



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia
2011

**ANABELA
RODRIGUES
LOPES**

**MATRIZ ORGÂNICA SOLÚVEL DO NACRE DA
CONCHA DO BIVALVE *Anodonta cygnea***



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia
2011

**ANABELA
RODRIGUES
LOPES**

**MATRIZ ORGÂNICA SOLÚVEL DO NACRE DA
CONCHA DO BIVALVE *Anodonta cygnea***

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Aplicada, Ramo de Biologia Molecular e Celular, realizada sob a orientação científica dos Professores Doutores Jorge Pereira Machado do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar – Universidade do Porto e António Carlos Matias Correia, do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

Dedico este trabalho aos meus pais e ao meu querido marido pela incessante paciência.

o júri

presidente

Doutor João António de Almeida Seródio

Professor Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Doutora Laura Ferreira Teixeira Vilarinho

Investigadora auxiliar no Centro de Genética Médica do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge

Doutor Jorge Pereira Machado

Professor associado do Instituto Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto

Doutor António Carlos Matias Correia

Professor Catedrático do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Agradeço ao Professor Doutor Jorge Pereira Machado pela oportunidade de poder desenvolver investigação nesta área e pela confiança no meu trabalho.

Agradeço à Professora Doutora Leonor Teles Grilo por me disponibilizar o equipamento necessário no laboratório de Genética Molecular.

Agradeço ao Professor Doutor Manuel Vila Nova e ao Doutor Pedro Madureira pela ajuda técnica na área de imunologia.

Um agradecimento especial ao Doutor Frédéric Marin pela ajuda em pormenores técnicos.

Agradeço a todo o pessoal do Laboratório de Fisiologia Aplicada do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar em especial à Dra. Mariana Hinzmann pela disponibilidade e companheirismo e ao Dr. Manuel Lopes-Lima.

Agradeço ao Técnico José Andrade pela ajuda técnica e acima de tudo pela amizade.

Agradeço à Doutora Susana Pina e à Técnica Magda Nunes pelas conversas da hora do almoço que foram muitas vezes fulcrais nos momentos mais difíceis.

palavras-chave

Concha, nacre, matriz orgânica solúvel, bivalve, *Anodonta cygnea*

resumo

A biomineralização da concha dos moluscos é um processo controlado por uma matriz orgânica extracelular secretada para o espaço extrapaleal pelo epitélio calcificante. Já foram realizados alguns estudos dos quais se obtiveram algumas respostas sobre os constituintes da matriz. No entanto, quase todos tiveram como objeto de estudo moluscos das famílias Pteriidae e Pinnidae. Neste trabalho o animal estudado, o bivalve *Anodonta cygnea*, pertence à família Unionidae da qual se sabe muito pouco no que respeita à sua matriz orgânica. Das duas frações possíveis de obter pelo processo de extração apenas uma, a fração solúvel, foi analisada. A análise ocorreu a vários níveis nomeadamente ao nível da caracterização bioquímica por eletroforese, quantificação de matéria existente e localização da matriz diretamente na concha através da técnica de "immunogold". Foram também produzidos anticorpos policlonais para a matriz e construída uma biblioteca de ADN complementar ao ARN mensageiro existente no epitélio calcificante sendo neste caso o folheto externo do manto. Da análise em eletroforese foram detetadas cinco frações proteicas de pesos moleculares de aproximadamente 106, 74, 59, 49 e 40KDa. A pequena quantidade de proteínas totais e de glicosaminoglicanos obtida da extração comprovou os demais estudos que referem que a percentagem de matriz orgânica existente na concha é baixa quando comparada com a componente inorgânica, neste caso constituída por carbonato de cálcio na forma de cristais de aragonite. Pela técnica de "immunogold" verificou-se que a matriz orgânica encontra-se essencialmente nos espaços intercristalinos mas existe também associada aos próprios cristais. Os resultados encontrados neste trabalho para esta espécie ao nível da caracterização bioquímica são semelhantes aos descritos no estudo de outra espécie da mesma família. Relativamente à localização da matriz orgânica na concha esta apresenta distribuição semelhante à da espécie *Pinna nobilis* embora pertençam a famílias diferentes. Apesar dos milhares de anos de evolução divergente, isto sugere que a matriz orgânica não deverá variar muito entre famílias na sua constituição e organização.

keywords

Shell, nacre, soluble organic matrix, bivalve, *Anodonta cygnea*

abstract

The biomineralization process of mollusc's shell is controlled by an extracellular organic matrix which is produced by the calcifying epithelium and secreted into the extrapallial space. Some studies have already been performed and give some answers about organic matrix constituents. However almost all of them were on species of the families Pteriidae and Pinnidae. In the present work the study animal is the freshwater bivalve *Anodonta cygnea*, belonging to the Unionidae family, from which little is known about its organic matrix. From the extraction process it is possible to achieve two fractions of organic matrix, but only one, the soluble fraction, was the object of this study. Different techniques were used, including biochemical characterization by electrophoresis, quantification and detection of the matrix directly in the shell through the immunogold technique. Were also produced polyclonal antibodies against the organic matrix and a complementary DNA library, constructed with the messenger RNA of the outer mantle epithelium, which is in this animal the calcifying epithelium, used as a template. From the electrophoretic analysis five protein fractions were detected with molecular weights of approximately 106, 74, 59, 49 and 40 KDa. The small amount of the total protein and glycosaminoglycans obtained from the extraction indicate the low percentage of organic matrix when compared to the inorganic fraction which is in this case calcium carbonate in the form of aragonite crystals, situation confirmed in other studies. By the immunogold technique it was found that the organic matrix is mainly intercrystalline but it can also be found within the crystals. The results found in terms of biochemical characterization in this study with *Anodonta cygnea* are similar to those described for other members of this family. Regarding to the localization of the organic matrix in the shell, the results obtained are very similar to the localization founded in the *Pinna nobilis* although they belong to the different families. This suggests that the thousands of years of divergent evolution should not vary greatly between families in terms of constitution and organization of the organic matrix.

ÍNDICE GERAL

Lista de Abreviaturas	III
Índice de Figuras.....	V
Índice de Tabelas.....	VII
1. Introdução	1
2. Objetivos.....	8
3. Metodologia	9
3.1 – Exemplos	9
3.2 – Extração da matriz orgânica da camada nacarada.....	9
3.3 – Quantificação e análise por SDS-PAGE da matriz orgânica extraída	10
3.4 – Produção de anticorpos policlonais da matriz orgânica da camada nacarada	12
3.4.1 – Imunização de coelhos	12
3.4.2 – Teste ELISA	13
3.4.3 – Purificação das IgG	13
3.4.4 – Quantificação das IgG e teste do Dot-Blot	14
3.5 – Construção de biblioteca de ADN complementar.....	15
3.5.1 – Extração do ARN total e do ARN mensageiro.....	15
3.5.2 – Construção de biblioteca.....	16
3.6 – Identificação da matriz orgânica na camada nacarada pela técnica de “Immunogold”	16
4. Resultados	19
4.1 – Matriz orgânica da camada nacarada da concha	19
4.2 – Anticorpos policlonais	21
4.3 – Biblioteca ADN complementar.....	22
4.4 – “Immunogold”	23
5. Discussão	29
6. Conclusão	37
7. Referências bibliográficas.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
BSA	Albumina sérica bovina
DEPC	Dietilpirocarbonato
DTT	Ditriotreitol
EDTA	Ácido etileno diaminoacético
EEM	Epitélio externo do manto
ELISA	Ensaio imunoenzimático
GAG	Glicosaminoglicano
IgG	Imunoglobulina G
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
OPD	O-fenilenodiamina
PBS	Tampão fosfato salino
RACE-PCR	Amplificação rápida dos terminais do ADN complementar associada à técnica de reação em cadeia da polimerase
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
SEM	Microscopia eletrónica de varrimento
TBS	Tampão Tris salino
TEM	Microscopia eletrónica de transmissão
TPBS	Tampão fosfato salino com Tween 20
TTBS	Tampão Tris salino com Tween 20
X-GAL	5-bromo-4-cloro-3-indolil-D-galactopiranosídeo

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática de uma concha de bivalve constituída por três camadas sendo duas delas calcificadas (prismática e nacarada) e uma orgânica (periostraco) (Marin and Luquet, 2004).	2
Figura 2 – Superfície externa da valva esquerda do bivalve <i>Anodonta cygnea</i>	5
Figura 3 – Nos mapas, diversidade da ordem Unionidae (A) e distribuição da espécie <i>Anodonta cygnea</i> (B) (Reis, 2006). Fotos de dois locais de ocorrência confirmada da espécie: Lagoa de Mira (C) e Pateira de Fermentelos (D).	6
Figura 4 – Imagens de SEM da concha de <i>Anodonta cygnea</i> vistas em modo de elétrões secundários. (A) Corte transversal onde se observam as três camadas, (B) observação da superfície externa da valva previamente tratada para remoção do periostracum facilitando assim a visualização dos prismas.	8
Figura 5 – Valvas da concha de <i>Anodonta cygnea</i> . (A) Da esquerda para a direita: valva natural; valva após tratamentos onde se vê a ausência do periostraco e zonas com e sem camada prismática; valva apenas com camada nacarada. (B) Pormenor de valva apenas com camada nacarada.	19
Figura 6 – Mini-SDS-PAGE em gel resolvente de acrilamida a 8% da matriz orgânica extraída da camada nacarada do bivalve <i>Anodonta cygnea</i> . Poços com o número (1) marcador molecular, (2) amostra da primeira extração, (3) amostra da segunda extração. (A) metade do gel corada com Coomassie brilliant blue, (B) metade do gel corada com nitrato de prata. As setas indicam a posição das frações proteicas encontradas.	20
Figura 7 – Resultado do teste de Dot-Blot para a afinidade do anticorpo à matriz orgânica.	22
Figura 8 – Gel de agarose desnaturante a 1.2% do ARN total extraído pelo kit comercial (2, 3) e pelo método clássico (4, 5). (1) Marcador molecular, (A) “smear” ARN mensageiro, (B) subunidade ribossomal 18S e (C) ARN de transferência.	22
Figura 9 – Resultados de “Immunogold” observados em SEM em modo de elétrões retrodifundidos. Vista superficial. As letras A-F representam, respetivamente, os procedimentos controlo 1-6 descritos na metodologia (tabela 1). As setas largas indicam presença de filamentos de prata e as setas mais finas na figura E indicam a presença de partículas de ouro de 40nm.	24
Figura 10 – Resultados de “Immunogold” observados em SEM em modo de elétrões retrodifundidos. Vista superficial. As letras representam os resultados obtidos nos procedimentos teste descritos na metodologia (tabela 2). (A) e (B) representam o teste 1, (C) o teste 2 e (D) o teste 3.	26
Figura 11 – Resultados de “Immunogold” observados em SEM em modo de elétrões retrodifundidos. Vista longitudinal. As letras A-C representam respetivamente os resultados obtidos nos procedimentos teste 1-3.	27

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Procedimentos controlo. Os símbolos (+) indicam presença e (-) ausência; as letras (a) indicam que o anticorpo secundário usado foi o de partículas de ouro de 5nm e (b) o anticorpo secundário de partículas de ouro de 40nm.	17
Tabela 2 – Procedimentos teste. Os símbolos (+) indicam presença e (-) ausência; as letras (a) indicam que o anticorpo secundário usado foi o de partículas de ouro de 5nm e (b) o anticorpo secundário de partículas de ouro de 40nm.	18
Tabela 3 – Resultados quantitativos obtidos da extração da matriz orgânica.	19
Tabela 4 – Resultados da titulação dos anticorpos obtidos no teste de ELISA.	21

1. INTRODUÇÃO

A estrutura da concha dos moluscos é um dos bons registos históricos que explica a evolução deste grupo de animais desde o período Câmbrico. Uma vez que possuem um corpo mole, o desenvolvimento de uma estrutura externa calcificada rígida foi absolutamente necessário para suportar os tecidos e protegê-los das pressões ambientais e de predadores. Estas estruturas protetoras exibem uma grande variedade de morfologias mas na maioria dos casos apresentam-se sob uma forma verdadeiramente rígida, a concha. No total, mais de 100.000 espécies vivas de moluscos segregam concha (Marin and Luquet, 2004). A sua construção começa logo nos primeiros estágios de desenvolvimento dos moluscos e o crescimento é mais ou menos contínuo durante todo o período de vida (Marin and Luquet, 2005).

