{2+}$ , ou associado a uma molécula de baixa massa molecular (inferior a 3000 Da), catiónica e que não é de natureza glicídica nem proteica, excluindo-se, portanto, a hipótese de associação do níquel a uma metalotionina. Determinou-se também que o níquel não participará em ligações com átomos de enxôfre, uma vez que não se detectou a presença de grupos tiol nas fracções cromatográficas recolhidas. As evidências apontam para que a maior parte, senão a totalidade, do níquel esteja em zonas extracelulares. Obviamente que, na hipótese de o níquel estar presente na sua forma  $\text{Ni}^{2+}$ , ele não poderá estar livre na célula ou tecido extracelular, uma vez que tal poderia desencadear uma série de reacções oxidativas extremamente danosas para o organismo. Neste caso, o níquel terá que estar adsorvido a algum componente da célula ou eventualmente acumulado em vesículas ou grânulos minerais. A obtenção de uma amostra de esponja logo após a sua recolha e posterior preparação e observação por microscopia electrónica de transmissão (TEM, do inglês 'transmission electron microscopy') com análise elementar acoplada fornecerá, com certeza, informações cruciais para o esclarecimento quanto à localização do níquel no tecido do animal. A eventual co-localização de níquel em zonas específicas do tecido poderá ajudar a retirar algumas conclusões quanto à sua possível função e mecanismo de bioacumulação. Infelizmente, no decurso deste trabalho não nos foi possível ter acesso a esta análise, quer por falta de material biológico, quer por impossibilidade de acesso às técnicas de preparação prévia da amostra.

Neste trabalho estudaram-se também os microrganismos embebidos no tecido de algumas esponjas. Enquanto que os ensaios dependentes de cultura levaram à obtenção de vários isolados microbianos e à descoberta de uma molécula fluorescente, cujo potencial abriu novas linhas de investigação e foi estudado em trabalhos paralelos, os estudos de filogenia, realizados através de técnicas de biologia molecular, embora não particularmente conclusivos, demonstraram a presença de dinoflagelados pertencentes à espécie *Symbiodinium spp.* em todas as esponjas bioacumuladoras. Com base nos

resultados obtidos, estes microrganismos, embora bastante semelhantes entre si nas esponjas analisadas neste trabalho, parecem ser bastante diferentes dos reportados na literatura, constituindo potenciais candidatos a serem os verdadeiros responsáveis pela bioacumulação de níquel. No entanto, esta hipótese carece de um estudo mais abrangente e aprofundado, com a utilização de outras técnicas. Também aqui a análise por TEM poderá constituir uma ferramenta poderosa, caso se encontre uma co-localização do níquel nas células destes microrganismos. Quanto a microrganismos procaríotas, nos estudos de filogenia encontraram-se representantes dos géneros *Pseudomonas* e *Ralstonia*, o que, de resto, não é surpreendente e tinha já sido antes reportado noutros trabalhos. Nenhum se revelou um possível candidato a organismo bioacumulador, já que não se encontraram procaríotas consistentemente associados a todas as esponjas bioacumuladoras que não estivessem presentes em esponjas com baixos teores de níquel. Por outro lado, não se descarta a possibilidade destes resultados serem provenientes de uma eventual contaminação laboratorial.

Numa eventual continuação desta linha de investigação, os objectivos mais próximos a focar serão então o esclarecimento da origem biológica da bioacumulação e o estudo do próprio mecanismo de bioacumulação. Se se revelar que o verdadeiro bioacumulador é um microrganismo associado, o passo seguinte passará obviamente pelo estabelecimento e optimização das suas condições de cultura. Quanto ao estudo do mecanismo de bioacumulação, caso este revele o envolvimento de uma molécula captadora de níquel, esta deverá ser identificada, isolada e caracterizada, podendo vir a constituir inspiração para uma mimetização sintética do seu modo de funcionamento, tendo em vista uma potencial aplicação biotecnológica na área da bioremediação e/ou biorecuperação.



## **4. CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS**

---



## **4. CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS**

No ano de 1969, Neil Armstrong e restante tripulação da missão espacial Apollo XXI chegavam à Lua, abrindo uma nova era de “dar novos mundos ao mundo”, iniciada 500 anos antes pelos grandes navegadores ibéricos durante a época dos Descobrimientos. Desde então têm sido empregues grandes esforços, humanos, científicos e económicos, na exploração espacial. No entanto, o meio marinho e o mundo subaquático do nosso próprio planeta continuam a ser misteriosos e enigmáticos para o conhecimento humano. O aparecimento de novas tecnologias de exploração oceânica – como por exemplo os submergíveis de alta profundidade - bem como as diversas abordagens a nível bioquímico – em áreas tão diversas como a metabolómica e a metagenómica - permitiram o acesso a “universos” subaquáticos até então desconhecidos e abriram horizontes para a descoberta de novas aplicações na área biotecnológica. Os avanços tecnológicos e científicos no âmbito das ciências do mar têm oferecido o conhecimento de ecossistemas únicos, de organismos extraordinários, com adaptações notáveis e compostos exclusivos que demonstraram possuir uma panóplia de actividades biológicas e farmacológicas surpreendentes. São dignos de nota exemplos como a aplicação farmacológica das toxinas produzidas por caracóis marinhos – conotoxinas – no tratamento da dor, tendo demonstrado um poder analgésico muito superior à da própria morfina, constituindo uma das primeiras substâncias com origem num organismo marinho a ser utilizada com fins terapêuticos (Becker e Terlau 2008). A este reúnem-se outros casos como a potencial aplicação das fibras de esponjina existentes em esponjas marinhas na mineralização do osso (Kim, Mendis et al. 2009) e na própria osteogénese (Green, Howard et al. 2003), bem como propriedades ópticas únicas descobertas nas espículas siliciosas das esponjas marinhas (Kulchin, Bezverbny et al. 2009). Estes serão apenas alguns dos exemplos mais emblemáticos no contexto da biotecnologia marinha.

A ligação de Portugal ao mar é antiga, íntima e está profundamente enraizada na cultura portuguesa. Na História, em que valorosos descobridores navegaram “por mares nunca dantes navegados”; na Literatura, em poemas como o tão conhecido “Mar



Português” de Fernando Pessoa, onde o escritor interpela directamente o mar dizendo-lhe “Oh mar salgado, quanto do teu sal são lágrimas de Portugal”; na Música, em canções como a “Canção do Mar”, interpretada pela primeira vez por Amália Rodrigues e, mais tarde, sujeita a outras versões. O Mar faz parte do **ser** português.



Figura 4.1 – Carta da Zona Económica Exclusiva Portuguesa (retirado de <<http://www.naval.com.br/blog/wp-content/uploads/2009/09/zee-portugal.jpg>>)

Portugal possui uma orla costeira extensa, com um total de 1 727 408 km<sup>2</sup> de área de Zona Económica Exclusiva (ZEE) de espaço marítimo, incluindo as zonas costeiras de Portugal Continental, Açores e Madeira, a terceira maior da União Europeia e a décima primeira em termos mundiais. Estão a ser realizados estudos de extensão da plataforma continental que irão atribuir a Portugal a jurisdição de novo território marítimo, acrescentando até 1,3 milhões de quilómetros quadrados, isto é, 14,9 vezes a área de Portugal Continental. Com este acréscimo, Portugal passará a ter uma área total de 3 027 408 km<sup>2</sup>, o que fará saltar de 11<sup>a</sup> maior ZEE do mundo para 10<sup>a</sup>, imediatamente atrás do Brasil, com 3.660.955 km<sup>2</sup> (Instituto Geográfico Português 2009). Fará, obviamente, sentido a exploração científica destes recursos como parte de uma estratégia global de aproveitamento dos recursos naturais do país, com o objectivo do fortalecimento da própria economia.

Neste trabalho reportaram-se dois casos de estudo com potencial aplicação na área biotecnológica: uma espécie de esponjas marinhas que demonstrou possuir uma potentíssima actividade de inibição do VIH-1 e um conjunto de espécie bioacumuladoras de níquel. O primeiro caso poderá ter evidente aplicação farmacêutica

na luta contra a infecção por VIH-1, enquanto o segundo encontrará possível aplicação na área da bioremediação.

No capítulo 2 da presente dissertação, foi estudada a actividade de inibição de replicação do VIH-1 observada *in vitro* através da aplicação de extractos provenientes de várias esponjas marinhas pertencentes à espécie *Erylus discophorus*. Embora não tenha sido possível isolar a(s) molécula(s) responsável(eis) por esta inibição nem estudar o seu mecanismo, conseguimos obter algumas informações extremamente importantes e que definirão a estratégia futura para o eventual prosseguimento deste trabalho:

- A actividade de inibição é característica consistente da espécie, independentemente da localização geográfica;
- O mecanismo de inibição funcionará provavelmente ao nível da adsorção e fusão do vírus com a célula linfocítica;
- A principal molécula responsável pela actividade de inibição é extremamente hidrofílica e aniónica a pH 6, de natureza glicídica ou glicoproteica e com uma massa molecular acima de 2000 kDa.

Uma vez que o fraccionamento do extracto leva a perda abrupta de actividade, a continuação desta linha de investigação poderá passar por fazer estudos de toxicidade da amostra inicial ou de um extracto apenas parcialmente fraccionado, no sentido de determinar a possibilidade de uma aplicação tópica directa sob a forma de géis vaginais ou lubrificantes.

No capítulo 3 apresentaram-se os estudos efectuados relativamente à bioacumulação de níquel observada em várias espécies de esponjas marinhas pertencentes à família *Clionidae* e também num espécimen pertencente à espécie *Suberites carnosus*. Os resultados mais relevantes obtidos neste capítulo sugerem o seguinte:

- Estas esponjas acumulam níquel em teores médios de 1300 ppm, valores equiparáveis aos de metais biologicamente mais comuns como o zinco e o ferro;
- A reprodutibilidade destes valores em todos os espécimens, independentemente do seu local e data de recolha, aponta para que esta bioacumulação não esteja correlacionada com uma possível contaminação ambiental, nem com um putativo simbionte local e/ou sazonal;

- O níquel poderá estar na forma de Ni<sup>2+</sup> ou associado a uma molécula de baixa massa molecular, catiónica e de natureza não glicídica nem proteica;
- A maior parte do níquel bioacumulado encontrar-se-á em zonas extracelulares;
- Todas as esponjas que apresentaram teores elevados de níquel possuem, embebidos no seu tecido, microrganismos do género *Symbiodinium*, cujas sequências parciais da zona ITS de DNA ribossomal parecem ser bastante distintas das existentes nas bases de dados, apontando para um possível envolvimento destes organismos no mecanismo de bioacumulação de níquel.

A continuação deste trabalho passará pelo esclarecimento da origem biológica da bioacumulação e o estudo do seu mecanismo. Para tal, será essencial a análise de amostras de esponja por TEM, com a finalidade de esclarecer a localização do níquel no tecido do animal e a sua eventual associação a um microrganismo associado. O isolamento e caracterização de uma eventual molécula captadora de níquel ou a obtenção de inóculos de microrganismos bioacumuladores poderão também ser passos a seguir, caso o prosseguimento do trabalho assim o direcione.

## **5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---



## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alcolado, P. M., A. Grovas-Hernández e Z. Marcos (2004). General comments on species inventory, fisheries, culture and some community features of the Porifera in Cuba. *In* Sponge Science in the New Millennium. M. Pansini, R. Pronzato, G. Bavestrello e R. Manconi (Eds.). **68**. Bollettino dei Musei e degli Istituti Biologici dell'Università di Genova, Rapallo. pp. 175-186.
- Almeida, M., S. Filipe, M. Humanes, M. F. Maia, R. Melo, N. Severino, J. L. Silva, J. J. R. F. Silva e R. Wever (2001). "Vanadium haloperoxidases from brown algae of the Laminariceae family." *Phytochemistry* **57**(5): 633-642.
- André, R. "Detecção e quantificação de moléculas de comunicação entre bactérias". Tese de Mestrado em Química Analítica, Departamento de Química e Bioquímica, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa. Lisboa (2008).
- Anzai, Y., H. Kim, J. Y. Park, H. Wakabayashi e H. Oyaizu (2000). "Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50**(4): 1563-1589.
- Araújo, M. F., A. Conceição, T. Barbosa, M. T. Lopes e M. Humanes (2003). "Elemental composition of marine sponges from the Berlengas natural park, western Portuguese coast." *X-Ray Spectrometry* **32**: 428-433.
- Araújo, M. F., A. Cruz, M. Humanes, M. T. Lopes, J. A. L. Silva e J. J. R. F. Silva (1999). "Elemental composition of Demospongiae from the eastern Atlantic coastal waters." *Chemical Speciation and Bioavailability* **11**(1): 25-35.
- Asres, K., A. Seyoum, C. Veeresham, F. Bucar e S. Gibbons (2005). "Naturally Derived Anti-HIV Agents." *Phytotherapy Research* **19**: 557-581.
- Ávila, E., J. L. Carballo e J. A. Cruz-Barraza (2007). Symbiotic relationships between sponges and other organisms from the Sea of Cortes (Mexican Pacific coast): same problems, same solutions. *In* Porifera Research: Biodiversity, Innovation and Sustainability. M. R. Custódio, G. Lôbo-Hajdu, E. Hajdu e G. Muricy (Eds.). **Série Livros 28**. Museu Nacional, Rio de Janeiro. pp. 147-156.
- Barbalace, K. (1995). "Periodic Table of Elements - Nickel - Ni." Consultado a 16/03/2009, <<http://environmentalchemistry.com/yogi/periodic/Ni.html>>.
- Barre-Sinoussi, F., J. Chermann, M. N. F. Rey, S. Chamaret, J. Gruest, C. Dautuet, C. Axler-Blin, F. Vezinet-Brun, C. Rouzioux, W. Rozenbaum e L. Montagnier (1983). "Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)." *Science* **220**(4599): 868-871.
- Becker, S. e H. Terlau (2008). "Toxins from cone snails: properties, applications and biotechnological production." *Applied Microbiology and Biotechnology* **79**: 1-9.
- Benson, A. A. e R. E. Summons (1981). "Arsenic Accumulation in Great Barrier Reef Invertebrates." *Science* **211**: 482-483.
- Bergmann, W. e D. C. Burke (1955). "CONTRIBUTIONS TO THE STUDY OF MARINE PRODUCTS. XXXIX. THE NUCLEOSIDES OF SPONGES. III.1 SPONGOTHYIMIDINE AND SPONGOURIDINE2." *Journal of Organic Chemistry* **20**(11): 1501-1507.
- Bergmann, W. e R. J. Feeney (1951). "CONTRIBUTIONS TO THE STUDY OF MARINE PRODUCTS. XXXII. THE NUCLEOSIDES OF SPONGES. I." *Journal of Organic Chemistry* **16**(6): 981-987.