De facto, na classe dos bivalves os cristais que constituem a concha podem apresentar diferentes tipos de morfologia e organização proporcionando uma grande variabilidade de microestruturas (Kobayashi and Samata, 2006; Lopes-Lima *et al.*, 2010). No entanto, em todas elas a fase mineral é constituída por carbonato de cálcio e contribui com cerca de 95 a 99% do peso total da concha. Os restantes 1-5% são representados pela matriz orgânica (Miyashita *et al.*, 2000; Duplat *et al.*, 2006). Quando observada em corte transversal a concha apresenta diferentes camadas de carbonato de cálcio, normalmente duas, e uma camada orgânica externa, o periostraco, que protege as camadas calcárias da dissolução pela água (Checa, 2000; Marin and Luquet, 2004) (Figura 1). Os polimorfismos mais comuns de mineralização do carbonato de cálcio ocorrem sob a forma de cristais de calcite e/ou aragonite (Weiner, 1983; Checa *et al.*, 2007). Na família Unionidae os bivalves apresentam duas camadas calcificadas constituídas apenas por aragonite (Marie *et al.*, 2007). Já as famílias Pinnidae e Pteriidae são caracterizadas por apresentarem uma camada calcificada sob a forma de calcite, geralmente a camada mais externa, e outra formada por cristais de aragonite (Marin *et al.*, 2001; Caiping *et al.*, 2005). Das camadas conhecidas, a camada nacarada, camada interna de constituição aragonítica, tem sido apreciada desde a antiguidade pela sua beleza e nos últimos 150 anos tem sido estudada cientificamente (Cartwright, 2007).

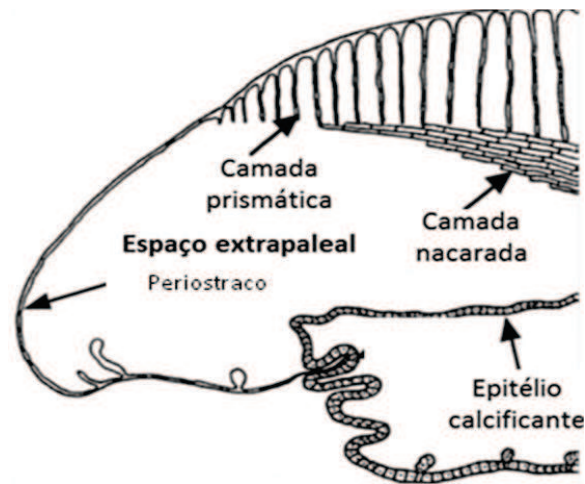


Figura 1 – Representação esquemática de uma concha de bivalve constituída por três camadas sendo duas delas calcificadas (prismática e nacarada) e uma orgânica (periostraco) (Marin and Luquet, 2004).

Apesar de a calcificação ocorrer fora dos tecidos vivos, esta não está em contacto nem depende do meio externo. Este processo depende apenas de três componentes: um compartimento fechado onde a calcificação possa ocorrer, transporte iónico membranar e uma matriz orgânica extracelular (Moura *et al.*, 2003a, Marin and Luquet, 2004; Addadi *et al.*, 2006). O compartimento fechado denominado espaço extrapaleal (ver figura 1) é delimitado pela concha, periostraco e epitélio calcificante. Este isolamento é fundamental para que se proporcione um ambiente supersaturado, requisito essencial para a ocorrência da formação de cristais.

A partir de estudos realizados desde 1988 por Machado, J. e colaboradores foi descrito pela primeira vez um modelo de transporte iónico no epitélio externo do manto (EEM) de *Anodonta cygnea* que associado a estudos morfológicos e ultraestruturais do manto e da concha permitiu entender de forma mais integrada e detalhada o processo de calcificação e mineralização da concha (Machado *et al.*, 1988; Coimbra *et al.*, 1988; Machado *et al.*, 1990; Lopes-Lima *et al.*, 2008 ; Machado and Lopes-Lima, 2011). Segundo este modelo a mobilização do cálcio para a concha está suportada pelo fenómeno de acidificação metabólica e respiratória interna no período de primavera-verão promovendo a dissolução de numerosas micropérolas de carbonato e de fosfato de cálcio no manto e brânquia. Este processo causará um gradiente elevado de cálcio através do EEM, dirigido para a concha, que associado à sua elevada permeabilidade se revela um mecanismo adequado à formação e crescimento da concha. O modelo de transporte

iónico então proposto foi corroborado posteriormente na íntegra por Hudson *et al.* (1992) em *Unio complanata*. A fixação de cálcio na concha torna-se possível graças à secreção pelo EEM de estruturas moleculares específicas que determinam na concha o tipo de microestrutura nacarada. A deposição calcária abrandará, a partir do Outono, à custa de um transporte ativo de prótons para o fluido extrapaleal que o irá acidificar dificultando assim posteriores precipitações de carbonato de cálcio.

A matriz orgânica é secretada por células do epitélio especializadas e consiste numa mistura complexa de proteínas, glicoproteínas, proteoglicanos e quitina (Pereira-Mouriès *et al.*, 2002; Moura *et al.*, 2003b, Marin and Luquet, 2004). Esta matriz desempenha funções essenciais na biomineralização nomeadamente nas interações físico-químicas que envolvem nucleação, seleção polimórfica, crescimento e inibição de cristais (Marxen and Becker, 1997; Levi-Kalisman *et al.*, 2001; Pereira-Mouriès *et al.*, 2002; Gaspard *et al.*, 2008). Recentemente tem sido também proposto que a matriz orgânica poderá ter um papel importante em funções enzimáticas e poderá estar envolvida na sinalização celular (Marin *et al.*, 2007). De acordo com o processo de extração, a matriz orgânica divide-se em solúvel e insolúvel na respetiva solução aquosa usada no procedimento (Machado *et al.*, 1991; Miyashita *et al.*, 2000; Pereira-Mouriès *et al.*, 2002; Caiping *et al.*, 2005; Duplat *et al.*, 2006). A fracção solúvel foi estudada pela primeira vez de uma forma completa em 1972 usando como modelo de estudo o bivalve marinho *Mercenaria mercenaria* (Marxen and Becker, 1997).

Existem várias áreas para as quais é de grande interesse o estudo da matriz orgânica da concha dos moluscos. A primeira é a área que diz respeito diretamente ao conhecimento fundamental sobre a fisiologia dos próprios moluscos. De facto conhecendo bem os componentes que constituem a concha, torna-se mais fácil definir quais as suas funções bem como redefinir o modelo da biomineralização. Uma vez que as famílias apresentam diferentes polimorfismos e microestruturas é também possível estabelecer relações filogenéticas entre as diferentes estruturas mineralizadas e perceber como estas se desenvolveram. A segunda área de interesse, a tecnologia, beneficia deste estudo uma vez que o conhecimento permite a aplicação das proteínas da concha em nanotecnologia para micromanipulação de nanocristais. Podem ainda ser usadas na síntese de materiais e como fatores bioativos naturais, em particular na cirurgia óssea. A

última área com possível interesse neste conhecimento é a área económica, mais concretamente a indústria de pérolas (Marin *et al.*, 2008).

Devido ao aumento de interesse nesta área, o número de técnicas envolvidas no estudo da formação da concha tem vindo a aumentar, permitindo obter um conhecimento mais completo. Técnicas de visualização descritivas, como microscopia eletrónica de varrimento (SEM), de transmissão (TEM e cryo-TEM) e raios-X e técnicas analíticas como cromatografia de troca iónica e eletroforese em sistema SDS-PAGE têm sido usadas de forma regular (Marxen and Becker, 1997; Levi-Kalishman *et al.*, 2001; Addadi *et al.*, 2006; Gaspard *et al.*, 2008). No entanto, com o avanço de técnicas analíticas na área da biologia molecular novas portas se abriram que permitiram obter um novo conhecimento. Uma das técnicas recentemente aplicadas a este campo de investigação foi a construção de bibliotecas de ADN complementar que foram posteriormente sondadas com anticorpos. Esta técnica é uma mais-valia porque permite conhecer os genes responsáveis pela produção da matriz orgânica quando não há sondas de oligonucleótidos conhecidas (Marin *et al.*, 2003). O conhecimento do gene permite não só obter a sequência da proteína correspondente como efetuar estudos ao nível da expressão génica. Foram também aplicadas com sucesso bibliotecas subtrativas específicas para células responsáveis pela formação da matriz orgânica do nacre bem como a técnica de RACE-PCR (Duplat *et al.*, 2006).

Um dos muitos bivalves sobre os quais se sabe muito pouco sobre a matriz orgânica é o bivalve de água doce *Anodonta cygnea*. Este bivalve mais conhecido por Almeijão ou Almeijão-grande pertence à família Unionidae e o seu nome comum deriva do grande tamanho da concha, geralmente mais de 15cm. Para além do elevado tamanho, a concha é oval e alongada, geralmente amarela, castanha ou verde (Nobre, 1930; Reis, 2006) (Figura 2).

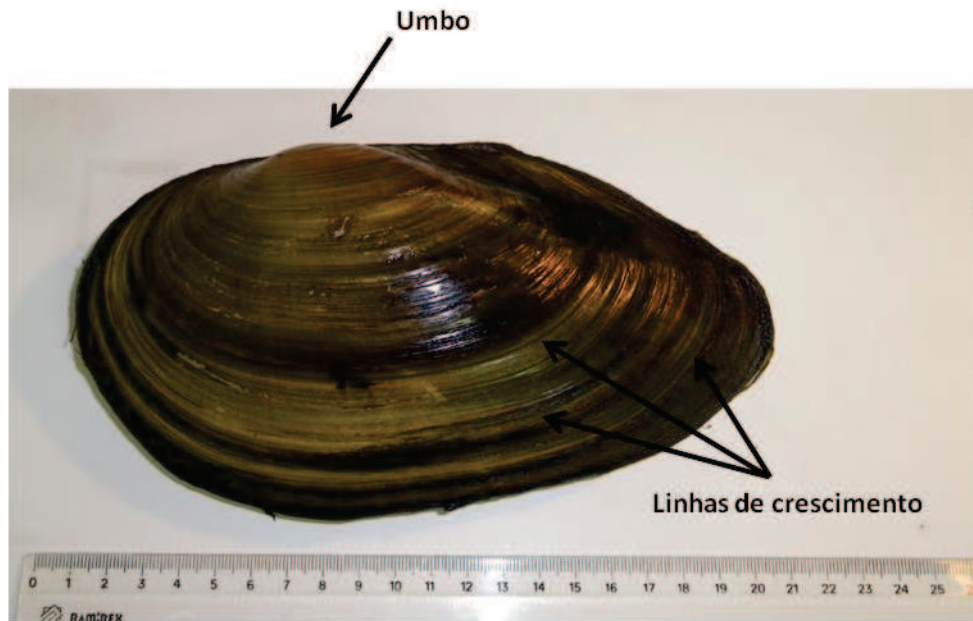


Figura 2 – Superfície externa da valva esquerda do bivalve *Anodonta cygnea*.

Esta espécie encontra-se apenas em lagoas de grandes dimensões mas pouco profundas e a sua distribuição pela lagoa, embora seja ao acaso, está muitas vezes associada a vegetação aquática ou emergente. Estes bivalves são filtradores e as águas das lagoas onde habitam são muito ricas em nutrientes (Reis, 2006).

Em Portugal existem apenas cinco espécies pertencentes a esta família, no entanto a espécie *Anodonta cygnea* tem uma distribuição muito restrita. Encontra-se apenas na bacia hidrográfica do rio Vouga, mais especificamente nas lagoas da Barrinha, Mira e Pateira de Fermentelos (Figura 3). Esta distribuição tão restrita poderá dever-se sobretudo à elevada pressão humana sob a forma de pesca, extração de inertes e poluição (Reis, 2006).

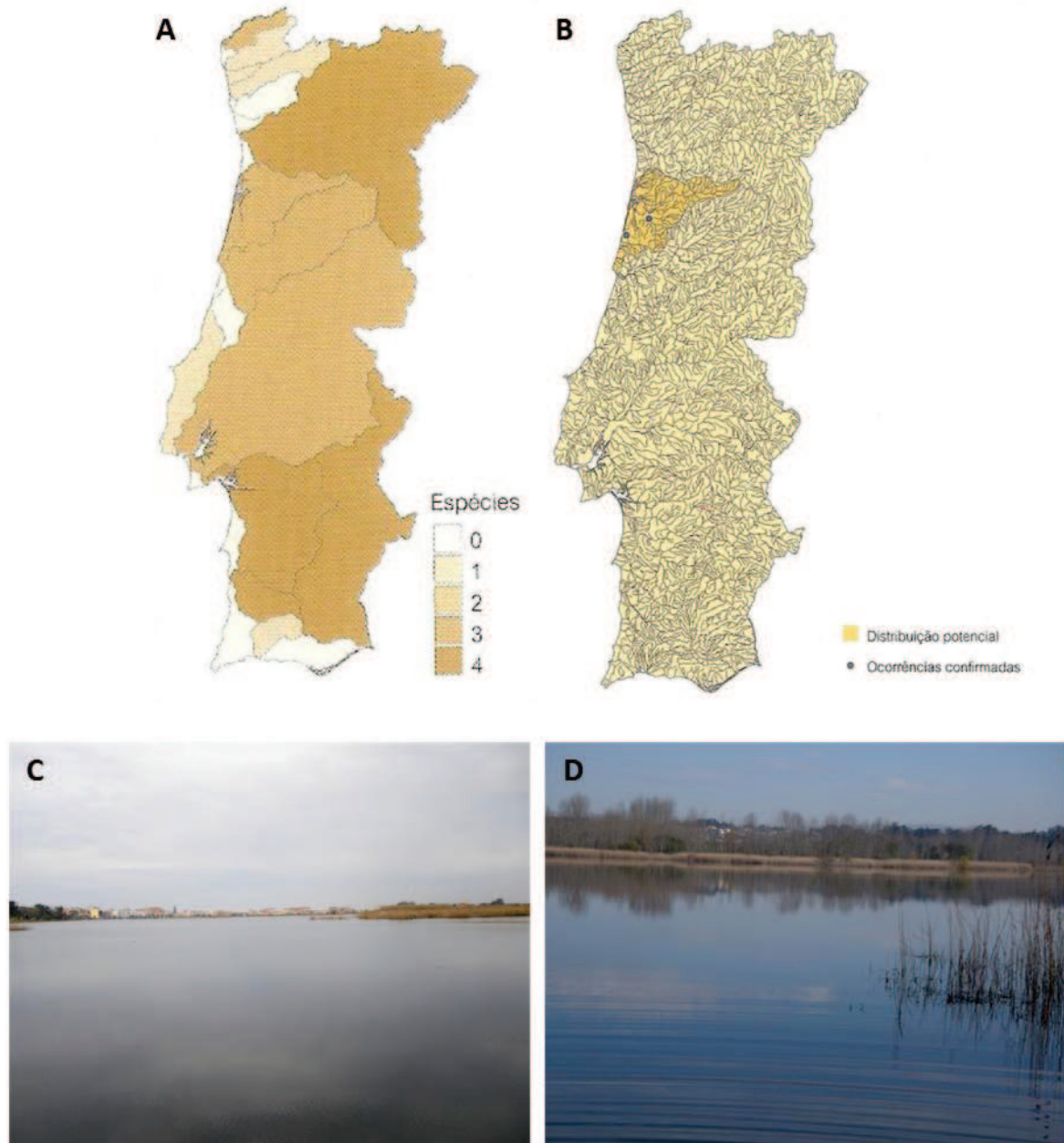
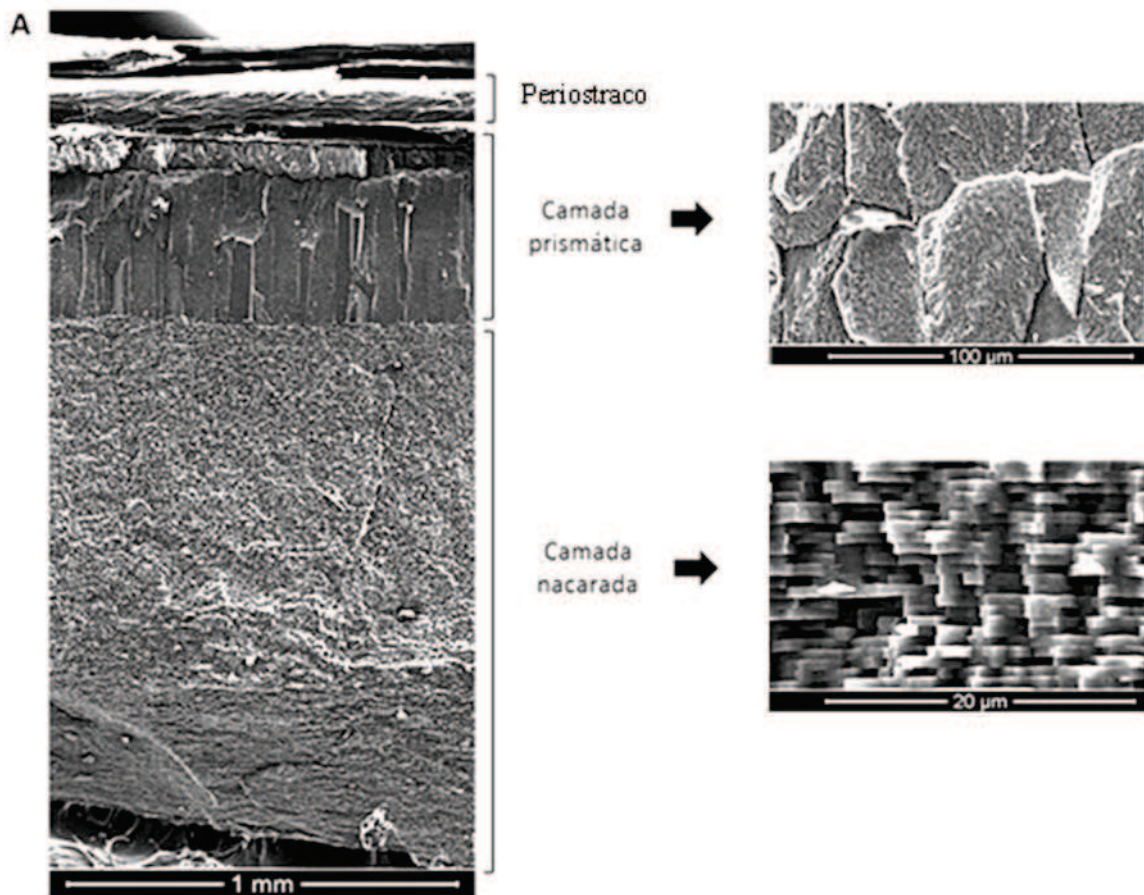


Figura 3 – Nos mapas, diversidade da ordem Unionidae (A) e distribuição da espécie *Anodonta cygnea* (B) (Reis, 2006). Fotos de dois locais de ocorrência confirmada da espécie: Lagoa de Mira (C) e Pateira de Fermentelos (D).

A concha do bivalve *Anodonta cygnea* é formada por carbonato de cálcio na forma de cristais de aragonite e apresenta as três camadas já referidas anteriormente, periostraco e duas camadas calcificadas, a camada prismática e a nacarada (Cartwright, 2007) (Figura 4). Existem ainda poucos estudos sobre a matriz orgânica da concha desta espécie. O pouco que se conhece é ao nível estrutural, do arranjo e interligação entre os cristais e a matriz orgânica (Machado *et al.*, 1991; Cartwright, 2007). Pouco se sabe no

entanto sobre as características inerentes a cada componente da matriz orgânica bem como sobre as suas funções. No entanto, é provável que o que acontece nesta espécie não seja muito diferente do que se observa nas espécies da mesma família que já foram estudadas.



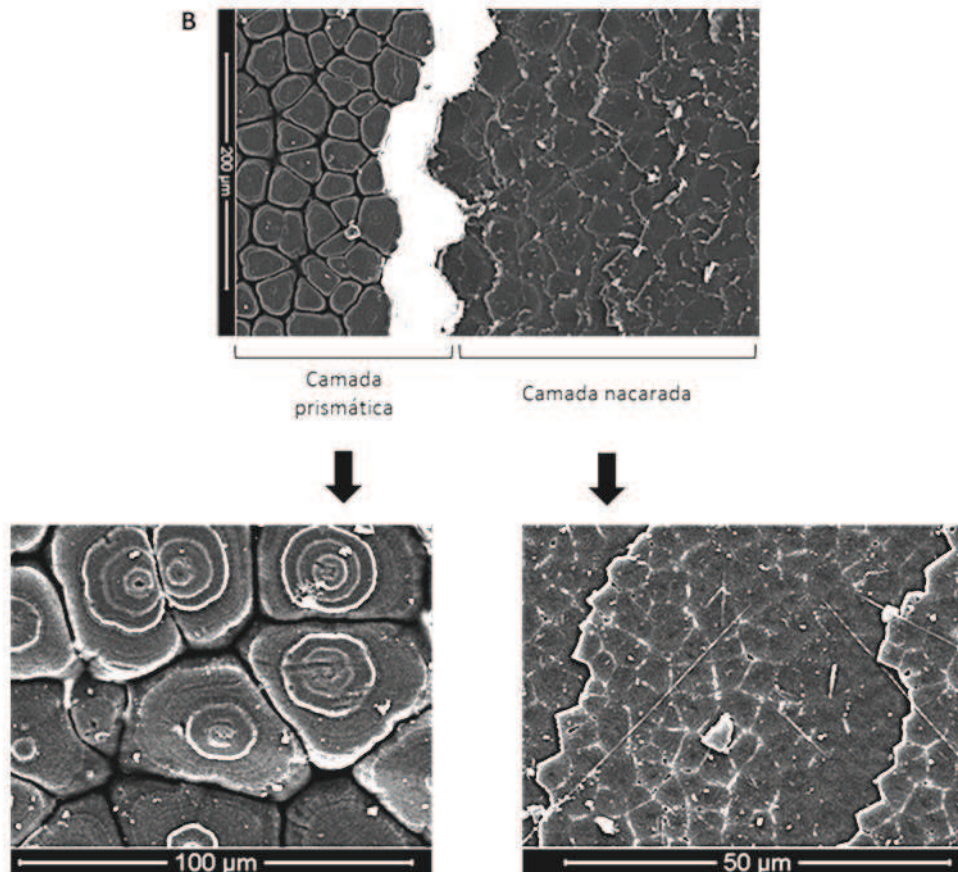


Figura 4 – Imagens de SEM da concha de *Anodonta cygnea* vistas em modo de eletrões secundários. (A) Corte transversal onde se observam as três camadas, (B) observação da superfície externa da valva previamente tratada para remoção do periostracum facilitando assim a visualização dos prismas.