- Bible, K. C., M. Buytendorp, P. D. Zierath e K. L. Rinehart (1988). "Tuniclorin: A nickel chlorin isolated from the Caribbean tunicate *Trididemnum solidum*." *PNAS* **85**: 4582-4586.
- Björkstén, F. (1968). "A kinetic study of the horse-radish peroxidase-catalized oxidation of iodide." *European Journal of Biochemistry* **5**(1): 133-142.
- Body.Health.Resources.Corporation.(2008). Consultado a 10/07/2008, <<http://www.thebody.com/>>.
- Boury-Esnault, N. e M. T. Lopes (1985). "Les démosponges littorales de l'archipel des Açores." *Annales de L'Institut Océanographique* **61**(2): 157-159.
- Boury-Esnault, N. e A. M. Solé-Cava (2004). Recent contribution of genetics to the study of sponge systematics and biology. In Sponge Science in the New Millennium. M. Pansini, R. Pronzato, G. Bavestrello e R. Manconi (Eds.). **68**. Bollettino dei Musei e degli Istituti Biologici dell'Università di Genova, Rapallo. pp. 3-18.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Analytical Biochemistry* **72**: 248-254.
- Breter, H. J., V. A. Grebenjuk, A. Skorokhod e W. E. G. Müller (2003). "Approaches for a Sustainable Use of the Bioactive Potential in Sponges: Analysis of Gene Clusters, Differential Display of mRNA and DNA Chips." *Progress in Molecular and Subcellular Biology* **37**: 198-230.
- Brümmer, F. e M. Nickel (2003). "Sustainable Use of Marine Resources: Cultivation of Sponges." *Progress in Molecular and Subcellular Biology* **37**: 143-162.
- Carrington, P. E., F. Al-Mjeni, M. A. Zoroddu, M. Costa e M. J. Maroney (2002). "Use of XAS for the Elucidation of Metal Structure and Function: Applications to Nickel Biochemistry, Molecular Toxicology, and Carcinogenesis." *Environmental Health Perspectives* **110**(5): 705-708.
- Chaplin, M. F. e J. F. Kennedy Carbohydrate analysis - A practical approach. Oxford, IRL Press.(1986).
- Chaves, S. I. M. L. "Diversidade de procariotas sulfato-redutores e desnitrificantes em amostras ambientais".Tese de Doutorado em Biologia, Especialidade Microbiologia, Departamento de Biologia Vegetal, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa. Lisboa (2005).
- Chung, C. T., S. L. Niemela e R. H. Miller (1989). "One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution." *PNAS* **86**(7): 2172-2175.
- Clercq, E. D. (2000). "Current lead natural products for the chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV) infection." *Medicinal Research Reviews* **20**(5): 323-349.
- Cock, K. M. D. (2001). "Epidemiology and the emergence of human immunodeficiency virus and acquired immune deficiency syndrome." *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B* **356**: 795-798.
- Coffroth, M. A. e S. R. Santos (2005). "Genetic Diversity of Symbiotic Dinoflagellates in the Genus *Symbiodinium*." *Protist* **156**: 19-34.
- Coombe, D. R., K. B. Jakobsen e C. R. Parish (1987). "A role for sulfated polysaccharide recognition in sponge cell aggregation." *Experimental Cell Research* **170**(2): 381-401.
- CSTEE (2000). The available scientific approaches to assess the potential effects and risk of chemicals on terrestrial ecosystems. Opinion expressed on the 19th

- CSTEE plenary meeting. Brussels, Scientific Committee on Toxicity, Ecotoxicity and the Environment.
- DAIDS Virology Manual for HIV Laboratories. Washington, DC, US Dept of Health and Human Services.(1997).
- Dey, J., M. Aravena-Roman, B. J. Mee, J. Fromont e D. C. Sutton (2004). Bacterial diversity and antibiotic activity in temperate australian marine sponges. *In* Sponge Science in the New Millennium. M. Pansini, R. Pronzato, G. Bavestrello e R. Manconi (Eds.). **68**. Bollettino dei Musei e degli Istituti Biologici dell'Università di Genova, Rapallo. pp. 263-277.
- Dimmock, N. J., A. J. Easton e K. N. Leppard Introduction to Modern Virology, Blackwell Publishing.(2001).
- Duarte, C. (2002). Relatório de Atividades, Grupo de Química Inorgânica Biológica, Departamento de Química e Bioquímica, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.
- Duckworth, A. R., C. Wolff e E. Evans-Illidge (2007). Developing methods for commercially farming bath sponges in tropical Australia. *In* Porifera Research: Biodiversity, Innovation and Sustainability. M. R. Custódio, G. Lôbo-Hajdu, E. Hajdu e G. Muricy (Eds.). **Série Livros 28**. Museu Nacional, Rio de Janeiro. pp. 297-302.
- Dupont, C. L., K. Barbeau e B. Palenik (2008). "Ni Uptake and Limitation in Marine *Synechococcus* Strains." *Applied and Environmental Microbiology* **74**(1): 23-31.
- Ehrlich, H. e H. Worch (2007). Sponges as natural composites: from biomimetic potential to development of new biomaterials. *In* Porifera Research: Biodiversity, Innovation and Sustainability. M. R. Custódio, G. Lôbo-Hajdu, E. Hajdu e G. Muricy (Eds.). **Série Livros 28**. Museu Nacional, Rio de Janeiro. pp. 303-312.
- Eitinger, T., J. Suhr, L. Moore e J. A. C. Smith (2005). "Secondary transporters for nickel and cobalt ions: Theme and variations." *BioMetals* **18**: 399-405.
- Ellman, G. L. (1959). "Tissue sulfhydryl groups " *Archives of Biochemistry and Biophysics* **82**(1): 70-77.
- Expert.Group.on.Vitamins.and.Minerals.(2002). "Revised Review of Nickel." Consultado a 11/11/2008, <<http://www.food.gov.uk/multimedia/pdfs/nickel.pdf>>.
- Eyer, P., F. Worek, D. Kiderlen, G. Sinko, A. Stuglin, V. Simeon-Rudolf e E. Reiner (2003). "Molar absorption coefficients for the reduced Ellman reagent: reassessment." *Analytical Biochemistry* **312**: 224-227.
- Fauci, A. S. (2008). "25 years of HIV." *Nature* **453**(7193): 289-290.
- Faulkner, D. J. (2001). "Marine Natural Products." *Natural Product Reports* **18**: 1-49.
- Feigl, F. Spot tests in inorganic analysis, Elsevier Publishing Company.(1958).
- Ferrara, G. B., B. Murgia, A. M. Parodi, L. Valisano, C. Cerrano, G. Palmisano, G. Bavestrello e M. Sarà (2006). "The assesment of DNA from marine organisms via modified salting out protocol." *Cellular & Molecular Biology Letters* **11**: 155-160.
- Fieseler, L., M. Horn, M. Wagner e U. Hentschel (2004). "Discovery of the Novel Candidate Phylum "Poribacteria" in Marine Sponges." *Applied and Environmental Microbiology* **70**(6): 3724-3732.
- Frade, P. R., F. d. Jongh, F. Vermeulen, J. v. Bleijswijk e R. P. M. Bak (2008). "Variation in symbiont distribution between closely related coral species over large depth ranges." *Molecular Ecology* **17**: 691-703.



- Freudenthal, H. D. (1962). "*Symbiodinium* gen. nov. and *Symbiodinium microadriaticum* sp. nov., a Zooxanthella: Taxonomy, Life Cycle, and Morphology." *Journal of Protozoology* **9**(1): 45-52.
- Friedrich, A. B., H. Merkert, T. Fendert, J. Hacker, P. Proksch e U. Hentschel (1999). "Microbial diversity in the marine sponge *Aplysina cavernicola* (formerly *Verongia cavernicola*) analyzed by fluorescence in situ hybridization (FISH)." *Marine Biology* **134**(3): 461-470.
- Gallo, R., P. Sarin, E. Gelmann, M. Robert-Guroff, E. Richardson, V. Kalyanaraman, D. Mann, G. Sidhu, R. Stahl, S. Zolla-Pazner, J. Leibowitch e M. Popovic (1983). "Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS)." *Science* **220**(4599): 865-867.
- Gallo, R. C. (2006). "A reflection on HIV/AIDS research after 25 years." *Retrovirology* **3**: 72.
- Gallo, R. C. e L. Montagnier (2003). "The Discovery of HIV as the Cause of AIDS." *The New England Journal of Medicine* **349**(24): 2283-2285.
- Garson, M. J., A. E. Flowers, R. I. Webb, R. D. Charan e E. J. McCaffrey (1998). "A sponge/dinoflagellate association in the haplosclerid sponge *Haliclona* sp.: cellular origin of cytotoxic alkaloids by Percoll density gradient fractionation." *Cell Tissue Research* **293**: 365-373.
- Gochfeld, D. J., K. A. E. Sayed, M. Yousaf, J. F. Hu, P. Bartyzel, D. C. Dunbar, S. P. Wilkins, J. K. Zjawiony, R. F. Schinazi, S. S. Wirtz, P. M. Tharnish e M. T. Hamann (2003). "Marine Natural Products as Lead Anti-HIV Agents." *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* **3**: 401-424.
- Goud, T. V., N. S. Reddy, N. R. Swamy, T. S. Ram e Y. Venkateswarlu (2003). "Anti-HIV Active Petrosins from the Marine Sponge *Petrosia similis*." *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **26**(10): 1498-1501.
- Gould, S. J. (1994). "The Evolution of Life on Earth." *Scientific American*(October 1994): 59-67.
- Granados, C., C. Camargo, S. Zea e J. A. Sánchez (2008). "Phylogenetic relationships among zooxanthellae (*Symbiodinium*) associated to excavating sponges (*Cliona* spp.) reveal an unexpected lineage in the Caribbean." *Molecular Phylogenetics and Evolution* **49**(2): 554-560.
- Green, D., D. Howard, X. Yang, M. Kelly e R. O. C. Oreffo (2003). "Natural Marine Sponge Fiber Skeleton: A Biomimetic Scaffold for Human Osteoprogenitor Cell Attachment, Growth, and Differentiation." *Tissue Engineering* **9**(6): 1159-1166.
- Gupta, A., M. Kumar e R. Goel (2004). "Bioaccumulation properties of nickel-, cadmium-, and chromium-resistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa* NBRI 4014 at alkaline pH." *Biological Trace Element Research* **99**(1-3): 269-77.
- Hall, T. M. (1982). "Free ionic nickel accumulation and localization in the freshwater zooplankter, *Daphnia magna*." *Limnology Oceanography* **27**(4): 718-727.
- Harland, A. D. e N. R. Nganro (1990). "Copper uptake by the sea anemone *Anemonia viridis* and the role of zooxanthellae in metal regulation." *Marine Biology* **104**: 297-301.
- Hentschel, U., L. Fieseler, M. Wehrl, C. Gernert, M. Steinert, J. Hacker e M. Horn (2003). "Microbial Diversity of Marine Sponges." *Progress in Molecular and Subcellular Biology* **37**: 59-88.
- Hentschel, U., M. Schmid, M. Wagner, L. Fieseler, C. Gernert e J. Hacker (2001). "Isolation and phylogenetic analysis of bacteria with antimicrobial activities

- from the Mediterranean sponges *Aplysina aerophoba* and *Aplysina cavernicola*." *FEMS Microbiology Ecology* **35**(3): 305-312.
- Hentschel, U., K. M. Usher e M. W. Taylor (2006). "Marine sponges as microbial fermenters." *FEMS Microbiology Ecology* **55**(2): 167-177.
- Hirose, M., J. D. Reimer, M. Hidaka e S. Suda (2008). "Phylogenetic analyses of potentially free-living *Symbiodinium* spp. isolated from coral reef sand in Okinawa, Japan." *Marine Biology* **155**(1): 102-112.
- Hofer Protein electrophoresis – applications guide. San Francisco, Hofer Scientific Instruments.(1994).
- Hoek, C. V. d., D. G. Mann e H. M. Jahns Algae - An introduction to phycology. Cambridge, Cambridge University Press.(1995).
- Hooper, J. N. A. Sponge Guide. Queensland, Queensland Museum.(1995).
- Hooper, J. N. A. e R. W. M. V. Soest Systema Porifera: A Guide to the Classification of Sponges. New York, Kluwer Academic/Plenum Publishers.(2002).
- Huelsenbeck, J. P. e F. Ronquist (2001). "MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees " *Bioinformatics* **17**(8): 754-755.
- Imhoff, J. F. e R. Stöhr (2003). "Sponge-Associated Bacteria: General Overview and Special Aspects of Bacteria Associated with *Halichondria panicea*." *Progress in Molecular and Subcellular Biology* **37**: 35-57.
- Instituto.Geográfico.Português.(2009). "Atlas de Portugal - O País Socioeconómico." Consultado a 14/11/2009, <[http://www.igeo.pt/atlas/Cap3/Cap3c\\_2.html](http://www.igeo.pt/atlas/Cap3/Cap3c_2.html)>.
- Jha, R. K. e X. Zi-rong (2004). "Biomedical Compounds from Marine organisms." *Marine Drugs* **2**(3): 123-146.
- Jung, M., S. Lee, H. Kim e H. Kim (2000). "Recent Studies on Natural Products as Anti-HIV Agents." *Current Medicinal Chemistry* **7**(2): 649-661.
- Kim, H. e R. J. Maier (1990). "Transcriptional Regulation of Hydrogenase Synthesis by Nickel in *Bradyrhizobium japonicum*." *Journal of Biological Chemistry* **265**(31): 18729-18732.
- Kim, M.-M., E. Mendis, N. Rajapakse, S.-H. Lee e S.-K. Kim (2009). "Effect of spongin derived from *Hymeniacidon sinapium* on bone mineralization." *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* **90B**(2): 540-546.
- King, N. (2004). "The Unicellular Ancestry of Animal Development." *Developmental Cell* **7**(3): 313-325.
- Konhauser, K. O., E. Pecoits, S. V. Lalonde, D. Papineau, E. G. Nisbet, M. E. Barley, N. T. Arndt, K. Zahnle e B. S. Kamber (2009). "Oceanic nickel depletion and a methanogen famine before the Great Oxidation Event." *Nature* **458**(7239): 750-753.
- Kulchin, Y. N., A. V. Bezverbny, O. A. Bukin, S. S. Voznesensky, A. N. Galkina, A. L. Drozdov e I. G. Nagorny (2009). "Optical and nonlinear optical properties of sea glass sponge spicules." *Progress in Molecular and Subcellular Biology* **47**: 315-340.
- Kutschera, U. e K. J. Niklas (2004). "The modern theory of biological evolution: an expanded synthesis." *Naturwissenschaften* **91**(6): 255-276.
- Leys, S. P., D. S. Rohksar e B. M. Degnan (2005). "Sponges." *Current Biology* **15**(4): R114-R115.
- Li, C.-W., J.-Y. Chen e T.-E. Hua (1998). "Precambrian Sponges with Cellular Structures." *Science* **279**(5352): 879-882.