2. OBJETIVOS

Neste trabalho pretende-se obter um conhecimento mais profundo sobre a matriz orgânica solúvel da camada nacarada do bivalve *Anodonta cygnea*. O estudo será feito recorrendo a técnicas clássicas, como a eletroforese, onde se pretende saber que frações orgânicas existem e qual o seu peso molecular e também recorrendo a técnicas moleculares onde será construída uma biblioteca de ADN complementar a partir do ARN mensageiro do epitélio calcificante que é neste caso o folheto externo do manto, tecido que se encontra junto à concha. Esta biblioteca será uma ferramenta de extrema importância para estudos futuros. Finalmente, e recorrendo a anticorpos, é também objetivo localizar a fração orgânica diretamente na concha.

3. METODOLOGIA

3.1 – Exemplos

As conchas e o manto utilizados neste trabalho pertencem ao bivalve *Anodonta cygnea* colhido na Lagoa de Mira, Praia de Mira, distrito de Coimbra (40°26.712N, 8°47.817W).

3.2 – Extração da matriz orgânica da camada nacarada

A primeira etapa da extração da matriz orgânica consistiu em submergir as conchas em solução diluída de hipoclorito de sódio (0,2g cloro ativo/100ml) durante cerca de 24 horas (Marin *et al.*, 2001). No dia seguinte as conchas foram lavadas com água destilada e submergidas em solução de hidróxido de sódio 10% também durante pelo menos 24 horas (Caiping *et al.*, 2005). De seguida as conchas foram novamente lavadas com água destilada e deixadas a secar à temperatura ambiente. Durante o processo de secagem a camada prismática começou a destacar-se sendo este processo de destacamento complementado com ação mecânica nas zonas das linhas de crescimento onde o destacamento natural foi mais fraco. Nem sempre foi possível remover toda a camada prismática com um único banho de hidróxido de sódio, tendo por vezes de ter sido repetido várias vezes. No final desta etapa a camada nacarada estava perfeitamente isolada.

Na segunda etapa a camada nacarada foi fragmentada por ação mecânica em pedaços o mais pequeno possível. Destes foram pesados cerca de 90g que foram de seguida colocados num gobelé de 2L ao qual se adicionaram 1,2L de solução de ácido acético a 10%. A mistura ficou em constante agitação, a 4°C durante 3 dias. A amostra foi centrifugada durante 30min a 11000r.p.m. a uma temperatura de 4°C (Kubota KR-20000T, rotor RA-3R). O pelet foi desprezado e o sobrenadante filtrado em sistema de vácuo com filtros de membrana de celulose de 0,45µm (RC55 Schleicher & Schuell).

O volume inicial da amostra foi concentrado por ultrafiltração (Stirred Ultrafiltration Cell, 8400, Millipore) a um volume final de cerca de 30ml (Caiping *et al.*, 2005). A ultrafiltração foi feita sob pressão, conferida por azoto líquido comprimido, através da passagem por uma membrana de celulose regenerada com um poro de 3KDa (Cat.No.PLBC07610, Millipore). Antes de fazer passar a amostra a membrana foi colocada no sistema com a face brilhante voltada para cima e lavada com água destilada e filtrada durante cerca de 15min. No final da ultrafiltração (volume final da amostra de cerca de 30ml) foi adicionado ao mesmo sistema água desionizada filtrada (cerca de 2L) para proceder à ultradiálise. O princípio e o objectivo são os mesmos da diálise convencional apenas não se faz através de membranas de diálise. Neste caso a amostra foi dialisada para eliminar iões de cálcio, carbonato (originais da concha) e acetato (procedente do processo inicial de extração). Este processo terminou quando após a adição de todo o volume de água ficou no sistema apenas 30ml. Este volume foi cuidadosamente coletado do sistema, sem passar pela membrana, e guardado num falcon de 50ml estéril previamente tarado. A amostra foi posteriormente congelada a -80°C e liofilizada. O pó resultante da liofilização foi pesado.

3.3 – Quantificação e análise por SDS-PAGE da matriz orgânica extraída

As amostras liofilizadas foram ressuspendidas em 1ml de tampão PBS (0.137M NaCl, 0.0027M KCl, 0.01M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.00176M KH_2PO_4 , pH 7.4) e a quantidade de proteínas totais quantificada pelo método de Bradford (Bradford, 1979). As alíquotas usadas no teste de quantificação foram diluídas 50× com tampão PBS. A curva padrão utilizada compreendeu concentrações de solução de BSA entre 0-0,900mg/ml.

Para além das proteínas totais quantificaram-se também os GAGs totais pelo método de Whiteman (Whiteman, 1973) com alterações. Depois da adição do reagente com Alcian blue, os padrões e amostras incubaram à temperatura ambiente durante 4h. Cada passo para isolamento do pelet foi efetuado com centrifugação a 2000g, 20min. O pelet final foi ressuspendido em 1ml de solução de SDS a 7.5%, na qual ficou a incubar 30min à temperatura ambiente antes de ser lida a absorvância a 678nm (Genesys20,

ThermoSpectronic). As amostras foram diluídas 20× e a curva padrão compreendeu concentrações de solução de condroitina-4-sulfato entre 0-0,2mg/ml.

A matriz orgânica foi analisada quanto ao seu peso molecular e número de frações em SDS-PAGE, em sistema de mini gel (HoeferTM SE 260). A corrida foi feita em gel descontínuo, ou seja, o gel resolvente tinha uma concentração de acrilamida de 8% e o gel de empacotamento uma concentração de 5%. Esta diferença facilita a entrada da amostra no gel e a sua concentração antes de entrar no gel resolvente. Também foram testadas as relações entre géis de 10%-7%, 12%-9% e 15%-12%. Em qualquer das resoluções dos géis as amostras foram previamente desnaturadas pela adição de tampão de carregamento (60mM Tris-HCl pH6.8, 100mM DTT, 2% SDS, 10% glicerol, 0.01% azul de bromofenol, 5% mercaptoetanol) e pelo calor em banho a 100°C, 1min. No primeiro poço foram carregados 5µl de marcador molecular (Cat.No.SDS6H2, Sigma) e nos restantes poços cerca de 15µl de amostra não diluída. Até entrar no gel resolvente a corrida foi feita a 10mA e depois de entrar neste a amperagem foi aumentada para 20mA. Após a saída do tampão de carregamento do gel a corrida foi dada por terminada.

Para visualização das frações proteicas o gel foi corado com Coomassie brilliant blue, com nitrato de prata ou com ambos para comparar. No caso da comparação as amostras correram no mesmo gel em duplicado e no final da corrida este foi dividido ao meio.

Na coloração com Coomassie brilliant blue o gel foi incubado na solução corante (0.1% Brilliant R, 50% metanol, 10% ácido acético glacial) durante 45min com agitação suave e de seguida descorado em solução descorante (15% metanol, 10% ácido acético glacial) durante o tempo necessário para a visualização nítida das bandas.

Para corar o gel com nitrato de prata este ficou primeiro durante a noite em solução de fixação (50% etanol, 12% ácido acético glacial, 0.05% formaldeído), com agitação. No dia seguinte o gel foi lavado com etanol 20% durante 20min mudando o etanol 3× durante esse período de tempo. Seguidamente o gel foi sensibilizado com solução de sensibilização (0.02% tiosulfato de sódio), 2min e lavado com água ultra pura 2× durante 1min. A coloração em prata (0.2% nitrato prata, 0.076% formaldeído) ocorreu durante 20min seguindo-se a lavagem rápida com água durante 20-60seg, 2×. A incubação na solução de desenvolvimento (6% carbonato de sódio, 0.0004% tiosulfato

de sódio, 0.05% formaldeído) durante 2-5min permitiu visualizar as bandas sendo a reação interrompida com solução de ácido acético 12% durante 10min (Gromova and Celis, 2006).

Para verificar se estavam presentes na amostra de matriz orgânica glicoproteínas e proteoglicanos os géis foram para o primeiro caso oxidados com ácido periódico e seguidamente corados com Alcian blue/nitrato de prata; para o segundo caso os géis foram apenas corados com Alcian blue/nitrato de prata (Møller and Poulsen, 2002). Nos géis onde se efetuou a coloração para deteção de glicoproteínas correu também uma amostra de solução de albumina de ovo numa concentração de 2mg/ml, que sendo uma glicoproteína funcionou como controlo positivo. Para a deteção dos proteoglicanos o controlo positivo foi uma amostra de solução de condroitina-4-sulfato também numa concentração de 2mg/ml.

3.4 – Produção de anticorpos policlonais da matriz orgânica da camada nacarada

3.4.1 – Imunização de coelhos

Os anticorpos policlonais foram produzidos em 2 coelhos (*Oryctolagus cuniculus*). De cada coelho foram colhidos para tubos de vidro, através da orelha, 10ml de sangue para obtenção de soro pré-imune. Para obter somente o soro o sangue foi deixado a repousar umas horas à temperatura ambiente e depois durante 24h a 4°C. Durante este período o soro separou-se dos componentes sanguíneos ficando na parte superior, sendo então colhido para outros tubos de vidro e guardado a -20°C.

Na primeira imunização foi injetado em cada coelho 1ml de amostra em que 500µl eram amostra de matriz orgânica diluída em tampão PBS de forma a ficar com uma concentração de 100µg/500µl e os restantes 500µl adjuvante de Freud completo (F5881, Sigma). A amostra foi administrada subcutaneamente na zona do pescoço e distribuída por 3 sítios para evitar uma reação demasiado adversa. Depois de 4 semanas colheu-se de cada coelho 5ml de sangue e procedeu-se à segunda imunização. A quantidade de amostra administrada foi exatamente a mesma mas o adjuvante de Freud completo foi substituído pelo adjuvante de Freud incompleto (F5506, Sigma). As terceiras colheita de sangue e imunização foram feitas passadas mais 3 semanas com adjuvante de Freud

incompleto. A colheita final foi realizada passadas 3 semanas da terceira imunização. Foram colhidos de cada coelho cerca de 25ml de sangue.

3.4.2 – Teste ELISA

Os soros obtidos no momento da segunda e da terceira imunização bem como os soros finais foram submetidos a um teste ELISA. Neste teste as microplacas de 96 poços foram em primeiro lugar deixadas a incubar com 50µl de tampão coating (amostra de matriz orgânica diluída em tampão PBS para uma concentração final de 10µg/ml) durante a noite a 4°C. No dia seguinte retiraram-se as placas da temperatura de 4°C e deixaram-se à temperatura ambiente durante alguns minutos. De seguida as placas foram lavadas 3× com tampão PBS e saturadas com 200µl/poço de solução de BSA 1% feita em tampão PBS durante 1h à temperatura ambiente. Lavaram-se novamente as placas 3× com tampão PBS e adicionou-se então a cada poço 50µl da respetiva diluição de soro (diluído em solução de BSA 1%). Após uma incubação de pelo menos 2h à temperatura ambiente as placas foram novamente lavadas com tampão PBS, 5×. Fez-se de seguida a adição em cada poço de 50µl do anticorpo marcado com a peroxidase (Rabbit IgG, Horseradish Peroxidase-linked whole antibody, GE Healthcare) diluído 1:1000 em solução de BSA 1%, o qual esteve a incubar durante 1h à temperatura ambiente. Seguiu-se a lavagem com tampão PBS, 5× e a adição de 100µl/poço de substrato (5mg de OPD em 10ml de tampão ELISA – 0.1M ácido cítrico, 0.2M Na₂HPO₄·2H₂O, pH5.6). A reação com o substrato ocorreu durante 20min à temperatura ambiente e foi interrompida pela adição de 50µl/poço de solução de SDS a 10%. A leitura da placa fez-se num leitor de placa (ELx808, BIO-TEK) a um comprimento de onda de 450nm.

3.4.3 – Purificação das IgG

A purificação das IgG foi feita através da passagem da amostra por uma coluna de cromatografia de proteína G (GE Healthcare) com a ajuda de uma bomba peristáltica. Depois do sistema montado passaram pela coluna 15ml de tampão de ligação e de

seguida 5ml de amostra de soro diluída 1:1 com tampão de ligação (20mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, pH7). A amostra foi repassada novamente pela coluna seguida pela passagem de mais 10ml de tampão de ligação. No final passou pela coluna tampão de eluição (0.1M Glicina-HCl, pH2.7) do qual o primeiro ml recolhido foi desprezado. Colheu-se então para um falcon de 15ml estéril que já continha 550 μl de 1M Tris-HCl, pH9 (55 μl /ml de amostra colhido) 10ml de tampão de eluição.

Os 10ml de amostra foram dialisados contra 1L de tampão PBS através de membranas de diálise de 25KDa (Cat.No.2550-40, Membrane Filtration Products, Inc.) a 4°C, com agitação, durante a noite. No final da diálise a amostra foi colhida para um novo falcon de 15ml estéril e centrifugada a 2000r.p.m. durante 10min a 4°C (Kubota KR-20000T, rotor RA-3R). O sobrenadante foi dividido em aliquotas e guardado a -20°C até ser utilizado.

3.4.4 – Quantificação das IgG e teste do Dot-Blot

As IgG purificadas pré e pós-dialisadas foram quantificadas pelo método de Bradford sendo previamente diluídas 10 \times com 1M Tris-HCl, pH9.

Os anticorpos foram também testados em Dot-Blot (R&D SYSTEMS). O teste foi realizado numa tira de membrana de celulose (Hybond ECL RPN203D, Amersham Biosciences) onde foi desenhada uma grelha de 2 quadrados. Foram colocados em cada quadrado 4 μl de amostra de matriz orgânica da camada nacarada previamente diluída 10 \times com tampão PBS. A membrana ficou a secar durante toda a noite à temperatura ambiente. No dia seguinte colocou-se a membrana a incubar com solução bloqueadora (solução de leite em pó magro a 5% em tampão TPBS - 0.137M NaCl, 0.0027M KCl, 0.01M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.00176M KH_2PO_4 , 0.05% Tween 20, pH 7.4) durante 1h, à temperatura ambiente, com agitação. De seguida incubou com o anticorpo policlonal produzido nos coelhos diluído 1,5:1000 com solução bloqueadora, 1h30min, à temperatura ambiente e com agitação. Seguiu-se uma lavagem da membrana de 3 \times 5min com tampão TPBS e a incubação com o anticorpo secundário (Rabbit IgG, Horseradish Peroxidase-linked whole antibody, GE Healthcare) diluído 1:5000 com solução bloqueadora nas mesmas condições que o anticorpo primário. A membrana foi depois lavada com tampão TPBS 1 \times 15min,

2×1,5min e depois com tampão PBS 1×5min. O último passo consistiu na incubação da membrana com os reagentes de detecção (Amersham ECL Western blotting detection reagents and analysis system RPN2108, GE Healthcare) durante 1min, na passagem do sinal da membrana para um filme (Amersham Hyperfilm™ ECL, GE Healthcare) através de uma cassette (Hypercassette™ RPN11645, GE Healthcare) e na revelação do filme.

3.5 – Construção de biblioteca de ADN complementar

3.5.1 – Extração do ARN total e do ARN mensageiro

Antes de efetuar a extração do ARN todo o material foi tratado de modo a eliminar as RNases. O material de vidro foi tratado por calor seco a 180°C durante 3h. O material que não suporta temperaturas tão elevadas foi tratado com solução de DEPC a 0.1% de um dia para o outro e depois autoclavado. As bancadas de trabalho foram também limpas com solução comercial própria (RNase away, Cat.No.10328-011, Invitrogen).

O ARN total foi extraído do folheto externo do manto do bivalve *Anodonta cygnea* através de 2 métodos: kit comercial (UltraClean™ Tissue RNA Isolation Kit, Cat.No. 15000-50, MO BIO) e método clássico de extração com fenol-tiocianato de guanidina-clorofórmio (Sambrook and Russel, 2001). No primeiro método a quantidade inicial de tecido usada foi no máximo de 30mg e no segundo foi em média 1g. Em ambos os casos o tecido foi congelado em azoto líquido e triturado em almofariz para proceder à homogeneização com a solução desnaturante. No método clássico a solução desnaturante não foi feita como indica no protocolo mas comprada já preparada (Denaturation Solution for the isolation of ARN, Cat.No.30911, Fluka) tendo apenas o cuidado de lhe adicionar o 2-mercaptoetanol.

O ARN extraído foi submetido a teste de controlo de qualidade através de eletroforese em gel de agarose desnaturante a 1.2%, conforme recomendado no kit de extração comercial. O gel foi visualizado no equipamento Molecular Imager® Gel Doc™ XR Imaging System com o programa Quantity One 4.6.7, da BIO RAD. Além da qualidade verificou-se também a quantidade em Nanodrop (NanoDrop 1000 3.7.0, Thermo Scientific) usando apenas 1.5µl de amostra.

O ARN mensageiro foi extraído a partir do ARN total usando um kit comercial (GenElute™ mRNA Miniprep Kit, MRN10, Sigma) e quantificado em Nanodrop.

3.5.2 – Construção de biblioteca

A construção de bibliotecas envolveu 3 etapas essenciais e todas foram realizadas através do uso de kits comerciais.

Para a primeira etapa foi usado o kit comercial cDNA Synthesis Kit, Cat.No.200401 da Agilent Technologies que envolveu a síntese da 1ª e 2ª cadeia de ADN complementar, modificação dos terminais, ligação de adaptadores *EcoRI*, fosforilação dos terminais *EcoRI* e digestão com *XhoI*. O procedimento foi seguido conforme o protocolo excepto no facto de que não foram usados nucleótidos marcados com radioisótopos e na separação dos fragmentos de ADN por tamanho, separação feita em colunas comerciais (cDNA size fractionation columns Cat.No.18092-015, Invitrogen) e não preparadas em laboratório conforme indicação do kit.

A segunda etapa consistiu na inserção dos fragmentos do ADN complementar no vetor e não houve alterações às indicações do kit usado (ZAP Express Predigested *EcoRI*/*XhoI*/CIAP-Treated Vector Kit, Cat.No.239213, Agilent Technologies).

A última etapa consistiu no empacotamento do vetor em extracto de bacteriófagos, teste de IPTG/X-Gal e amplificação das bibliotecas. Para esta etapa foi usado o kit comercial Gigapack III Gold Packaging Extract, Cat.No.200201 da Agilent Technologies, sem alterações ao protocolo.

3.6 – Identificação da matriz orgânica na camada nacarada pela técnica de “Immunogold”

Esta técnica é baseada na especificidade dos anticorpos para o seu antigénio. A diferença deste procedimento para um western blotting ou Dot-blot é que o anticorpo secundário é marcado com partículas de ouro que podem ser amplificadas pela ligação de iões de prata. Neste trabalho foram usados anticorpos secundários marcados com partículas de ouro de 5nm (Anti-Rabbit IgG – Gold antibody produced in goat, affinity

isolated antibody, aqueous glycerol suspension, 5nm, Cat.No.G7277, Sigma) e de 40nm (EM Goat anti-Rabbit IgG 40nm Gold, Cat. EM.GAR 40, BBIInternational). Outra grande diferença é o facto de o resultado só ser visível por microscopia eletrónica de varrimento (SEM).

Para efetuar este teste foi necessário em primeiro lugar fragmentar a camada nacarada em pedaços pequenos e tratá-los em solução de EDTA 1%, pH7.5 durante 2-3min, com agitação (Marin *et al.*, 2007). O EDTA devido á sua natureza complexante sequestra os iões cálcio expondo a matriz orgânica.

No procedimento completo os fragmentos foram primeiro incubados durante 30min à temperatura ambiente em solução de gelatina a 1% em tampão TBS (50mM Tris, 150mM NaCl, pH7.5). De seguida ficaram a incubar durante a noite a 4°C com o anticorpo primário (anticorpo policlonal produzido no ponto 2.4) diluído 1:3000 em solução de gelatina a 1% em tampão TTBS (50mM Tris, 150mM NaCl, 0.05% Tween 20, pH7.5). No dia seguinte os fragmentos foram lavados com tampão TTBS 4×10min e incubados com o anticorpo secundário diluído 1:400 em solução de gelatina a 0.5% em tampão TTBS durante 2h. Os fragmentos foram novamente lavados com tampão TTBS 4×10min e com água ultra pura. De seguida os fragmentos foram incubados com os reagentes do kit de amplificação de sinal com prata (Silver Enhancer Kit, SE100, Sigma) durante 10min, lavados com água destilada e fixados com solução de tiosulfato de sódio a 2.5%, 2-3min. No final foram novamente lavados com água destilada e secos a 50°C (Marin *et al.*, 2007). Este foi o procedimento geral mas nem todos os fragmentos seguiram estes passos. Procederam-se ainda a várias situações controlo (Tabela 1).

Tabela 1 – Procedimentos controlo. Os símbolos (+) indicam presença e (-) ausência; as letras (a) indicam que o anticorpo secundário usado foi o de partículas de ouro de 5nm e (b) o anticorpo secundário de partículas de ouro de 40nm.

Controlo	Anticorpo primário	Anticorpo secundário	Amplificação com prata
1	+	-	-
2	+	-	+
3	Soro pré-imune	+ (a)	+
4	Soro pré-imune	+ (b)	+
5	Soro pré-imune	+ (b)	-
6	-	-	+

Os fragmentos teste também foram testados em diferentes condições (Tabela 2).

Tabela 2 – Procedimentos teste. Os símbolos (+) indicam presença e (-) ausência; as letras (a) indicam que o anticorpo secundário usado foi o de partículas de ouro de 5nm e (b) o anticorpo secundário de partículas de ouro de 40nm.

Teste	Anticorpo primário	Anticorpo secundário	Amplificação com prata
1	+	+ (a)	+
2	+	+ (b)	+
3	+	+ (b)	-

Tentou-se também por esta técnica localizar na concha a quitina. Este procedimento só deferiu do anteriormente descrito no anticorpo primário. Neste caso os anticorpos primários específicos para a quitina não foram produzidos no laboratório mas sim adquiridos comercialmente. As diluições testadas foram as sugeridas pelo fabricante (Anti-chitin Binding Domain, PM015, MBL Laboratories; Anti-chitin Binding Domain Serum, Cat.No.0121001, BioLabs).

No final dos procedimentos os fragmentos foram colados em suportes de alumínio próprios para SEM, revestidos por vaporização a carbono e observados com o equipamento FEI QUANTA 400 FEG ESEM/EDAX PEGASUS X4M no Centro de Materiais da Universidade do Porto (CEMUP).

4. RESULTADOS

4.1 – Matriz orgânica da camada nacarada da concha

Depois do tratamento com solução de hipoclorito de sódio e com solução de hidróxido de sódio a 10% efetuado na concha foi possível obter a camada nacarada perfeitamente isolada (Figura 5).