- López-García, P., F. Rodríguez-Valera, C. Pedrós-Alió e D. Moreira (2001). "Unexpected diversity of small eukaryotes in deep-sea Antarctic plankton." *Nature* **409**: 603-607.
- López-Victoria, M., S. Zea e E. Weil (2004). New aspects on the biology of encrusting excavating sponges *Cliona aprica*, *Cliona caribbaea* and *Cliona sp.* In Sponge Science in the New Millennium. M. Pansini, R. Pronzato, G. Bavestrello e R. Manconi (Eds.). **68**. Bollettino dei Musei e degli Istituti Biologici dell'Università di Genova, Rapallo. pp. 425-431.
- Luoma, S. N. e P. S. Rainbow (2005). "Why Is Metal Bioaccumulation So Variable? Biodynamics as a Unifying Concept." *Environmental Science & Technology* **39**(7): 1921-1931.
- Lusso, P. (2006). "HIV and the chemokine system: 10 years later." *The EMBO Journal* **25**(3): 447-456.
- Maier, R. J., T. D. Pihl, L. Stults e W. Sray (1990). "Nickel Accumulation and Storage in *Bradyrhizobium japonicum*." *Applied and Environmental Microbiology* **56**(6): 1905-1911.
- McCutchan, F. E. (2006). "Global Epidemiology of HIV." *Journal of Medical Virology* **78**: S7-S12.
- Mergeay, M., S. Monchy, T. Vallaey, V. Auquier, A. Benotmane, P. Bertin, S. Taghavi, J. Dunn, D. v. d. Lelie e R. Wattiez (2003). "*Ralstonia metallidurans*, a bacterium specifically adapted to toxic metals: towards a catalogue of metal-responsive genes." *FEMS Microbiology Reviews* **27**: 385-410.
- Misevic, G. N., C. Ripoll, J. Norris, V. Norris, Y. Guerardel, E. Maes, G. Strecker, P. Ballet, Y. Karamanos, L. T. Sumanovski, O. Popescu e N. Misevic (2007). Evolution of multicellularity in Porifera via self-assembly of glycoconnectin carbohydrates. In Porifera Research: Biodiversity, Innovation and Sustainability. M. R. Custódio, G. Lôbo-Hajdu, E. Hajdu e G. Muricy (Eds.). **Série Livros 28**. Museu Nacional, Rio de Janeiro. pp. 79-88.
- Mitchellmore, C. L., E. A. Verde, A. H. Ringwood e V. M. Weis (2003). "Differential accumulation of heavy metals in the sea anemone *Anthopleura elegantissima* as a function of symbiotic state." *Aquatic Toxicology* **64**: 317-329.
- Morel, F. M. M. (2008). "The co-evolution of phytoplankton and trace element cycles in the oceans." *Geobiology* **6**: 318-324.
- Müller, W. E. G., M. Wiens, R. Batel, R. Steffen, H. C. Schröder, R. Borojevic e M. R. Custódio (1999). "Establishment of a primary cell culture from a sponge: primmorphs from *Suberites domuncula*." *Marine Ecology Progress Series* **178**: 205-219.
- Müller, W. E. G., M. Wiens, I. M. Müller e F. Brümmer (2004). From cells to primmorphs and adult sponges: an approach to understand the bauplan of demospongiae. In Sponge Science in the New Millennium. M. Pansini, R. Pronzato, G. Bavestrello e R. Manconi (Eds.). **68**. Bollettino dei Musei e degli Istituti Biologici dell'Università di Genova, Rapallo. pp. 39-54.
- Mulrooney, S. B. e R. P. Hausinger (2003). "Nickel uptake and utilization by microorganisms." *FEMS Microbiology Reviews* **27**: 239-261.
- Muyssen, B. T. A., K. V. Brix, D. K. DeForest e C. R. Janssen (2004). "Nickel essentiality and homeostasis in aquatic organisms." *Environmental Reviews* **12**: 113-131.
- Muyzer, G. (1999). "DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems." *Current Opinion in Microbiology* **2**: 317-322.

- Muyzer, G., S. Hottentrager, A. Teske e C. Wawer (1996). Denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rDNA – A new molecular approach to analyse the genetic diversity of mixed microbial communities. In Molecular Microbial Ecology Methods. A. D. L. Akkermans, J. D. van-Elsas e F. J. de-Brujn (Eds.). **3.4.4**. Kluwer Academic Publishing, Boston. pp. 1-23.
- Myers, R. M., S. G. Fischer, T. Maniatis e L. S. Lerman (1985). "Modification of the melting properties of duplex DNA by attachment of a GC-rich DNA sequence as determined by denaturing gradient gel electrophoresis." *Nucleic Acids Research* **13**(9): 3111-3129.
- Nicolai, M. (2001). Estudos de Polissacáridos Sulfatados extraídos de Esgonjas Marinhas - Relatório de Estágio. DQB, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.
- Nicolai, M. H., A. Esteves, M. Almeida e M. Humanes (2007). Haloperoxidase from the marine sponge *Erylus discophorus* (Schmidt, 1862). In Porifera Research: Biodiversity, Innovation and Sustainability. M. R. Custódio, G. Lôbo-Hajdu, E. Hajdu e G. Muricy (Eds.). **Série Livros 28**. Museu Nacional, Rio de Janeiro. pp. 491-496.
- Nielsen, F. H. (1991). "Nutritional requirements for boron, silicon, vanadium, nickel and arsenic: current knowledge and speculation." *The FASEB Journal* **5**: 2661-2667.
- Nishiyama, G. K., G. J. Bakus e C. A. Kay (2004). The effects of sponges and sponge metabolites on the settlement, growth and associations of substratum competitors. In Sponge Science in the New Millennium. M. Pansini, R. Pronzato, G. Bavestrello e R. Manconi (Eds.). **68**. Bollettino dei Musei e degli Istituti Biologici dell'Università di Genova, Rapallo. pp. 499-508.
- Nobelprize.org.(2008). "The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2008 " Consultado a 05/05/2008, <[http://nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/2008/press.html](http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2008/press.html)>.
- O'Keefe, B. R., J. A. Beutler, J. H. Cardellina, R. J. Gulakowski, B. L. Krepps, J. B. McMahon, R. C. Sowder, L. E. Henderson, L. K. Pannell, S. A. Pomponi e M. R. Boyd (1997). "Isolation and characterization of niphaterivin, a human-immunodeficiency-virus-inhibitory glycoprotein from the marine sponge *Niphates erecta*." *European Journal of Biochemistry* **245**: 47-53.
- O'Keefe, B. R., T. Erim, J. A. Beutler, J. H. Cardellina, R. J. Gulakowski, B. L. Krepps, J. B. McMahon, R. C. Sowder, D. G. Johnson, R. W. B. Jr., S. Halliday e M. R. Boyd (1998). "Isolation and characterization of adociavirin, a novel HIV-inhibitory protein from the sponge *Adocia sp.*" *FEBS Letters* **431**: 85-90.
- Osinga, R. e M. Kotterman (2007). Ferric iron promotes the formation of oscules: observations on sponges in aquaria. In Porifera Research: Biodiversity, Innovation and Sustainability. M. R. Custódio, G. Lôbo-Hajdu, E. Hajdu e G. Muricy (Eds.). **Série Livros 28**. Museu Nacional, Rio de Janeiro. pp. 497-502.
- Ostrander, G. K., K. M. Armstrong, E. T. Knobbe, D. Gerace e E. P. Scully (2000). "Rapid transition in the structure of a coral reef community: The effects of coral bleaching and physical disturbance." *PNAS* **97**(10): 5297-5302.
- Patel, J. S., P. C. Patel e K. Kalia (2006). "Isolation and characterization of nickel uptake by nickel resistant bacterial isolate (NiRBI)." *Biomedical and Environmental Sciences* **19**(4): 297-301.

- Pawlik, J. R. (2002). "What can sponge chemistry tell us about sponge ecology?" *Bollettino dei Musei e degli Istituti Biologici dell'Università di Genova* **66-67**(2000-2001): 151.
- Pawlowski, J., M. Holzmann, J. F. Fahrni, X. Pochon e J. J. Lee (2001). "Molecular Identification of Algal Endosymbionts in Large Miliolid Foraminifera: 2. Dinoflagellates." *Journal of Eukaryotic Microbiology* **48**(3): 368-373.
- Pereira, J. M. e L. Tavares (2002). Retrovírus. In *Microbiologia 3*. Lidel (Eds.), Lisboa Porto Coimbra. pp. 275-314.
- Perez, T. "Qualité de l'environnement marin littoral : étude des spongiaires pour la bioévaluation des peuplements de substrats durs". Tese de Doutoramento, Centre d'Océanologie de Marseille, Université de la Méditerranée. (2001).
- Perez, T., J. Vacelet e P. Rebouillon (2004). *In situ* comparative study of several mediterranean sponges as potential biomonitors of heavy metals. In *Sponge Science in the New Millennium*. M. Pansini, R. Pronzato, G. Bavestrello e R. Manconi (Eds.). **68**. Bollettino dei Musei e degli Istituti Biologici dell'Università di Genova, Rapallo. pp. 517-525.
- Picton, B. E., C. C. Morrow e R. W. B. v. Soest.(2007). "*Suberites carnosus*." *Sponges of Britain and Ireland* Consultado a 26/09/2008, <[http://www.habitas.org.uk/marinelife/sponge\\_guide/sponges.asp?item=C2200](http://www.habitas.org.uk/marinelife/sponge_guide/sponges.asp?item=C2200)>
- Pina, M. R. (2000). Estudos de Inibição do HIV-1 em Esponjas Marinhas - Relatório de Estágio. DQB, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.
- Purves, W. K., G. H. Orians, H. C. Heller e D. Sadava *LIFE: The Science of Biology*. Sunderland, U.S.A., Sinauer Associates Inc.(1998).
- Ragsdale, S. W. (1998). "Nickel biochemistry." *Current Opinion in Chemical Biology* **2**: 208-215.
- Reichelt-Brushett, A. J. e G. McOrist (2003). "Trace metals in the living and nonliving components of scleractinian corals." *Marine Pollution Bulletin* **46**: 1573-1582.
- Reiswig, H. M. (1971). "PARTICLE FEEDING IN NATURAL POPULATIONS OF THREE MARINE DEMOSPONGES." *The Biological Bulletin* **141**(3): 568-591.
- Rinkevich, B. (2005). "Marine Invertebrate Cell Cultures: New Millennium Trends." *Marine Biotechnology* **7**: 429-439.
- Rosell, D. (1993). "Effects of reproduction in *Cliona viridis* (Hadromerida) on zooxanthellae." *Scientia Marina* **57**(4): 405-413.
- Rosell, D., M.-J. Uriz e D. Martin (1999). "Infestation by excavating sponges on the oyster (*Ostrea edulis*) populations of the Blanes littoral zone (north-western Mediterranean Sea)." *Journal of the Marine Biological Association of the UK* **79**(3): 409-413.
- Rosenzweig, A. C. (2002). "Metallochaperones: Bind and Deliver." *Chemistry & Biology* **9**: 673-677.
- Roussis, V., L.-A. Tziveleka e C. Vagias (2003). "Natural Products with Anti-HIV Activity from Marine Organisms." *Current Topics in Medicinal Chemistry* **3**(13): 1512-1535.
- Rowan, R. e D. A. Powers (1992). "Ribosomal RNA sequences and the diversity of symbiotic dinoflagellates (zooxanthellae)." *PNAS* **89**: 3639-3643.
- Rudman, W. B.(2000). "What are Zooxanthellae?." *Sea Slug Forum* Consultado a 15/10/2008, <<http://www.seaslugforum.net/factsheet.cfm?base=zoox1>>.
- Russell, M. (2006). "First Life." *American Scientist* **94**: 32-39.
- Rützler, K. (2004). Sponges on Coral Reefs: a community shaped by competitive cooperation. In *Sponge Science in the New Millennium*. M. Pansini, R.