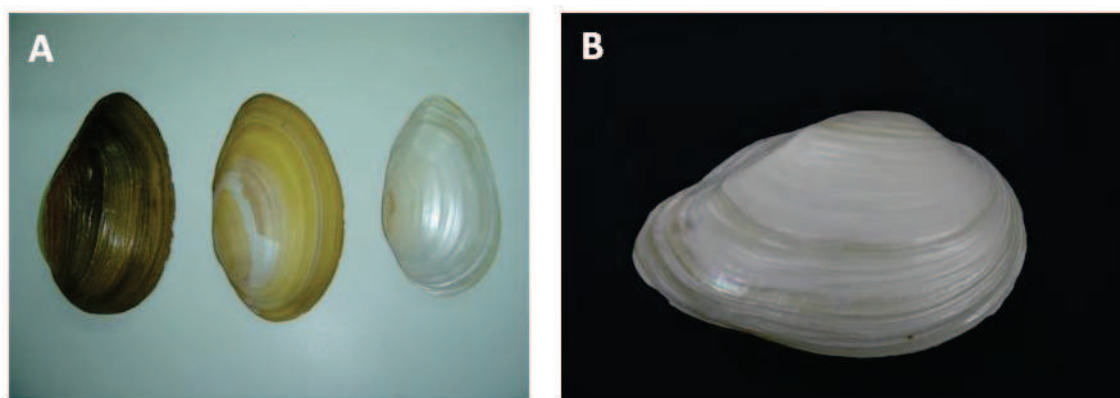


Figura 5 – Valvas da concha de *Anodonta cygnea*. (A) Da esquerda para a direita: valva natural; valva após tratamentos onde se vê a ausência do periostraco e zonas com e sem camada prismática; valva apenas com camada nacarada. (B) Pormenor de valva apenas com camada nacarada.

Das extrações realizadas foram quantificadas a massa de pó liofilizado, que em teoria será toda a matriz orgânica, as proteínas e GAGs existentes na amostra ressuspendida em tampão PBS e foi calculada a percentagem (w/w) de matriz orgânica existente na amostra inicial. Os resultados estão apresentados na tabela 3.

Tabela 3 – Resultados quantitativos obtidos da extração da matriz orgânica.

Amostra	Massa total da amostra inicial (g)	Massa produto orgânico final liofilizado (g)	% (w/w) de matriz orgânica	Concentração proteica (mg/ml)	Concentração GAGs (mg/ml)
1	90	0,0347	0,039	23,32±0,27	3,12±0,11
2	90	0,0476	0,053	13,40±0,35	2,05±0,03

Das várias malhas de gel testadas, a de 8% de acrilamida para o gel resolvente foi a que proporcionou os resultados mais nítidos (Figura 6).

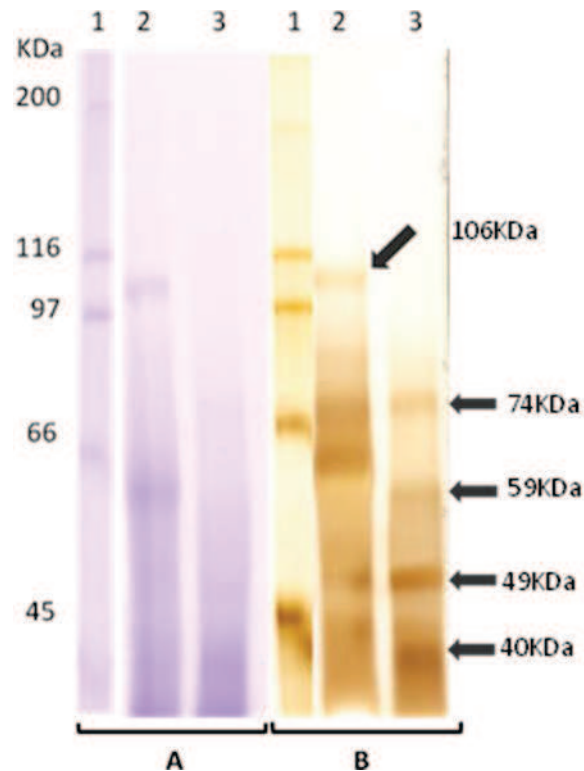


Figura 6 – Mini-SDS-PAGE em gel resolvente de acrilamida a 8% da matriz orgânica extraída da camada nacarada do bivalve *Anodonta cygnea*. Poços com o número (1) marcador molecular, (2) amostra da primeira extração, (3) amostra da segunda extração. (A) metade do gel corada com Coomassie brilliant blue, (B) metade do gel corada com nitrato de prata. As setas indicam a posição das frações proteicas encontradas.

São visíveis no gel pelo menos 5 frações diferentes. A primeira fração tem um peso molecular de cerca de 106 KDa e é facilmente identificada nas duas metades do gel. No entanto, esta fração não está presente, ou pelo menos não é isso que indica a análise do gel, na amostra da segunda extração. A segunda fração apresenta um peso molecular de aproximadamente 74 KDa, está presente nas duas amostras mas não é evidente no gel corado com Coomassie Brilliant Blue. Um pouco mais abaixo com um peso molecular de aproximadamente 59 KDa é visível uma terceira fração na segunda amostra. Na primeira amostra não há uma equivalência perfeita a esta fração no gel corado com nitrato de prata, no entanto na metade corada com Coomassie Brilliant Blue a semelhança é mais evidente pelo que a fração deverá ser a mesma. A quarta fração, de peso molecular

aproximado 49 KDa, e a quinta, de peso molecular de cerca de 40 KDa, são bem evidentes na segunda amostra quando coradas com nitrato de prata. Na primeira amostra não é tão óbvio apesar de aparentar estarem presentes. Na metade do gel corada com Coomassie brilliant blue não é nítida a presença destas frações.

Os resultados da coloração para detecção de glicoproteínas e proteoglicanos não são apresentados já que não foram visíveis quaisquer bandas.

4.2 – Anticorpos policlonais

Os resultados dos testes de ELISA realizados durante a imunização dos coelhos, no total de 3 testes, mostraram que houve uma boa produção de anticorpos, como se pode ver na tabela 4, onde estão representados os títulos (diluição máxima com sinal positivo ao anticorpo) de cada teste e coelho.

Tabela 4 – Resultados da titulação dos anticorpos obtidos no teste de ELISA.

Teste	Coelho 1	Coelho 2
1	1:810	1:90
2	1:65610	1:21870
3	1:590490	1:65610

Pela análise da tabela é fácil perceber que houve aumento de anticorpos entre as imunizações sendo este muito mais significativo no coelho 1. O coelho 2 reagiu menos à presença do antigénio produzindo assim um menor número de anticorpos.

A quantificação dos anticorpos pelo método de Bradford pré e pós-diálise indicou uma quantidade de anticorpos de $1,03 \pm 0,19$ mg/ml e $1,10 \pm 0,06$ mg/ml respetivamente, pelo que não houve perdas durante a diálise.

A afinidade de ligação do anticorpo à matriz orgânica foi testada pelo método de Dot-Blot (Figura 7)

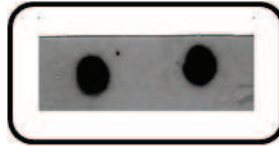


Figura 7 – Resultado do teste de Dot-Blot para a afinidade do anticorpo à matriz orgânica.

A figura mostra uma forte reação entre anticorpo-antigénio uma vez que os pontos estão bastante escuros, pelo que o anticorpo tem elevada afinidade para a matriz orgânica.

4.3 – Biblioteca ADN complementar

A extração do ARN total pelo kit e pelo método clássico foi bem sucedida conforme atesta o gel de agarose (Figura 8).

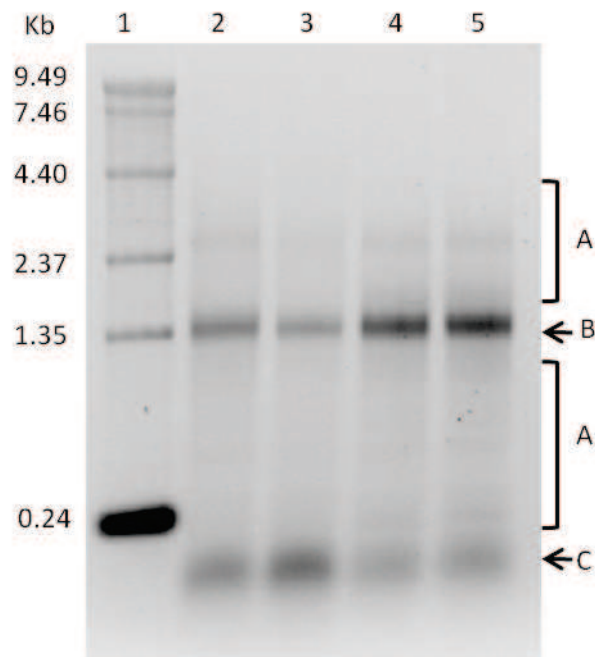


Figura 8 – Gel de agarose desnaturante a 1.2% do ARN total extraído pelo kit comercial (2, 3) e pelo método clássico (4, 5). (1) Marcador molecular, (A) “smear” ARN mensageiro, (B) subunidade ribossomal 18S e (C) ARN de transferência.

Ao contrário da qualidade do ARN total, que foi semelhante nos dois métodos, a quantidade obtida não foi em nada parecida. Na extração com o kit comercial foi obtida uma concentração de $0,25 \pm 0,014$ mg/ml e pelo método clássico uma concentração de $1,23 \pm 0,006$ mg/ml, ou seja, a quantidade de ARN total extraído pelo método clássico foi cerca de 5× superior à extraída pelo kit comercial.

A quantidade de ARN mensageiro extraído a partir do ARN total foi de $160,23 \pm 0,42$ µg/ml.

Para a construção da biblioteca de ADN complementar usaram-se 5 µg de ARN mensageiro, conforme as indicações do kit, e no final obtiveram-se, após a amplificação da biblioteca, 34000 clones recombinantes.

4.4 – “Immunogold”

Os resultados obtidos pela técnica de “Immunogold” estão apresentados nas figuras 9, 10 e 11.

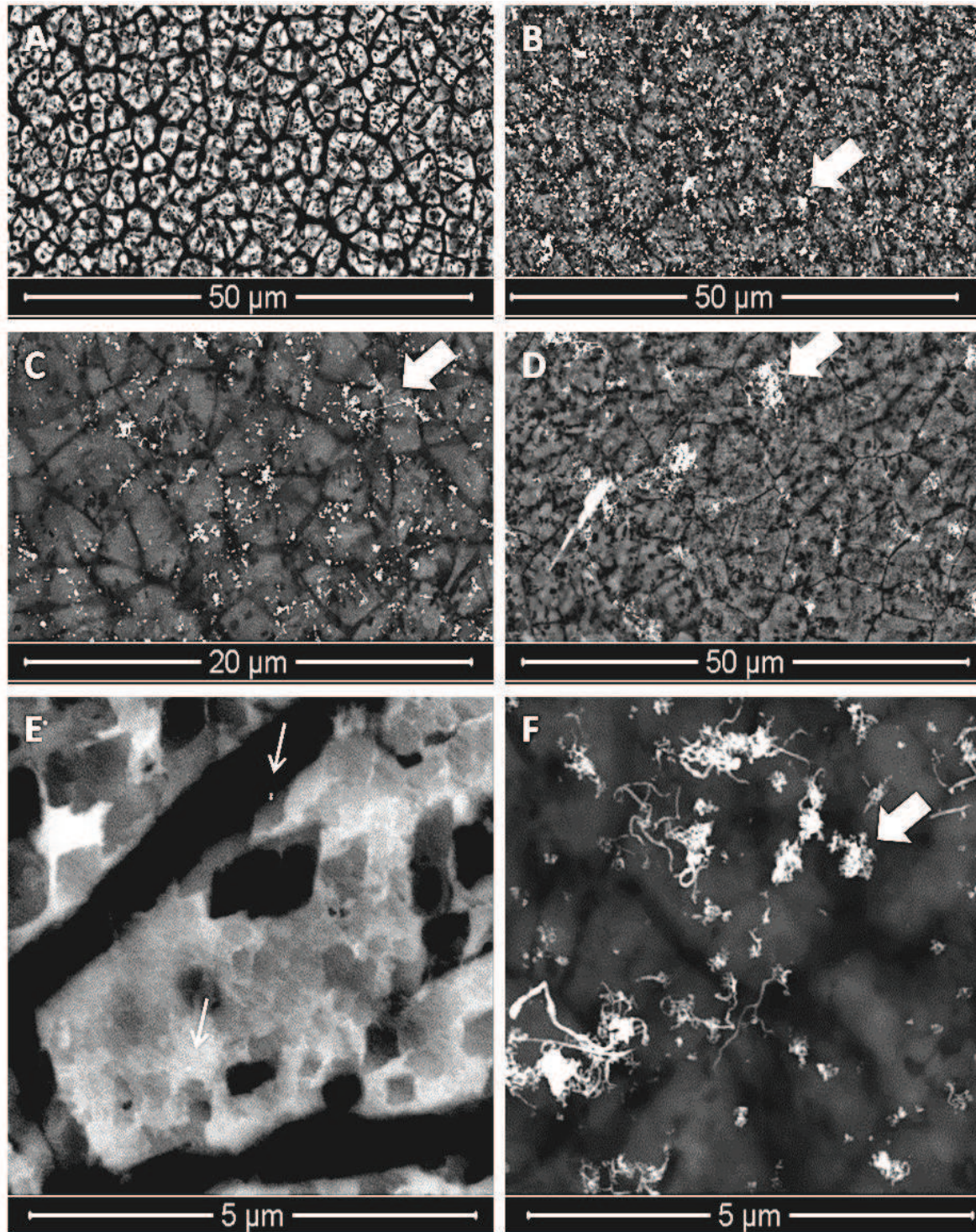


Figura 9 – Resultados de “Immunogold” observados em SEM em modo de elétrons retrodifundidos. Vista superficial. As letras A-F representam, respetivamente, os procedimentos controlo 1-6 descritos na metodologia (tabela 1). As setas largas indicam presença de filamentos de prata e as setas mais finas na figura E indicam a presença de partículas de ouro de 40nm.

Como se pode ver pelas figuras 9B, C, D e F, em todos os controlos submetidos à amplificação por prata é evidente a presença de filamentos de prata ainda que precipitados de forma aleatória. Na figura 9E observam-se algumas partículas de ouro ainda que não seja um número significativo. Estes resultados mostram que embora os 3 componentes necessários para que a ligação ocorra de forma correta (antigénio, anticorpo primário, anticorpo secundário) não estejam presentes, ocorre sinal, quer seja pela presença da prata quer pela presença da partícula de ouro.

A figura 9A é a única que não apresenta qualquer tipo de sinal uma vez que o controlo neste caso não foi submetido a qualquer tipo de substância que pudesse traduzir o sinal, ou seja, não esteve na presença do anticorpo secundário marcado com o ouro nem na presença do nitrato de prata.

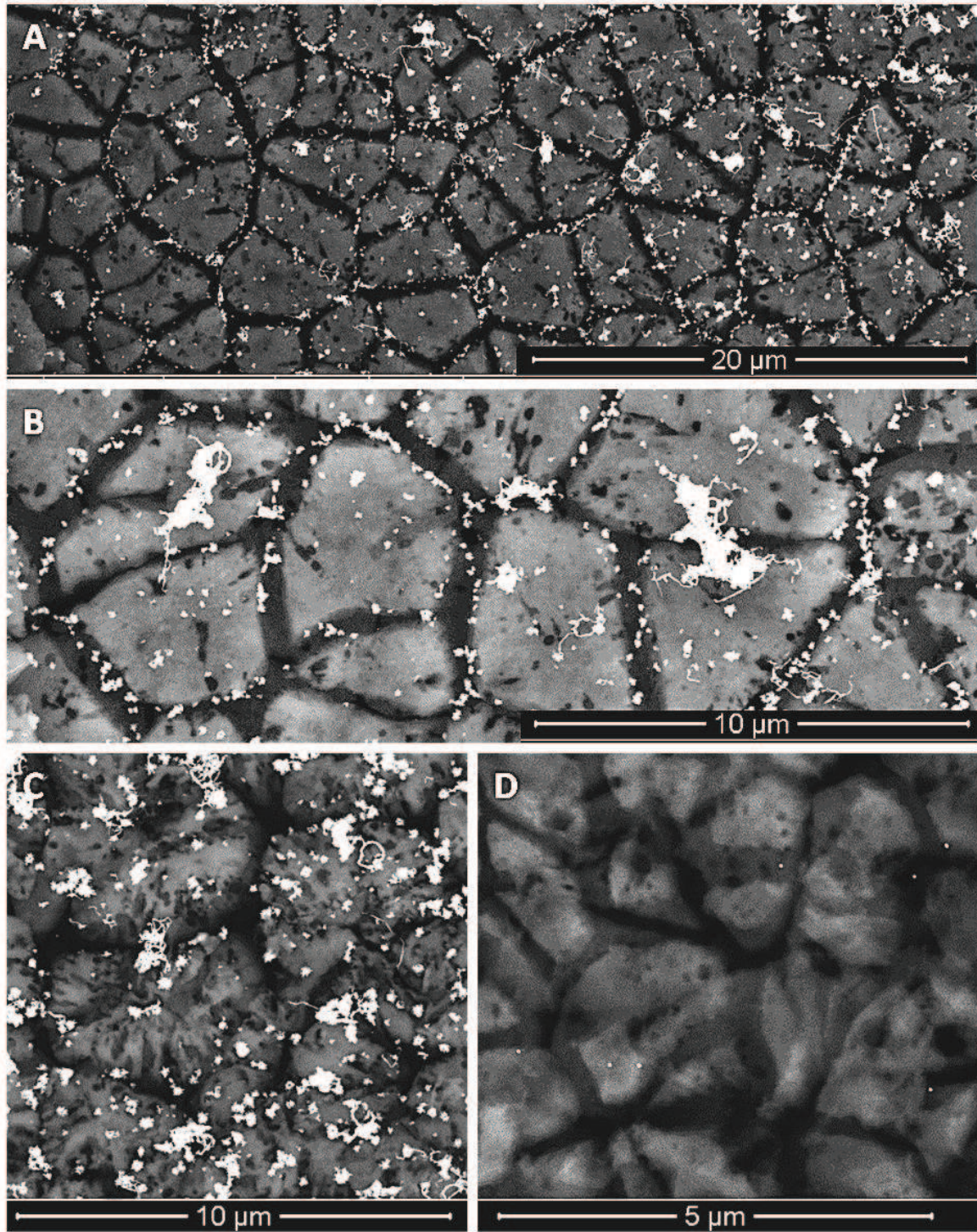


Figura 10 – Resultados de “Immunogold” observados em SEM em modo de elétrons retrodifundidos. Vista superficial. As letras representam os resultados obtidos nos procedimentos teste descritos na metodologia (tabela 2). (A) e (B) representam o teste 1, (C) o teste 2 e (D) o teste 3.

Os resultados apresentados nas figuras 10A e B evidenciam um alinhamento relativamente homogêneo das partículas de prata nas regiões que rodeiam os cristais. No entanto, continua presente a precipitação aleatória de prata sob a forma de filamentos.

Apesar de o teste 2 diferir apenas do 1 no tamanho da partícula de ouro acoplada ao anticorpo secundário, os resultados em nada têm a ver um com o outro. No teste 2 (Figura 10C) não se verifica nenhum alinhamento homogêneo das partículas de prata, apenas se observam os filamentos de prata depositados aleatoriamente.

No teste 3 onde não ocorreu amplificação com prata podem ver-se algumas partículas de ouro à semelhança do que se observou nos resultados do controlo 5 (Figura 9E). A ligação do anticorpo parece assim não traduzir nenhuma especificidade.

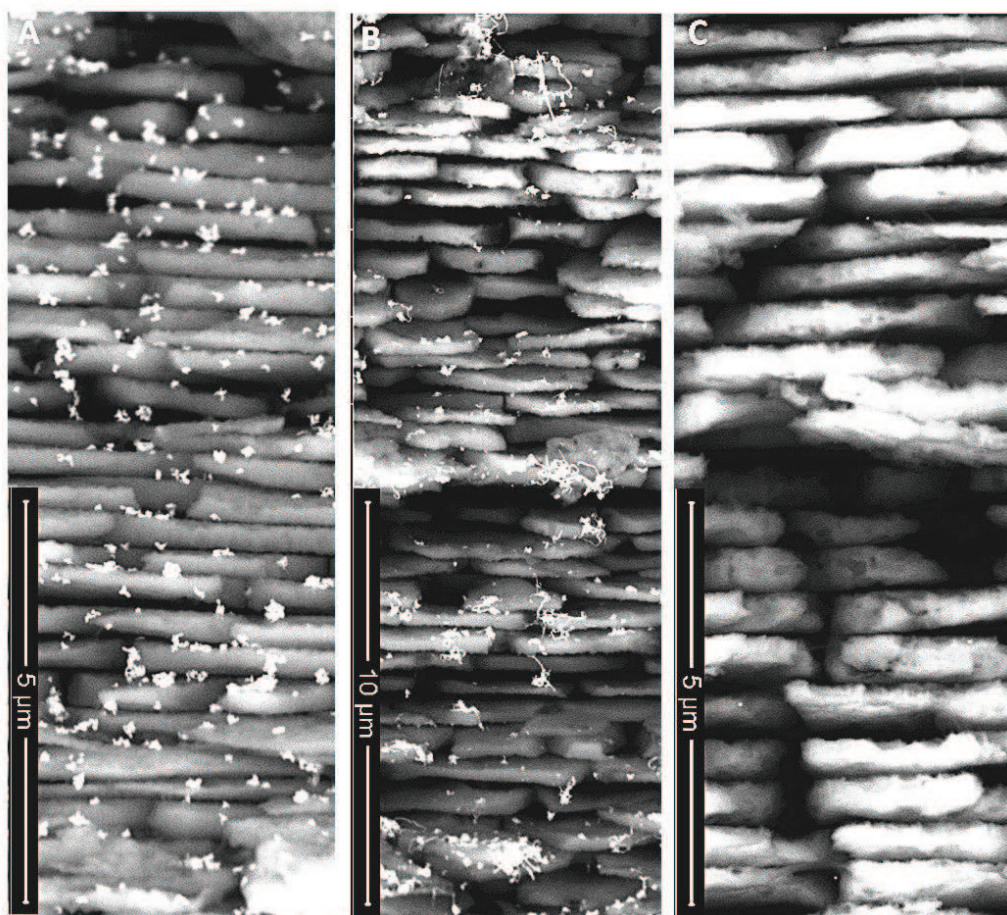


Figura 11 – Resultados de “Immunogold” observados em SEM em modo de elétrons retrodifundidos. Vista transversal. As letras A-C representam respetivamente os resultados obtidos nos procedimentos teste 1-3.

A observação feita transversalmente reforça os resultados obtidos em vista superficial. A figura 11A atesta a ligação de forma padronizada do anticorpo. Embora seja evidente a presença de prata em todas as faces das zonas cristalinas, esta ligação não aparente ser aleatória. Não se observam também depósitos filamentosos de prata.

Pelo contrário na figura 11B surgem filamentos de prata e as restantes partículas ligam-se também nas zonas que rodeiam os cristais mas em menor quantidade que na figura 11A.

A figura 11C apresenta um número muito reduzido de partículas de ouro ligadas de forma pouco ou nada específica, reforçando o resultado obtido em vista superficial (Figura 10D).