- Pronzato, G. Bavestrello e R. Manconi (Eds.). **68**. Bollettino dei Musei e degli Istituti Biologici dell'Università di Genova, Rapallo (Italy). pp. 85-129.
- Ryan, M. P., J. T. Pembroke e C. C. Adley (2007). "*Ralstonia pickettii* in environmental biotechnology: potential and applications." *Journal of Applied Microbiology* **103**(4): 754-764.
- Santos, S. R., D. J. Taylor, R. A. Kinzie, M. Hidaka, K. Sakai e M. A. Coffroth (2002). "Molecular phylogeny of symbiotic dinoflagellates inferred from partial chloroplast large subunit (23S)-rDNA sequences." *Molecular Phylogenetics and Evolution* **23**(2): 97-111.
- Sar, P., S. K. Kazy e S. P. Singh (2001). "Intracellular nickel accumulation by *Pseudomonas aeruginosa* and its chemical nature." *Letters in Applied Microbiology* **32**: 257-261.
- Sarà, M. e L. Liaci (1964). "Symbiotic Association between Zooxanthellae and Two Marine Sponges of the genus *Cliona*." *Nature* **203**(4942): 321.
- Scherer, L., J. J. Rossi, M. S. Weinberg e D. J. Rossi (2007). "Progress and prospects: RNA-based therapies for treatment of HIV infection " *Gene Therapy* **14**: 1057 - 1064
- Schmitt, S., M. Wehrl, N. Lindquist, J. B. Weisz e U. Hentschel (2007). Morphological and molecular analyses of microorganisms in Caribbean reef adult sponges and in corresponding reproductive material. In Porifera Research: Biodiversity, Innovation and Sustainability. M. R. Custódio, G. Lôbo-Hajdu, E. Hajdu e G. Muricy (Eds.). **Série Livros 28**. Museu Nacional, Rio de Janeiro. pp. 561-568.
- Schols, D., R. Pauwels, J. Desmyter e E. D. Clercq (1990). "Dextran Sulfate and Other Polyanionic Anti-HIV Compounds Specifically Interact with the Viral gp120 Glycoprotein Expressed by T-Cells Persistently Infected with HIV-1." *Virology* **175**: 556-561.
- Schönberg, C. H. L. (2002). "Sponges of the '*Cliona viridis* complex' - a key for species identification." *Proceedings of the 9<sup>th</sup> International Coral Reef Symposium*: 295-300.
- Schönberg, C. H. L. e W. K. W. Loh (2005). "Molecular identity of the unique symbiotic dinoflagellates found in the bioeroding demosponge *Cliona orientalis*." *Marine Ecology Progress Series* **299**: 157-166.
- Schönberg, C. H. L. e R. Suwa (2007). Why bioeroding sponges may be better hosts for symbiotic dinoflagellates than many corals. In Porifera Research: Biodiversity, Innovation and Sustainability. M. R. Custódio, G. Lôbo-Hajdu, E. Hajdu e G. Muricy (Eds.). **Série Livros 28**. Museu Nacional, Rio de Janeiro. pp. 569-580.
- Schröder, H. C., F. Brümmer, E. Fattorusso, A. Aielle, M. Menna, S. d. Rosa, R. Batel e W. E. G. Müller (2003). "Sustainable Production of Bioactive Compounds from Sponges: Primmorphs as Bioreactors." *Progress in Molecular and Subcellular Biology* **37**: 163-197.
- Schröder, H. C., A. Krasko, D. Brandt, M. Wiens, M. N. Tahir, W. Tremel e W. E. G. Müller (2007). Silicateins, silicase and spicule-associated proteins: synthesis of demosponge silica skeleton and nanobiotechnological applications. In Porifera Research: Biodiversity, Innovation and Sustainability. M. R. Custódio, G. Lôbo-Hajdu, E. Hajdu e G. Muricy (Eds.). **Série Livros 28**. Museu Nacional, Rio de Janeiro. pp. 581-592.
- Sharp, K. H., B. Eam, D. J. Faulkner e M. G. Haygood (2007). "Vertical Transmission of Diverse Microbes in the Tropical Sponge *Corticium* sp." *Applied and Environmental Microbiology* **73**(2): 622-629.

- Sigel, A., H. Sigel e R. K. O. Sigel, Eds. Nickel and Its Surprising Impact in Nature. Metal Ions in Life Sciences. West Sussex, England, John Wiley & Sons, Ltd.(2007)
- Simes, D. "Isolamento e caracterização da metalotionina da ameijoia *Ruditapes decussatus*". Tese de Mestrado, Faculdade de Ciências do Mar e do Ambiente, Universidade do Algarve. Faro (1997).
- Simes, D. C., M. J. Bebianno e J. J. Moura (2003). "Isolation and characterisation of metallothionein from the clam *Ruditapes decussatus*." *Aquatic Toxicology* **63**(3): 307-318.
- Simon, V., D. D. Ho e Q. A. Karim (2006). "HIV/AIDS epidemiology, pathogenesis, prevention, and treatment." *The Lancet* **368**: 489-504.
- Sipkema, D., R. Osinga, W. Schatton, D. Mendola, J. Tramper e R. H. Wijffels (2005). "Large-Scale Production of Pharmaceuticals by Marine Sponges: Sea, Cell or Synthesis?" *Biotechnology and Bioengineering* **90**(2): 201-222.
- Staa, S. Y. M.-v. d., R. D. Wachter e D. Vaultot (2001). "Oceanic 18S rDNA sequences from picoplankton reveal unsuspected eukaryotic diversity." *Nature* **409**: 607-610.
- Taghavi, S., M. Mergeay, D. Nies e D. v. d. Lelie (1997). "*Alcaligenes eutrophus* as a model system for bacterial interactions with heavy metals in the environment." *Research in Microbiology* **148**(6): 536-551.
- Takabayashi, M., S. R. Santos e C. B. Cook (2004). "Mitochondrial DNA Phylogeny of the Symbiotic Dinoflagellates (*Symbiodinium*, Dinophyta)." *Journal of Phycology* **40**: 160-164.
- Tanaka, N. e R. Wever (2004). "Inhibition of vanadium chloroperoxidase from the fungus *Curvularia inaequalis* by hydroxylamine, hydrazine and azide and inactivation by phosphate " *Journal of Inorganic Biochemistry* **98**(4): 625-631.
- Taylor, M. W., R. Radax, D. Steger e M. Wagner (2007). "Sponge-Associated Microorganisms: Evolution, Ecology, and Biotechnological Potential." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **71**(2): 295-347.
- Tetra Tech, I. (1999). Conceptual Model Report for Copper and Nickel in Lower South San Francisco Bay. Publicações do Município de San Jose Califórnia, Estados Unidos da América.
- Thoms, C. e P. J. Schupp (2007). Chemical defense strategies in sponges: a review. In Porifera Research: Biodiversity, Innovation and Sustainability. M. R. Custódio, G. Lôbo-Hajdu, E. Hajdu e G. Muricy (Eds.). **Série Livros 28**. Museu Nacional, Rio de Janeiro. pp. 627-637.
- Thornhill, D. J., T. C. Lajeunesse e S. R. Santos (2007). "Measuring rDNA diversity in eukaryotic microbial systems: how intragenomic variation, pseudogenes, and PCR artifacts confound biodiversity estimates." *Molecular Ecology* **16**(24): 5326-5340.
- Todar, K.(2008). "*Pseudomonas aeruginosa*." Todar's Online Textbook of Bacteriology Consultado a 13/10/2009, <<http://www.textbookofbacteriology.net/pseudomonas.html>>.
- Tözsér, J. (2003). "Stages of HIV Replication and Targets for Therapeutic Intervention." *Current Topics in Medicinal Chemistry* **3**: 1447-1457.
- Trench, R. K. (1997). "Diversity of symbiotic dinoflagellates and the evolution of microalgal-invertebrate symbioses." *Proceedings of the 8th International Coral Reef Symposium* **2**: 1275-1286.

- Tripathi, V. N. e S. Srivastava (2006). "Ni<sup>2+</sup>-uptake in *Pseudomonas putida* strain S4: a possible role of Mg<sup>2+</sup>-uptake pump." *Journal of Biosciences* **31**(1): 61-67.
- Tytler, E. M. e P. S. Davies (1983). "A method for isolating clean and viable zooxanthellae by density gradient centrifugation." *Limnology Oceanography* **28**(6): 1266-1268.
- UNAIDS.(2007). "2007 AIDS Epidemic Update." Consultado a 01/07/2008, <[http://data.unaids.org/pub/EPISlides/2007/2007\\_epiupdate\\_en.pdf](http://data.unaids.org/pub/EPISlides/2007/2007_epiupdate_en.pdf)>.
- Vacelet, J. (1981). "Algal-sponge symbiosis in the coral reefs of New Caledonia: a morphological study." *Proceedings of the 4th International Coral Reef Symposium* **2**: 713-719.
- Vacelet, J., G. Bitar, T. Dailianis, H. Zibrowius e T. Perez (2008). "A large encrusting clonoid sponge in the Eastern Mediterranean Sea." *Marine Ecology* **29**(2): 237-246.
- Vacelet, J. e C. Donadey (1977). "Electron microscope study of the association between some sponges and bacteria." *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **30**(3): 301-314.
- Vacelet, J. e M.-F. Gallissian (1978). "Virus-like particles in cells of the sponge *Verongia cavernicola* (demospongiae, dictyoceratida) and accompanying tissues changes." *Journal of Invertebrate Pathology* **31**(2): 246-254.
- Valisano, L., A. Arillo, G. Bavestrello, M. Giovine e C. Cerrano (2007). Influence of temperature on primmorph production in *Petrosia ficiformis* (Porifera: Demospongiae). In Porifera Research: Biodiversity, Innovation and Sustainability. M. R. Custódio, G. Lôbo-Hajdu, E. Hajdu e G. Muricy (Eds.). **Série Livros 28**. Museu Nacional, Rio de Janeiro. pp. 639-643.
- Vilter, H. e K.-W. Glombitza (1983). "Peroxidases from Phaeophyceae. I. Extraction and detection of the peroxidases." *Botanica Marina* **26**: 331-340.
- Vogel, G. (2008). "The Inner Lives of Sponges." *Science* **320**(5879): 1028-1030.
- Voogd, N. J. d., L. E. Becking, B. W. Hoeksema, A. Noor e R. W. M. v. Soest (2004). Sponge interactions with spatial competitors in the Spermonde Archipelago. In Sponge Science in the New Millennium. M. Pansini, R. Pronzato, G. Bavestrello e R. Manconi (Eds.). **68**. Bollettino dei Musei e degli Istituti Biologici dell'Università di Genova, Rapallo. pp. 253-261.
- Wang, G. (2006). "Diversity and biotechnological potential of the sponge-associated microbial consortia." *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **33**: 545-551.
- Wang, W.-X. e P. S. Rainbow (2005). "Influence of metal exposure history on trace metal uptake and accumulation by marine invertebrates." *Ecotoxicology and Environmental Safety* **61**: 145-159.
- Wang, W.-X. e P. S. Rainbow (2008). "Comparative approaches to understand metal bioaccumulation in aquatic animals." *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* **148**(4): 315-323.
- Watt, R. K. e P. W. Ludden (1999). "Nickel-binding proteins." *Cellular and Molecular Life Sciences* **56**: 604-625.
- WebElements.com.(2008). "Nickel." Consultado a 15/09/2008, <<http://www.webelements.com/nickel>>.
- Webster, N. S., R. E. Cobb e A. P. Negri (2008). "Temperature thresholds for bacterial symbiosis with a sponge." *The ISME Journal* **2**: 830-842.
- Weinberg, I., O. Glyzina, E. Weinberg, L. Kravtsova, N. Rozhkova, N. Sheveleva, A. Natyaganova, D. Bonse e D. Janussen (2004). Types of interactions in consortia



- of baikalian sponges. In *Sponge Science in the New Millenium*. M. Pansini, R. Pronzato, G. Bavestrello e R. Manconi (Eds.). **68**. Bollettino dei Musei e degli Istituti Biologici dell'Università di Genova, Rapallo. pp. 655-663.
- Wilcox, T. P. (1998). "Large-Subunit Ribosomal RNA Systematics of Symbiotic Dinoflagellates: Morphology Does Not Recapitulate Phylogeny." *Molecular Phylogenetics and Evolution* **10**(3): 436-448.
- Wilkinson, C. R. (1978a). "Microbial Associations in Sponges. I. Ecology, Physiology and Microbial Populations of Coral Reef Sponges." *Marine Biology* **49**: 161-167.
- Wilkinson, C. R. (1978b). "Microbial Associations in Sponges. II. Numerical Analysis of Sponge and Water Bacterial Populations." *Marine Biology* **49**: 169-176.
- Wilkinson, C. R. (1978c). "Microbial Associations in Sponges. III. Ultrastructure of the *in situ* Associations in Coral Reef Sponges." *Marine Biology* **49**: 177-185.
- Wilkinson, C. R., R. Garrone e J. Vacelet (1984). "Marine sponges discriminate between food bacteria and bacterial symbionts: electron microscope radioautography and *in situ* evidence." *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* **220**(1221): 519-58.
- Wörheide, G., D. Erpenbeck e C. Menke (2007). The Sponge Barcoding Project: aiding in the identification and description of poriferan taxa. In *Porifera Research: Biodiversity, Innovation and Sustainability*. M. R. Custódio, G. Lôbo-Hajdu, E. Hajdu e G. Muricy (Eds.). **Série Livros 28**. Museu Nacional, Rio de Janeiro. pp. 123-128.
- World.Health.Organization.(2000). "Nickel." Consultado a 09/10/2008, <[http://www.euro.who.int/document/aicq/6\\_10nickel.pdf](http://www.euro.who.int/document/aicq/6_10nickel.pdf)>.
- Zahl, P. A. e J. J. A. McLaughlin (1957). "Isolation and cultivation of zooxanthellae." *Nature* **203**: 199-200.
- Zhang, Z., S. Schwartz, L. Wagner e W. Miller (2000). "A greedy algorithm for aligning DNA sequences." *Journal of Computational Biology* **7**(1-2): 203-214.
- Zhu, T., B. T. Korber, A. J. Nahmias, E. Hooper, P. M. Sharp e D. D. Ho (1998). "An African HIV-1 sequence from 1959 and implications for the origin of the epidemic." *Nature* **391**(6667): 594-597.
- Zierer, M. S., R. P. Vieira, B. Mulloy e P. A. S. Mourão (1995). "A novel acidic glycogen extracted from the marine sponge *Aplysina fulva* (porifera-demospongiae)." *Carbohydrate Research* **274**: 233-244.
- Zundevich, A., B. Lazar e M. Ilan (2007). "Chemical *versus* mechanical bioerosion of coral reefs by boring sponges - lessons from *Pione cf. vastifica*." *The Journal of Experimental Biology* **210**: 91-96.

## **6. ANEXOS**

---



# ANEXO I

## ESPECIFICAÇÕES DE REAGENTES E CALIBRAÇÕES

### I-A) Especificações e Características das Colunas de Cromatografia

Matriz	Tipo de cromatografia	Gama de separação	Tamanho da coluna – altura x diâmetro (cm x cm)	Volume de matriz (mL)
Superose 6 prep grade	Filtração em gel	5 a 5000 kDa	40x1,6	75
Sephacryl S-300 HR	Filtração em gel	10 a 1500 kDa para proteínas globulares; 2 a 400 kDa para dextranos	70x1,6	140
Superdex 75 Prep grade	Filtração em gel	3 a 70 kDa para proteínas globulares; 500 a 30000 Da para dextranos	40x1,6	60
Phenyl Sepharose	Interação hidrofóbica	-	20x2,6	58
DEAE Sepharose	Troca iónica (trocador aniónico fraco)	-	20x2,6	65
MonoQ HR 5/5 (pré-empacotada)	Troca iónica (trocador aniónico forte)	-	5x0,5	1
Concanavalina A	Cromatografia de Afinidade para grupos glicídicos	-	10x1,6	20

Tabela 6.1 – Características das colunas utilizadas nos vários fraccionamentos cromatográficos realizados no decurso deste trabalho

‘Kit’ de mini-colunas pré-empacotadas de cromatografia de troca iónica – ‘HiTrap™ IEX Selection Kit’ da Amersham Biosciences (Volume de matriz = 1 mL):

<b>Matriz</b>	<b>Tipo de cromatografia</b>
CM Sepharose FF	Trocador Catiónico Fraco
DEAE Sepharose FF	Trocador Aniónico Fraco
SP Sepharose FF	Trocador Catiónico Forte
Q Sepharose FF	Trocador Aniónico Forte

Tabela 6.2 – Mini-colunas de cromatografia iónica – ‘HiTrap™ IEX Selection Kit’ (Amersham Biosciences); FF – ‘Fast Flow’

**I-B) Calibração da Coluna S-300**

Marcador	MM (Da)	V eluição (mL)
Azul Dextrano <sup>(a)</sup>	2000000	52,72
Tiroglobulina <sup>(a)</sup>	669000	59,09
Apoferritina <sup>(a)</sup>	443000	65,84
$\beta$ -amilase <sup>(a)</sup>	200000	71,98
Álcool Desidrogenase <sup>(a)</sup>	150000	76,98
Albumina <sup>(a)</sup>	66000	91,38
Anidrase Carbónica <sup>(a)</sup>	29000	94,83
Citocromo C <sup>(b)</sup>	12400	112,88
Aprotinina <sup>(b)</sup>	6500	122,13

Tabela 6.3 – Marcadores de massa molecular utilizados na calibração da coluna de filtração em gel S-300; MM – massa molecular; (a) – proveniente do ‘kit’ de marcadores de massa molecular para cromatografia de filtração em gel MWGF1000 ‘Kit for Molecular Weights 29,000-700,000’ (Sigma-Aldrich); (b) proveniente do ‘kit’ de marcadores de massa molecular para cromatografia de filtração em gel MWGF70 ‘Kit for Molecular Weights 6,500-66,000’ (Sigma-Aldrich)

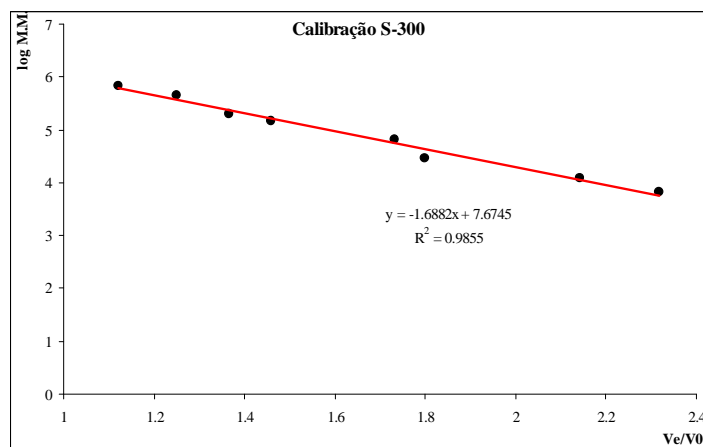


Figura 6.1 – Curva de calibração para a coluna de cromatografia de filtração em gel S-300, construída a partir valores dos volumes de eluição ( $V_e$ ) dos marcadores que constam na tabela 6.3; MM- massa molecular;  $V_0$  – volume de eluição do marcador Azul dextrano, que constitui o volume de vazio da coluna

**I-C) Calibração da Coluna Superose 6**

Marcador	MM (Da)	V eluição (mL)
Azul Dextrano <sup>(a)</sup>	2000000	25,66
Tiroglobulina <sup>(a)</sup>	669000	41,67
Apoferritina <sup>(a)</sup>	443000	45,1
β-amilase <sup>(a)</sup>	200000	46,26
Álcool Desidrogenase <sup>(a)</sup>	150000	48,5
Albumina <sup>(a)</sup>	66000	49,72
Anidrase Carbónica <sup>(a)</sup>	29000	53,7
Citocromo C <sup>(b)</sup>	12400	54,52
Aprotinina <sup>(b)</sup>	6500	56,71

Tabela 6.4 – Marcadores de massa molecular utilizados na calibração da coluna de filtração em gel Superose 6; MM – massa molecular; (a) – proveniente do ‘kit’ de marcadores de massa molecular para cromatografia de filtração em gel MWGF1000 ‘Kit for Molecular Weights 29,000-700,000’ (Sigma-Aldrich); (b) proveniente do ‘kit’ de marcadores de massa molecular para cromatografia de filtração em gel MWGF70 ‘Kit for Molecular Weights 6,500-66,000’ (Sigma-Aldrich)

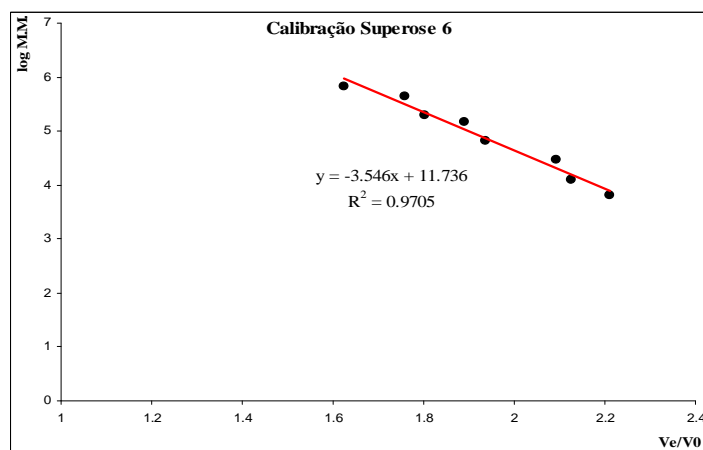


Figura 6.2 – Curva de calibração para a coluna de cromatografia de filtração em gel Superose 6, construída a partir valores dos volumes de eluição ( $V_e$ ) dos marcadores que constam na tabela 6.4; MM- massa molecular;  $V_0$  – volume de eluição do marcador Azul dextrano, que constitui o volume de vazio da coluna

**I-D) Calibração da Coluna Superdex 75**

Marcador	MM (Da)	V eluição (mL)
Azul dextrano	2000000	26,61
Albumina	66000	33,08
Anidrase carbónica	29000	40,41
Citocromo C	12400	46,36
Aprotinina	6500	52,85

Tabela 6.5 – Marcadores de massa molecular utilizados na calibração da coluna de filtração em gel Superdex 75, provenientes do ‘kit’ de marcadores de massa molecular para cromatografia de filtração em gel MWGF70 ‘Kit for Molecular Weights 6,500-66,000’ (Sigma-Aldrich); MM – massa molecular

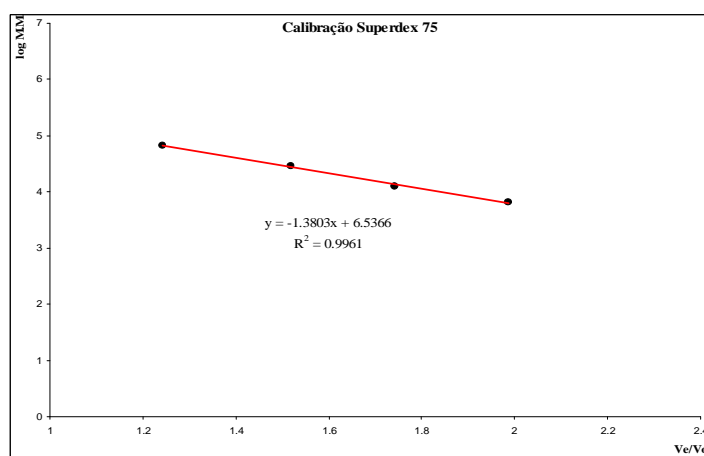


Figura 6.3 – Curva de calibração para a coluna de cromatografia de filtração em gel Superdex 75, construída a partir valores dos volumes de eluição ( $V_e$ ) dos marcadores que constam na tabela 6.5;

MM- massa molecular;  $V_0$  – volume de eluição do marcador Azul dextrano, que constitui o volume de vazio da coluna



**I-E) Calibração de Densidade** (por centrifugação em gradiente de Percoll a 90% formado *in situ*)

Padrão	densidade	altura (mm)
azul	1.038	16,0
laranja 1	1.049	18,0
verde 1	1.054	20,0
vermelho 1	1.068	22,0
laranja 2	1.096	25,5
verde 2	1.108	27,0
vermelho 2	1.133	30,5
violeta	1.142	33,0

Tabela 6.6 – Marcadores de densidade utilizados para a calibração do gradiente de Percoll 90%; ‘Percoll Density Marker Bead Kit’ da Pharmacia Fine Chemicals; a altura corresponde à distância do menisco à banda colorida formada pelo respectivo marcador

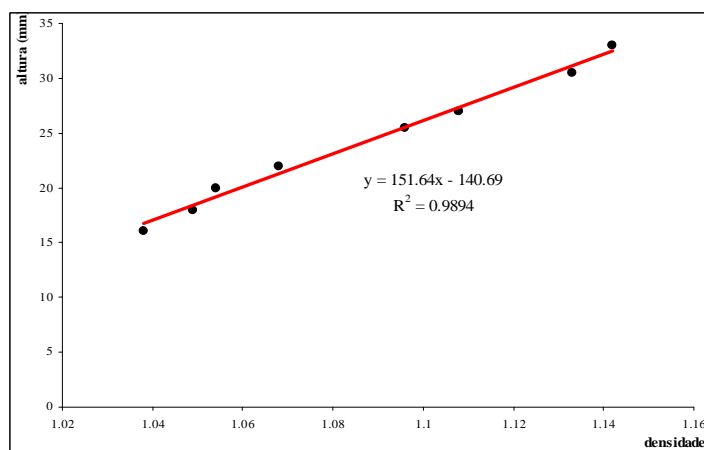


Figura 6.4 – Curva de calibração de densidade do gradiente de Percoll a 90%

**I-F) ‘Primers’ utilizados no estudo das comunidades microbianas associadas às esponjas bioacumuladoras de níquel por métodos independentes de cultura (secção 3.2.1.11.b))**

<b>Primer</b>	<b>Sequência (5’-3’)</b>	<b>Orientação</b>	<b>Região de ‘annealing’</b>
<b>LS1.5</b> <sup>(a)</sup>	CGC TGA ATT TAA GCA TAT AAG TAR G	Forward	28S rDNA
<b>LS1.3</b> <sup>(a)</sup>	AAC GAT TTG CAC GTC AGT ABC	Reverse	28S rDNA
<b>Dino18SF</b> <sup>(a)</sup>	GGA AAG TTT CAT GAA CCT TAT CAC	Forward	18S rDNA
<b>NL4</b> <sup>(b)</sup>	GGT CCG TGT TTC AAG ACG G	Reverse	28S rDNA
<b>341F</b> <sup>(c)</sup>	CCT ACG GGA GGC AGC AG	Forward	16S rDNA
<b>534R</b> <sup>(c)</sup>	ATT ACC GCG GCT GCT GG	Reverse	16S rDNA

Tabela 6.7 – Características dos ‘primers’ utilizados na amplificação dos ácidos nucleicos extraídos de esponjas marinhas; Todos os ‘primers’ foram adquiridos na Invitrogen; (a) específico para dinoflagelados; (b) ‘primer’ universal para eucariotas; (c) ‘primer’ universal para procariotas

## ANEXO II – MÉTODOS

### II-A) Métodos de extracção de glúcidos

#### Método I

Uma porção da esponja foi triturada e homogeneizada em água destilada MilliQ na proporção de 1:10 (g esponja/mL água destilada). A mistura resultante foi deixada em agitação durante 30 minutos a 4°C e seguidamente centrifugada a 15300g, 4°C, durante 35 minutos. O precipitado foi descartado e ao sobrenadante, que constituiu o extracto bruto, foi adicionado igual volume de etanol. Esta suspensão etanólica, depois de devidamente homogeneizada, foi deixada durante a noite à temperatura de -20°C. O precipitado obtido foi separado por nova centrifugação (3840 g, 4°C durante 60 minutos) e seco na estufa a 60°C.

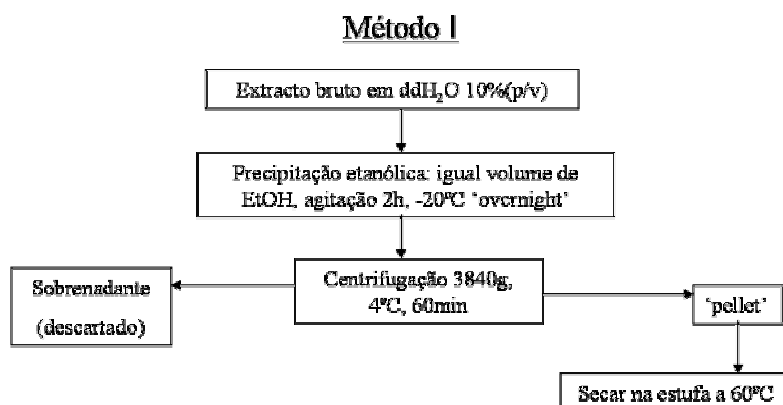


Figura 6.5 – Representação esquemática do método I de extracção de glúcidos

#### Método II (Coombe, Jakobsen et al. 1987)

O extracto bruto, obtido segundo o procedimento descrito para o método I, foi aquecido a 37°C num banho termostaticado, bem como uma solução de cloreto de cetilpiridínio (CPC) 5% (p/v). Adicionou-se 1 volume desta solução de CPC, gota a gota, a 5 volumes de extracto bruto, formando-se um precipitado flocular. A mistura foi deixada a 37°C, com agitação, durante pelo menos 1 hora, para assegurar a precipitação completa de glúcidos. Estes foram separados por centrifugação (3840 g, à temperatura ambiente durante 5 min). O precipitado obtido foi dissolvido numa solução 2 M NaCl-

etanol (100:15 v/v), de forma a converter os complexos de cetilpiridínio em sais de sódio (1 volume desta solução para 5 volumes de extracto bruto). As moléculas glicídicas foram precipitadas desta solução através da adição de 3 volumes de etanol. Esta mistura foi deixada em banho de gelo durante 1 hora, seguido de centrifugação a 15300 g durante 35 minutos. O precipitado obtido foi de novo dissolvido em água MilliQ. O precipitado final, formado após nova adição de 3 volumes de etanol e incubação durante a noite a 4°C, foi recuperado por centrifugação (15300 g durante 35 minutos) e seco na estufa a 60°C.

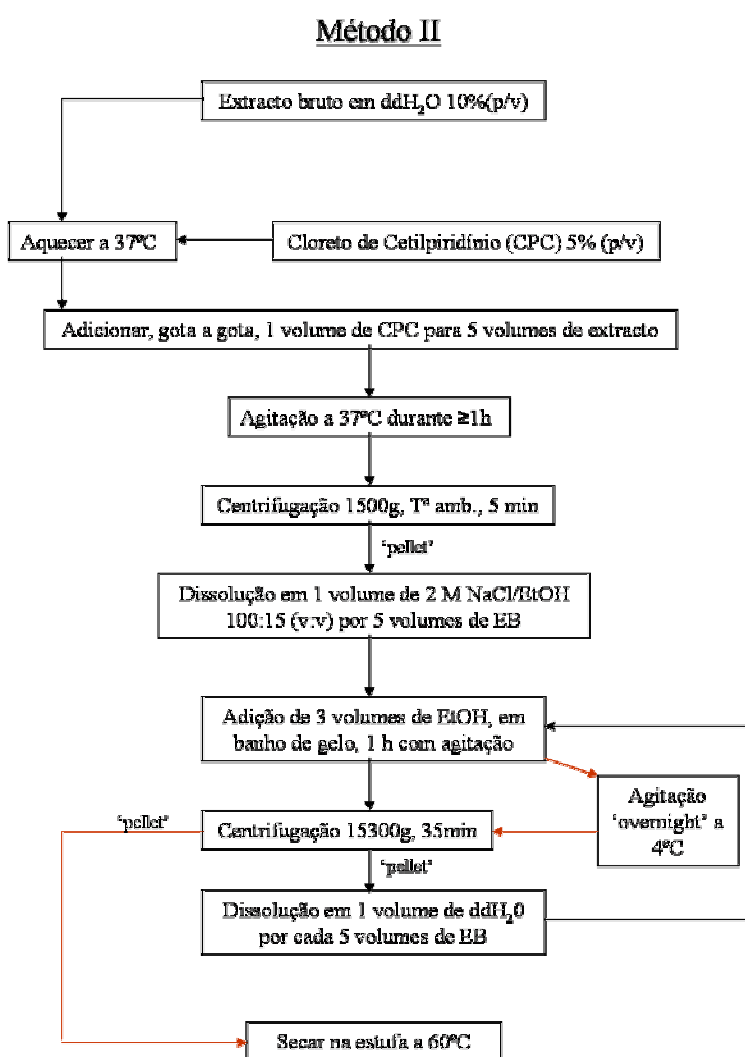


Figura 6.6 - Representação esquemática do método II de extracção de glícidos; devem seguir-se primeiro as linhas a preto e depois as linhas a vermelho

### Método III

Uma porção da esponja foi descongelada e adicionada a cerca de 10 volumes de acetona durante 24 horas a 4°C. Seguidamente, foi cortada em pedaços pequenos e seca na estufa a 60°C. O tecido seco (10 g) foi ressuspense em 300 mL de solução-tampão acetato de sódio 0,1 M a pH 5,0 contendo 1 g de papaína 5 mM de cisteína e 5 mM de EDTA. Esta mistura foi deixada em incubação a 60°C durante 24 horas. Após centrifugação de 2460 g, a 10°C durante 15 minutos, as moléculas glicídicas presentes no sobrenadante foram precipitadas com 16 mL de uma solução de CPC 10% (p/v). Esta suspensão foi deixada durante 24 horas à temperatura ambiente e depois novamente centrifugada (2460 g, 15 min). O precipitado glicídico foi ressuspense em 150 mL de solução solução 2 M NaCl-etanol (100:15 v/v) e de novo precipitado através da adição de 300 mL de etanol a 95%. Após 24 horas a 4°C, o precipitado final foi recuperado por centrifugação e lavado duas vezes com etanol 80% e uma vez com etanol 95%. O produto final foi deixado a secar na estufa a 60°C.

### Método III

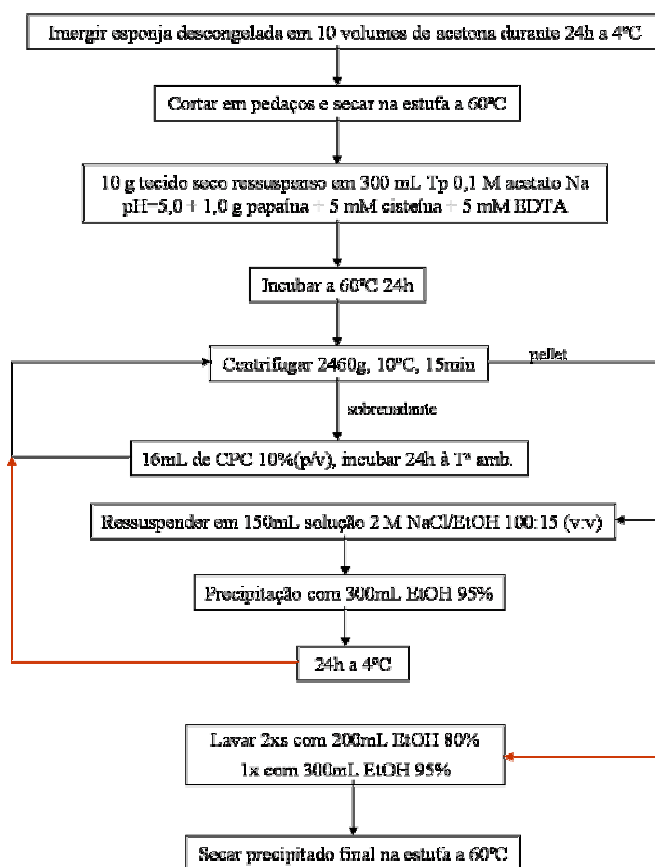


Figura 6.7 - Representação esquemática do método III de extração de glicídidos; devem seguir-se primeiro as linhas a preto e depois as linhas a vermelho; Tª amb. – temperatura ambiente

**Método IV** (Zierer, Vieira et al. 1995)

Uma porção da esponja foi descongelada e adicionada a cerca de 10 volumes de acetona durante 24 horas a 4°C. Seguidamente, foi cortada em pedaços pequenos e seca na estufa a 60°C. O tecido seco (10 g) foi ressuspenso em 300 mL de solução-tampão acetato de sódio 0,1 M a pH 5,0 contendo 1,2 g de papaína 5 mM de cisteína e 5 mM de EDTA. Esta mistura foi deixada em incubação a 60°C durante 24 horas e depois centrifugada a 25000 g, 10°C durante 20 minutos. O sobrenadante obtido foi aquecido a 100°C durante 10 minutos e arrefecido à temperatura ambiente. Seguidamente foi incubado com 1060 U de Dnase I durante 24 horas à temperatura ambiente. A centrifugação seguinte (25000 g, 10°C, 20 min.) resultou num sobrenadante que foi precipitado com 37,5 mL de uma solução de CPC 10% (p/v). Esta mistura foi deixada durante 24 horas à temperatura ambiente e depois novamente centrifugada a 1600 g durante 15 minutos. O precipitado glicídico foi ressuspenso em 150 mL de uma solução 2 M NaCl-etanol (100:15 v/v) e de novo sujeito a precipitação com 300 mL de etanol 95%. Após 24 horas a 4°C, o precipitado foi recolhido por centrifugação (25000 g, 10°C, 30 min.) e lavado duas vezes com etanol 80% e uma vez com etanol 95%. O produto final foi deixado a secar na estufa a 60°C.

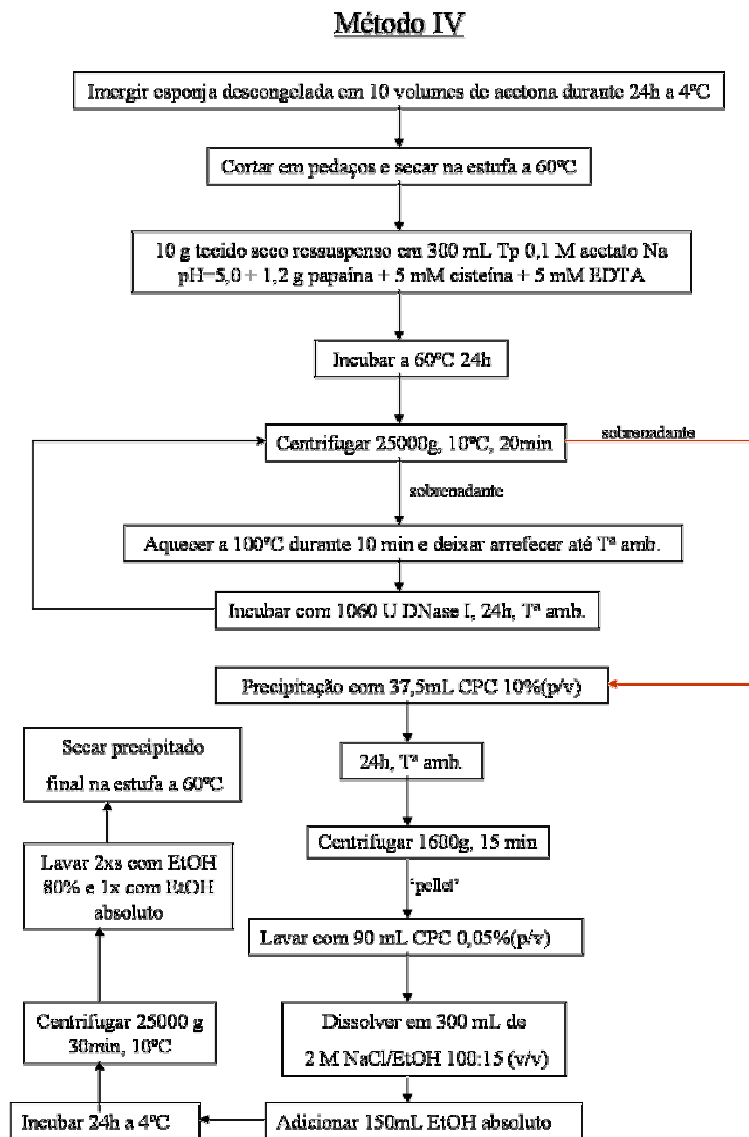


Figura 6.8 - Representação esquemática do método IV de extracção de glicídios; devem seguir-se primeiro as linhas a preto e depois as linhas a vermelho; Tª amb. – temperatura ambiente

## II-B) Preparação dos géis para SDS-PAGE

Solução	Composição	Preparação	Observações
<b>Acrilamida</b> acrilamida/ bisacrilamida (30,8 % T)	30% (p/v) acrilamida 0,8% (p/v) bisacrilamida	60 g acrilamida +1,6 g bisacrilamida. Perfazer com ddH <sub>2</sub> O até 200 mL.	Guardar sob ausência de luz até 3 meses a 4°C.
<b>Tampão do gel resolvente</b>	1,5 M Tris-Cl, pH 8,8	36,33 g Tris + 150 mL ddH <sub>2</sub> O. HCl concentrado até pH 8.8. Perfazer com ddH <sub>2</sub> O até 200 mL.	pH 8,8 – 9,0. Guardar até 3 meses a 4°C.
<b>Tampão do gel concentrador</b>	0,5 M Tris-Cl, pH 6,8	3,03 g Tris + 40 mL ddH <sub>2</sub> O. HCl concentrado até pH 6.8. Perfazer com ddH <sub>2</sub> O até 50 mL.	pH 6,6 – 6,8. Guardar até 3 meses a 4°C.
<b>SDS 10%</b>	10% (p/v) SDS	10g SDS em 100 mL ddH <sub>2</sub> O	Agitar suavemente. Guardar até 6 meses à temp <sup>a</sup> ambiente.
<b>Tampão de tratamento da amostra</b>	<u>NATIVO</u> : 0,125 M Tris-Cl, 20% (v/v) glicerol, 0,02% (p/v) azul de bromofenol, pH 6,8	<u>NATIVO</u> : 2,5 mL tampão do gel concentrador + 2 mL glicerol + 0.002 g azul de bromofenol. Perfazer com ddH <sub>2</sub> O até 10 mL.	Guardar em alíquotas de 0,5 mL a –20 °C até 6 meses.
	<u>SDS-NATIVO</u> : 0,125 M Tris-Cl, 4% (p/v) SDS, 20% (v/v) glicerol, 0,02% (p/v) azul de bromofenol, pH 6,8	<u>SDS-NATIVO</u> : 2,5 mL tampão do gel concentrador + 4 mL SDS 10% + 2 mL glicerol + 0,002 g azul de bromofenol. Perfazer com ddH <sub>2</sub> O até 10 mL.	
	<u>SDS-DESNATURANTE</u> : 0,125 M Tris-Cl, 4% (p/v) SDS, 20% (v/v) glicerol, 5% (v/v) β-mercaptoetanol, 0,02% (p/v) azul de bromofenol, pH 6,8	<u>SDS-DESNATURANTE</u> : 2,5 mL tampão do gel concentrador + 4 mL SDS 10% + 2 mL glicerol + 0.002 g azul de bromofenol + 0,5 mL β-mercaptoetanol. Perfazer com ddH <sub>2</sub> O até 10 mL.	
<b>Tampão de eléctrodo</b> (5×concentrado)	<u>Após diluição 1:5</u> : <u>NATIVO</u> : 0,025 M Tris, 0,192 M glicina , pH 8,3	<u>NATIVO</u> : 15,15 g Tris + 72,08 g glicina. Perfazer com ddH <sub>2</sub> O até 1 L.	Não é necessário verificar o pH => pode fazer-se directamente no frasco onde se guarda este tampão. Guardar até 1 mês à temp <sup>a</sup> . ambiente.
	<u>Após diluição 1:5</u> : <u>SDS</u> : 0,025 M Tris, 0,192 M glicina, 0,1% (p/v) SDS, pH 8,3	<u>SDS</u> : 15,15 g Tris + 72,08 g glicina + 5 g SDS. Perfazer com ddH <sub>2</sub> O até 1 L	
<b>Persulfato de amónio (PSA) 10%</b>	10% (p/v) PSA	0,1 g em 1 mL ddH <sub>2</sub> O.	Preparar no próprio dia.
<b>Água saturada com n-butanol</b>	-----	50 mL n-butanol + 5 mL ddH <sub>2</sub> O num frasco. Agitar. Usar a fase superior.	Estável indefinidamente à temp <sup>a</sup> . ambiente.

Tabela 6.8 - Composição das soluções utilizadas em PAGE (Hofer 1994)



SOLUÇÃO	Concentração final de gel resolvente (%T) (V <sub>i</sub> =15,06 mL)					Concentração final de gel concentrador (%T) (V <sub>i</sub> = 5 mL)
	5 %	7,5 %	10 %	12,5 %	15 %	4 %
Solução de acrilamida	2,45 mL	3,70 mL	4,90 mL	6,15 mL	7,35 mL	0,65 mL
Tampão do gel resolvente	3,75 mL	3,75 mL	3,75 mL	3,75 mL	3,75 mL	-
Tampão do gel concentrador	-	-	-	-	-	1,25 mL
→ SDS 10% / ddH <sub>2</sub> O (gel SDS / NATIVO)	150 µL	150 µL	150 µL	150 µL	150 µL	50 µL
ddH <sub>2</sub> O	8,65 mL	7,40 mL	6,20 mL	4,95 mL	3,75 mL	3,02 mL
PSA 10%	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	25 µL
TEMED	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL	5 µL

Tabela 6.9 - Composição das soluções para preparação dos géis para PAGE (Hofer 1994)

### II-C) Coloração de géis de PAGE para proteínas – Método do Azul de Coomassie

Solução	Composição
Solução de coloração	0,025% (p/v) de Azul Brilhante de Coomassie R-250, 40% (v/v) de metanol e 7% (v/v) de ácido acético. Filtrar
Solução de descoloração I	40% (v/v) de metanol e 7% (v/v) de ácido acético
Solução de descoloração II	5% (v/v) de metanol e 7% (v/v) de ácido acético

Tabela 6.10 – Composição das soluções utilizadas no método de coloração de géis de PAGE com Azul de Coomassie (Hofer 1994)

Depois de desmontada a aparelhagem de electroforese e retirado o gel, este foi mergulhado em solução de coloração e deixado durante a noite, após o que se substituiu por solução de descoloração I, onde ficou durante 30 minutos, com agitação, para remoção do excesso de corante. Seguidamente, decantou-se, adicionou-se a solução de descoloração II e manteve-se, com agitação, até visualização de bandas e até que o fundo do gel se apresentasse claro.

**II-D) Coloração de géis de PAGE para proteínas – Método do Nitrato de Prata**

O método de coloração com nitrato de prata baseia-se na deposição de sais de prata sobre as bandas proteicas. É muito mais sensível que o descrito anteriormente, mas possui muito mais interferências, o que dá origem a um maior “ruído de fundo”. Além disso, é também um método muito mais complexo e moroso. No entanto, é o método preferencial quando o objectivo é detectar a presença de contaminantes. O protocolo e as respectivas soluções utilizadas encontram-se na tabela seguinte:

<b>Etapa</b>	<b>Solução</b>	<b>Tempo</b>
<b>Fixação</b>	50% (v/v) metanol + 12% (v/v) ácido acético + 0,05% (v/v) formaldeído 37%	‘Overnight’ ou, se necessário, vários dias
<b>Lavagem I</b>	50% (v/v) etanol	3×20 minutos ou, se necessário, várias horas
<b>Pré-tratamento</b>	0,02% (p/v) tiosulfato de sódio pentahidratado	1 minuto
<b>Lavagem II</b>	Água MilliQ®	3×20 segundos
<b>Impregnação</b>	0,2% (p/v) nitrato de prata + 0,075% (v/v) formaldeído 37%	20 minutos
<b>Lavagem III</b>	Água MilliQ®	2×20 segundos
<b>Desenvolvimento</b>	6% (p/v) carbonato de sódio + 0,0004% (p/v) tiosulfato de sódio pentahidratado + 0,05% (v/v) formaldeído 37%	10 minutos ou até visualização de bandas
<b>Lavagem IV</b>	Água MilliQ®	2×2 minutos
<b>Paragem</b>	50% (v/v) metanol + 12% (v/v) ácido acético	10 minutos
<b>Lavagem V</b>	50% (v/v) metanol	Pelo menos 20 minutos

Tabela 6.11 – Soluções e procedimento utilizados no método de coloração de géis de PAGE com nitrato de prata.

**II-E) Coloração de géis de PAGE para actividade de IPO –****Método da *orto*-dianisidina (Almeida, Filipe et al. 2001)**

<b>Solução</b>	<b>Concentração</b>
Solução-tampão citrato/fosfato	0,17 M (pH 6,2)
<i>Orto</i> -dianisidina	6,3 mM
KI	0,2 M
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	26,6 mM

Tabela 6.12 – Soluções utilizadas no método de coloração de géis de PAGE para actividade de IPO pelo método da *orto*-dianisidina

Procedimento: Colocar o gel em 50 mL da solução tampão citrato-fosfato, adicionar 5 mL da solução de *orto*-dianisidina, 5 mL da solução de KI e 5 mL da solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Na presença de iodoperoxidase surgem bandas castanhas, após aproximadamente 10 minutos de incubação a 20°C.

## ANEXO III – RESULTADOS

### III-A) Cromatogramas correspondentes ao fraccionamento dos extractos com choque térmico por cromatografia de filtração em gel na coluna Superdex 75 (secção 3.2.2.1.)

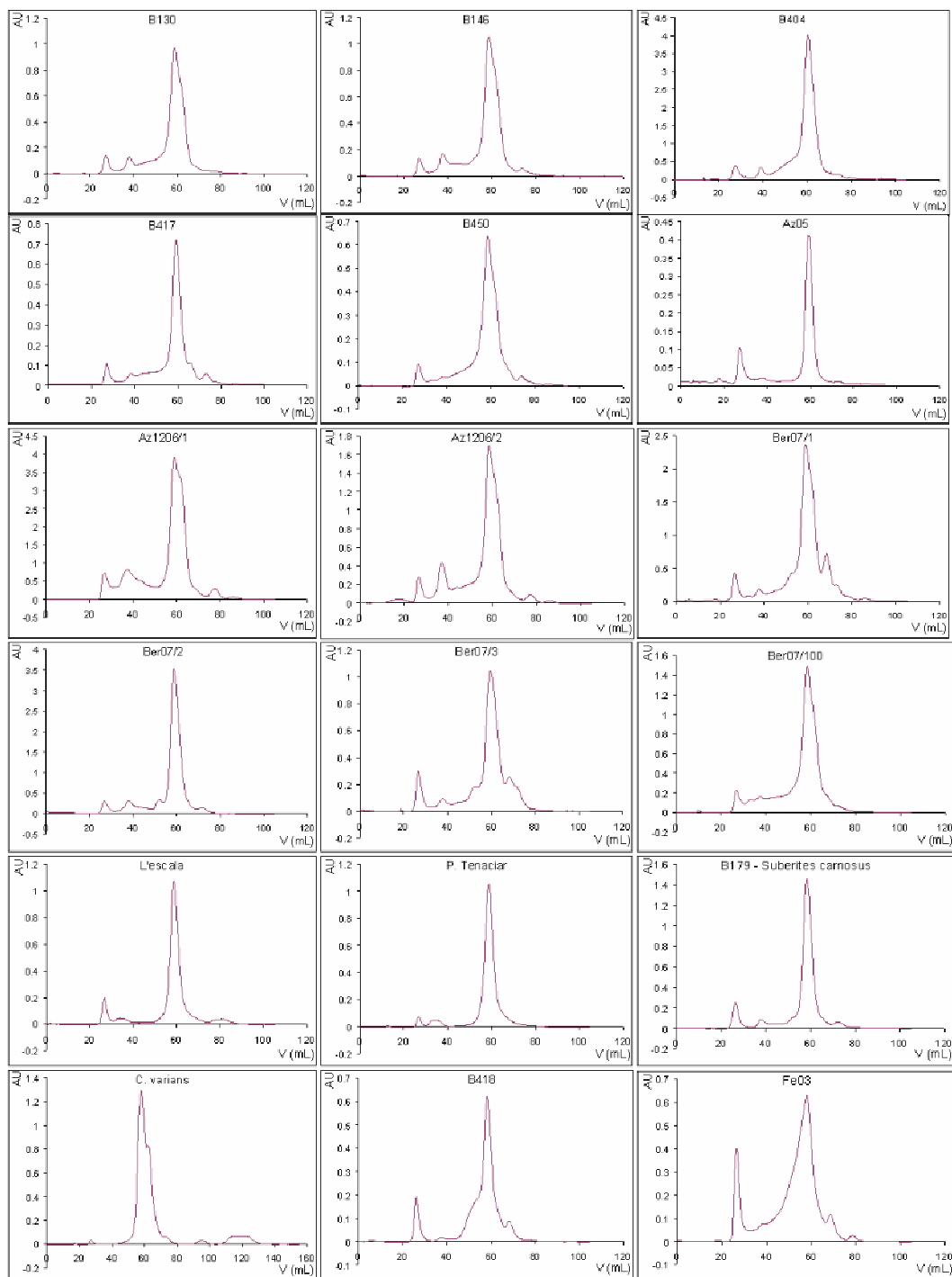


Figura 6.9 – Cromatogramas do fraccionamento dos h.s.e. das amostras B130, B146, B404, B417, B450, Az05, Az1206/1, Az1206/2, Ber07/1, Ber07/2, Ber07/3, Ber07/100, l'escala, tenaciar, B179, C. varians, B418 e Fe03

III-B) Relatório da Determinação do Conteúdo Metálico por ICP-AES (secção 3.2.2.4)

**CQFB - Lab. Associado REQUIMTE**  
Serviço de Espectroscopia de Emissão Atômica

Operador: Carla Rodrigues / Lab. Análises 523-A  
Submetido por: Ana Esteves / DGB/FCUL  
Responsável: Prof. Madalena Humes / DGB/FCUL  
Req. Interna: 06-1163  
Data Análise: 17-06-08  
Tempo de análise: 300 min

**Relatório de Análise - ICP-AES**

Esponja	Fe (mg/l)	RSD	Ni (mg/l)	RSD	Zn (mg/l)	RSD	Zn (mg/l)	RSD	Fe (mg/l)	RSD	Ni (mg/l)	RSD	Zn (mg/l)	RSD	Fe (mg/l)	RSD	Ni (mg/l)	RSD	Zn (mg/l)	RSD	Fe (mg/l)	RSD	Ni (mg/l)	RSD	Zn (mg/l)	RSD
B130	16.50	2.37%	18.72	2.90%	38.62	1.44%	41.12	1.29%	B130	0.60	1.05%	22.72	2.85%	4.12	1.41%	9.12	1.58%	5.20	1.10%	0.086	2.31%	<ld*	<ld*	0.029	3.55%	
B146	9.11	1.47%	10.29	0.67%	20.63	1.00%	29.44	0.37%	B146	1.35	2.43%	34.21	3.80%	29.44	0.37%	0.29	0.41%	12.09	2.52%	0.077	1.76%	<ld*	<ld*	0.034	0.82%	
B404	40.62	1.35%	39.92	0.26%	43.50	1.05%	53.77	0.36%	B404	0.41	1.38%	19.11	0.25%	5.87	0.36%	0.13	3.86%	6.34	1.80%	0.096	3.05%	<ld*	<ld*	0.035	1.77%	
B417	12.64	2.31%	16.82	1.75%	20.68	1.99%	6.52	0.90%	B417	0.65	2.53%	16.58	2.02%	6.52	0.90%	0.12	0.72%	7.78	1.01%	0.22	2.33%	1.24	1.40%	0.12	2.26%	
B450	4.32	0.48%	3.71	1.42%	5.38	1.89%	10.05	0.83%	B450	0.54	1.74%	10.05	0.83%	16.4	1.85%	0.11	1.31%	4.13	1.18%	27.44	1.28%	5.47	2.78%	3.95	1.56%	
Az05	8.63	0.23%	1.02	0.47%	5.54	3.80%	3.20	1.33%	Az05	0.46	0.40%	3.20	1.33%	8.83	2.13%	0.085	2.27%	1.81	1.82%	<ld*	<ld*	<ld*	<ld*	<ld*	<ld*	
Az061	5.43	2.08%	7.03	2.25%	1.32	2.45%	30.75	1.94%	Az061	1.82	1.95%	30.75	1.94%	1.19	1.14%	0.15	2.10%	12.38	1.70%	4.00	1.58%	4.00	1.58%	4.00	1.58%	
Az062	9.20	2.20%	8.61	2.21%	2.85	1.92%	23.40	0.42%	Az062	0.83	2.76%	23.40	0.42%	0.88	2.28%	0.18	0.24%	10.82	3.18%	0.43	0.72%	0.54	0.25%	0.54	0.25%	
Ber071	3.78	2.71%	3.91	0.94%	5.42	2.36%	5.61	1.00%	Ber071	0.15	2.77%	5.61	1.00%	0.10	1.55%	0.082	2.95%	2.57	1.57%	0.14	2.12%	0.14	2.12%	0.14	2.12%	
Ber072	8.08	0.88%	9.74	1.46%	6.54	3.02%	25.42	0.75%	Ber072	0.89	2.86%	25.42	0.75%	12.46	2.10%	0.17	2.32%	10.04	1.87%	3.85	0.36%	3.85	0.36%	3.85	0.36%	
Ber073	6.44	3.44%	13.39	2.00%	17.82	3.15%	9.40	2.06%	Ber073	0.28	2.33%	9.40	2.06%	0.13	1.85%	0.12	0.20%	4.77	1.67%	0.24	0.91%	0.24	0.91%	0.24	0.91%	
Ber07100	9.41	2.63%	10.47	1.28%	8.21	3.02%	10.09	2.44%	Ber07100	0.39	2.46%	10.09	2.44%	0.43	1.32%	0.21	2.38%	6.02	0.21%	0.40	1.20%	0.40	1.20%	0.40	1.20%	
L'escala	43.33	3.15%	46.53	0.45%	62.34	2.37%	34.08	0.85%	L'escala	1.27	1.75%	34.08	0.85%	32.30	1.88%	0.28	0.80%	13.02	0.64%	10.10	1.47%	10.10	1.47%	10.10	1.47%	
Tenaciar	32.79	2.97%	37.74	1.76%	50.82	1.95%	23.53	1.43%	Tenaciar	0.60	1.75%	23.53	1.43%	8.46	0.44%	0.10	0.58%	9.44	2.98%	5.63	1.85%	5.63	1.85%	5.63	1.85%	
Varianis	3.45	2.27%	8.88	0.33%	0.35	0.85%	16.75	0.49%	Varianis	0.71	1.14%	16.75	0.49%	0.11	0.98%	0.16	2.38%	5.51	0.73%	0.20	0.82%	0.20	0.82%	0.20	0.82%	
Suberites	29.32	2.14%	8.10	1.05%	19.99	1.38%	20.26	0.48%	Suberites	0.63	2.85%	20.26	0.48%	20.57	1.41%	0.094	0.64%	9.02	1.25%	6.57	1.18%	6.57	1.18%	6.57	1.18%	
B418	2.66	1.87%	0.88	2.07%	0.63	2.29%	<ld*	<ld*	B418	0.13	0.86%	<ld*	<ld*	0.042	3.46%	0.089	1.95%	<ld*	<ld*	0.24	1.30%	0.24	1.30%	0.24	1.30%	
Fe03	0.75	1.88%	0.068	3.64%	0.083	1.23%	<ld*	<ld*	Fe03	0.20	5.87%	<ld*	<ld*	0.078	1.57%	0.098	0.87%	<ld*	<ld*	<ld*	<ld*	<ld*	<ld*	<ld*	<ld*	<ld*
Me-0771	7.30	3.23%	0.60	1.65%	0.66	0.70%	<ld*	<ld*	Me-0771	<ld*	<ld*	<ld*	<ld*	<ld*	<ld*	<ld*	<ld*	<ld*	<ld*	<ld*	<ld*	<ld*	<ld*	<ld*	<ld*	
Me-0772	35.54	1.51%	4.37	1.75%	2.75	2.32%	<ld*	<ld*	Me-0772	<ld*	<ld*	<ld*	<ld*	<ld*	<ld*	<ld*	<ld*	<ld*	<ld*	<ld*	<ld*	<ld*	<ld*	<ld*	<ld*	

**Observações**

\* O valor de RSD é calculado a partir de 3 réplicas de cada amostra  
\*\* limites de detecção: Fe 0.5 µg/l, Ni 1.8 µg/l e Zn 1.0 µg/l

Figura 6.10 – Relatório de Análise ICP-AES

### III-C) Alinhamentos das seqüências de fragmentos de *Symbiodinium spp.* (secção 3.2.2.7.a))

#### Alinhamento 1

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90
Varians_B  AACGATTTGCACGTCAGTAGCGCTACGAGCCTCCATCAGAGTTTCCCCTGACTTTGCCCTTCGCAGGCATAGTTCACCATCTTTGGGTCC
Varians_A  AACGATTTGCACGTCAGTAGCGCTACGAGCCTCCATTAGAGTTTCCCCTGACTTTGCCCTTCGCAGGCATAGTTCACCATCTTTGGGTCC

      110     120     130     140     150     160     170     180     190
Varians_B  TGCTCTTACTCAAACTTCTCCCAATTGATCAGTCAGTTGCTGGTGCAAAATCCCAGCAGTCACCTTCATTGGCCACACAGGCTTAGCACCT
Varians_A  TGCTCTTACTCAAACTTCTCCCAATTGATCAGTCAGTTGCTGGTGCAAAATCCCAGCAGTCACCTTCATTGGCCACACAGGCTTAGCACCT

      210     220     230     240     250     260     270     280     290
Varians_B  CATACGTGCTAGACTCCTTGGTCCGTGTTTCAAGACGGGTCGAAAAAAACCCTGAATCAGTAAGCCACATATGTCCGAATCCCACGGAGC
Varians_A  CATACGTGCTAGACTCCTTGGTCCGTGTTTCAAGACGGGTCGAAAAAAACCCTGAATCAGTAAGCCAC-----

      310     320     330     340     350     360     370     380     390
Varians_B  CGCTCACGAGCGACAAATGCATGCTCAAGGCCCTGTTCCAACTGACGTGACACCTGATATCTTTCATAAGAAACACCACGAGCGCCCGGC
Varians_A  -----

      410     420     430     440     450     460     470     480     490
Varians_B  CACAGAGCTTGGCGTTCTGAGCTCAGAGCTTGCAAGCGCCCGGGCAATCTCAGCAGAGAGTGTGGTTGCATTGCGTTCCCTTCCAGCGAT
Varians_A  -----

      510     520     530     540     550     560     570     580     590
Varians_B  TTTTAACTCTCTTTCCAAAATCCTTTTCACTTTCCCTCATGGTACTTGTTCGCTATCGGTC TTGGGCC TTTATTTAGCTTTAGATGAAAT
Varians_A  -----

      610     620     630     640     650     660     670     680     690
Varians_B  AATTTACGCTCCAAGTCCGAGGAACGTGACTCTGAGAAATATCGCCGTACAGAGCGGACCCGAGCGAAACAAAAGGATTTCTCACCCAAGTT
Varians_A  -----GGACACCGAGCGAAACAAAAGGATTTCTCACCCAAGTT

      710     720     730     740     750     760     770     780     790
Varians_B  TTCCAAGAGGCTTACGCTCGAGCCACCGATAGCGCAATATCTGCAAGGCTACAAACCCAAAACCAGAGCCTTGGTTTTAAGCCTGAGCGTTTC
Varians_A  TTCCAAGAGGCTTACGCTCGAGCCACCAATAGCGCAATATCTGCAAGGCTACAAACCCAAAACCAGAGCCTTGGTTTTAAGCCTGAGCGTTTC

      810     820     830     840     850     860
Varians_B  TCGCCATTACTAAGGGAAATCCTGTTTAGTTCCTTTTCCCTCCGCTTACTTATATGCTTAAATTCAGCG
Varians_A  TCGCCATTACTAAGGGAAATCCTGTTTAGTTCCTTTTCCCTCCGCTTACTTATATGCTTAAATTCAGCG

```

Figura 6.11 – Alinhamento das seqüências dos fragmentos obtidos por amplificação da amostra *Cliona varians* com o par de ‘primers’ LS1.5/LS1.3; Varians\_B – fragmento sem deleção obtido através de clonagem e sequenciação; Varians\_A – fragmento com deleção obtido através de reamplificação e sequenciação

## Alinhamento 2.1



Figura 6.12 - Alinhamento das sequências Ber07/2-SP6 e Ber07/2-Dino18SF.1 dos fragmentos obtidos por amplificação da amostra Ber07/2 com o par de primers Dino18SF/NL4; Ber07/2-SP6 – sequência ‘forward’ do fragmento sem deleção obtido através de clonagem e sequenciação; Ber07/2-Dino18SF.1 – sequência parcial (a montante da deleção) do fragmento com deleção obtido através de amplificação e sequenciação

## Alinhamento 2.2

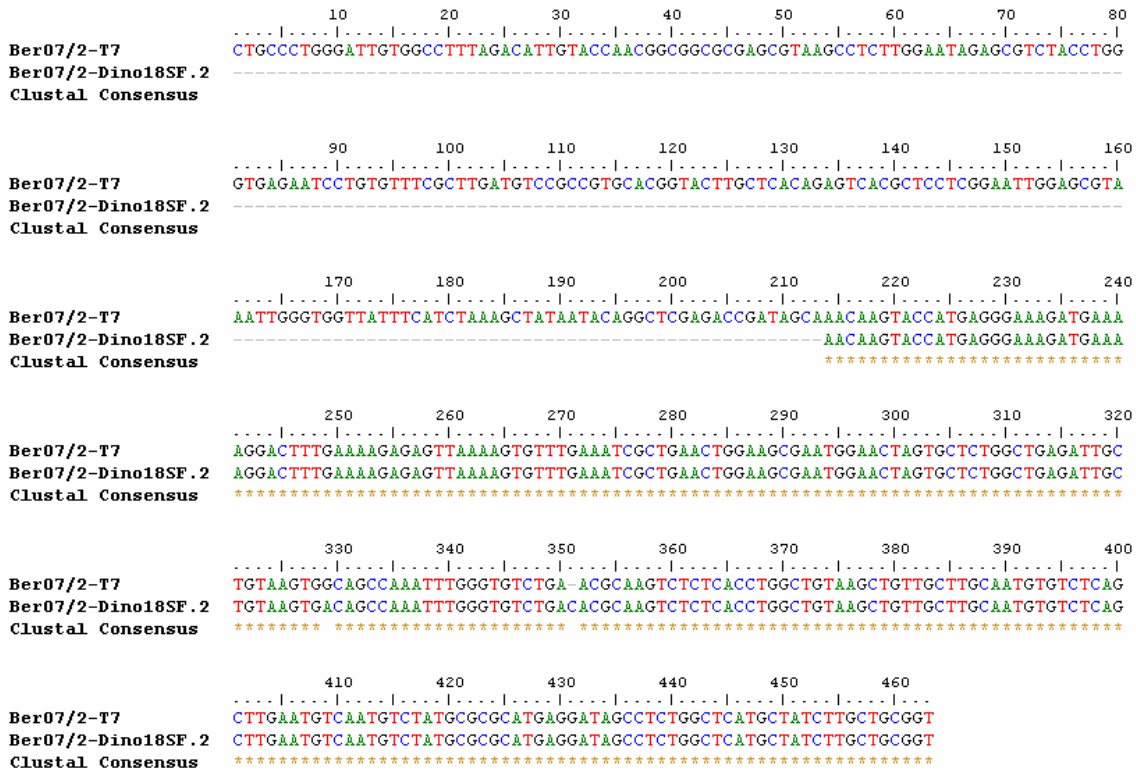


Figura 6.13 - Alinhamento das sequências Ber07/2-T7 e Ber07/2-Dino18SF.2 dos fragmentos obtidos por amplificação da amostra Ber07/2 com o par de primers Dino18SF/NL4; Ber07/2-T7 – sequência ‘reverse’ do fragmento sem deleção obtido através de clonagem e sequenciação; Ber07/2-Dino18SF.2 – sequência parcial (a jusante da deleção) do fragmento com deleção obtido através de amplificação e sequenciação





## **ANEXO IV – PUBLICAÇÕES**