Nos procedimentos que envolveram a tentativa de localização da quitina os resultados foram muito semelhantes aos apresentados nas figuras 10C, 10D, 11B e 11C, ou seja, não se verificou nenhuma ligação específica dos anticorpos. Este resultado observou-se para os dois anticorpos primários testados.

5. DISCUSSÃO

A concha dos moluscos é constituída por cristais de carbonato de cálcio envolvidos numa matriz orgânica cujo estudo requer em geral um primeiro passo que não é de todo simples. A primeira dificuldade depara-se com o facto de querendo estudar camadas calcificadas diferentes ser necessário separá-las, como foi o caso deste trabalho onde o objeto de estudo foi a matriz orgânica da camada nacarada e não de toda a concha. A separação com solução de hidróxido de sódio foi relativamente simples apenas para as zonas mais jovens da concha, ou seja, para as zonas que ficam mais perto do umbo (ver figura 1). Neste caso após o tratamento e secagem da concha o destacamento da camada prismática ocorreu naturalmente. No entanto, nas zonas das linhas de crescimento a separação só foi possível recorrendo várias vezes a tratamento químico e ação mecânica alternadamente. Uma outra dificuldade impôs-se pelo facto de a concha, sendo uma estrutura extremamente dura, não ser fácil de fragmentar em pedaços pequenos o que posteriormente diminuiu a eficiência da extração porque os pedaços não solubilizam facilmente no ácido. Neste trabalho optei pela extração em ácido acético embora também haja estudos onde esta foi feita com solução de EDTA. Embora a extração com EDTA preserve a integridade e a actividade das proteínas, muitas não são possíveis de isolar sem recorrer à descalcificação (Caiping *et al.*, 2005). Além disso o EDTA tende a formar complexos com a matriz orgânica difíceis de desfazer, o que impede o posterior isolamento das proteínas (Marxen and Becket, 1997). Mesmo sem a presença de EDTA as proteínas tendem a formar naturalmente agregados entre si o que juntamente com uma resistência fora do normal à temperatura, químicos e enzimas torna difícil isolá-las por métodos bioquímicos tradicionais, como por exemplo cromatografia, eletroforese e clivagem enzimática (Marin *et al.*, 2001; Pereira-Mouriè *et al.*, 2002).

Embora o método de extração por descalcificação resulte em duas frações, uma solúvel e outra insolúvel, neste trabalho só foi estudada a fração solúvel ficando a insolúvel guardada para estudos posteriores. A quantidade de matéria orgânica encontrada, especificamente proteínas e GAGs, foi baixa quando comparado com a totalidade da amostra de concha inicial, o que já era de esperar (Miyashita *et al.*, 2000;

Duplat *et al.*, 2006). Quando analisada em sistema de mini-gel SDS-PAGE verificou-se que a pequena quantidade de matriz orgânica se traduz também em poucas frações, num total de 5. Este tipo de análise já foi feito para pelo menos três famílias de moluscos, sendo duas delas da classe dos bivalves (Marxen and Becker, 1997; Pereira-Mouriès, 2002; Caiping *et al.*, 2005; Marie *et al.*, 2007). É de realçar que as famílias dos bivalves estudados, incluindo a família da *Anodonta cygnea*, são afastadas filogeneticamente em milhares de anos (Giribet and Wheeler, 2002). No entanto, os estudos demonstraram que independentemente da família e até da classe, o número de frações encontradas é baixo e a maioria apresenta peso molecular baixo. No trabalho de Marie *et al.*, 2007, o bivalve em estudo, *Unio pictorum*, pertence à mesma família do bivalve *Anodonta cygnea* estudado neste trabalho. Os resultados não são muito diferentes uma vez que para a espécie *Unio pictorum* foram isoladas da fração solúvel do nacre somente três frações proteicas de peso molecular 95, 50 e 29KDa. Poder-se-ia concluir mais alguma coisa se a coloração específica para glicoproteínas e proteoglicanos tivesse sido bem sucedida uma vez que as frações do bivalve *Unio pictorum* têm um nível muito elevado de glicosilação bem como grupos sulfatados. Mesmo fora da família Unionidae os demais estudos confirmam que a matriz orgânica solúvel do nacre é caracterizada pela predominância de glicoproteínas acidificadas (Pereira-Mouriès, 2002). Neste trabalho, a falta de resultados para esta coloração deveu-se possivelmente a alguma falha técnica e não à inexistência deste tipo de proteínas na amostra uma vez que os controlos positivos e também o marcador molecular, que contém uma glicoproteína, não coraram. A coloração com Coomassie brilliant blue e com nitrato de prata são colorações não específicas, coram qualquer tipo de proteína indiscriminadamente embora estudos confirmem que é difícil corar proteínas acidificadas com estes métodos (Goldberg and Warner, 1997; Marin *et al.*, 2001). Neste trabalho, embora tenha sido possível visualizar as frações proteicas com ambos os métodos, foi bastante evidente a maior sensibilidade da coloração com o nitrato de prata. No entanto, este também demonstrou fragilidades uma vez que foi difícil obter a mesma qualidade de coloração em diferentes géis sendo que em alguns casos a definição de cada fração não era muito nítida.

Curiosamente, no estudo realizado por Moura *et al.* (2000), onde se caracterizaram os fluídos do bivalve *Anodonta cygnea* (hemolinfa e fluído extrapaleal)

quanto à sua composição orgânica, foram detetadas apenas 6 frações proteicas. Sendo o fluído extrapaleal um elemento fundamental para a biomineralização da concha, pois dele provém todo o material depositado na concha, é provável que as frações sejam as mesmas. No entanto, serão necessários estudos comparativos que possam comprovar ou não tal hipótese.

Uma vez que não são conhecidas sondas de oligonucleótidos para a espécie aqui em estudo nem para qualquer espécie pertencente à mesma família, a produção de anticorpos é uma opção bastante viável para se conhecerem os genes responsáveis pela transcrição das proteínas da matriz orgânica da concha. O mais comum, e que foi feito neste trabalho, é produzir anticorpos policlonais por serem os mais fáceis e baratos de obter. Contudo, ainda que o antigene inoculado no animal de laboratório seja bastante puro, o imunosoro obtido é sempre constituído por uma mistura de anticorpos dirigidos contra os diferentes epítopes (locais do antigene que determinam a ligação específica com um determinado anticorpo) que são mais numerosos quanto mais complexo for o antigene. Na maioria das vezes a amostra inoculada nos animais não é um antigene individual mas sim uma mistura, como neste trabalho, o que aumenta ainda mais a variabilidade dos anticorpos. Deste modo, em estudos posteriores onde se utilizem os anticorpos policlonais produzidos os resultados podem ser mais difíceis de obter ou até ambíguos uma vez que a especificidade é baixa podendo ocorrer reação cruzada com outros epítopes. Além disso, a produção de anticorpos em dois coelhos em paralelo não produz a mesma quantidade nem provavelmente o mesmo tipo de anticorpos já que cada animal responde ao antigene de diferentes maneiras, podendo até mesmo não reagir. Este facto verificou-se neste trabalho onde foram imunizados dois coelhos e só um apresentou produção de anticorpos significativa. A escolha de coelhos deveu-se ao facto de sendo animais de maior porte, ser possível obter maiores quantidades de soro. Poderiam no entanto ser usados cobaias de laboratório. A alternativa aos anticorpos policlonais é a produção de anticorpos monoclonais que se obtêm a partir de linhas celulares individuais sendo portanto produzidos anticorpos específicos para apenas um epítope (Jones *et al.*, 2003).

As bibliotecas de ADN complementar, juntamente com os anticorpos policlonais, são a ferramenta que permite investigar genes específicos quando não há outro tipo de sonda. Uma vez que toda a informação do ARN mensageiro do tecido em questão está contida na biblioteca é possível fazer uma prospeção de genes específicos através dos anticorpos que reconhecerão a proteína em questão se esta for expressa. Identificado o gene ou genes é então possível desenhar sondas que servirão de ferramentas para avançar com outros estudos, como por exemplo a avaliação da expressão do gene (s) ao longo de um determinado tempo ou sob condições específicas. No entanto, visto que o ARN mensageiro representa uma percentagem muito pequena de ARN da célula torna-se por vezes difícil construir uma biblioteca de ADN em que os clones recombinantes que contêm os genes de interesse estejam representados em número suficiente para serem identificados durante a prospeção. Existem ainda poucos trabalhos referentes à matriz orgânica da concha de moluscos onde se tenham construído bibliotecas de ADN. Miyashita *et al.* (2000) identificou o gene responsável pela produção de uma proteína do nacre de uma espécie de ostra e Marin *et al.* (2003) descreveu o gene de uma proteína da matriz orgânica da concha da espécie *Pinna nobilis*. Embora ambas as espécies sejam marinhas, pertencem a famílias diferentes. Assim, devido à completa falta de conhecimento sobre os genes responsáveis pela produção proteica da concha de bivalves de água doce, um dos objetivos deste trabalho foi construir uma biblioteca de ADN a partir do ARN mensageiro existente no manto do bivalve *Anodonta cygnea*. No entanto, o resultado final não foi o melhor uma vez que o número de clones recombinantes é demasiado baixo, sendo quase impossível fazer uma identificação positiva dos genes de interesse. Existem várias razões que poderão justificar o insucesso do trabalho. A qualidade e quantidade de ARN mensageiro usado como molde para a formação do ADN complementar é o primeiro ponto fundamental para que o processo corra bem. Neste trabalho, o problema não terá sido pelo menos na quantidade, uma vez que foi usada a quantidade de ARN recomendada pelo fabricante. Relativamente à qualidade apenas foi possível verificar que o ARN total de onde foi extraído o ARN mensageiro era de boa qualidade. Neste ponto e referindo os métodos de extração do ARN total, embora ambos os métodos tenham extraído o ARN sem o degradar, o kit não é opção para trabalhos que

requerem grandes quantidades de ARN, especialmente quando ainda se pretende extrair e trabalhar apenas com o ARN mensageiro, uma vez que este representa uma percentagem muito pequena de todo o ARN presente numa célula. Além disso o kit foi desenvolvido e otimizado para extração de ARN de tecidos de mamíferos. Não há atualmente nenhum kit específico para extração de ARN total de tecidos de moluscos que possa ajudar a contornar algumas dificuldades de extração inerentes ao tecido. Assim, embora o método clássico de extração seja muito mais demorado é fortemente recomendado neste tipo de trabalho. Na construção da biblioteca existem vários pontos críticos. Um dos pontos é o facto de que todo o procedimento referente à síntese das cadeias do ADN complementar bem como a posterior modificação dos terminais envolve reações enzimáticas difíceis de monitorizar. As enzimas são muito sensíveis podendo as reações não ocorrer de forma correta. Além disso durante esta fase de síntese da primeira e segunda cadeia de ADN podem formar-se estruturas secundárias de elevado peso molecular que depois não são possíveis de clonar. Este passo é monitorizável por eletroforese e neste trabalho não foi evidente que tal formação tenha ocorrido. Outro ponto bastante crítico, talvez o mais crítico para este trabalho, foi a separação dos fragmentos do ADN por tamanhos em coluna de sefarose. Este passo foi particularmente difícil neste trabalho porque não foram usados radioisótopos, devido à falta de condições no laboratório, que permitiriam monitorizar a separação. Assim esta separação foi feita com base apenas no volume que passou pela coluna, segundo as instruções do fabricante. Neste ponto ter-se-á muito provavelmente perdido grande parte da amostra, o que comprometeu todo o restante trabalho. Outro ponto crítico é a inserção dos fragmentos no vetor de clonagem. Neste caso, como a maior parte da amostra deve ter sido perdida, o número de clones foi evidentemente pequeno e nada garante que representem fragmentos de interesse. É de salientar também que o vetor de clonagem usado neste trabalho é um bacteriófago λ modificado. Este tipo de vetor permite insertos até 12 Kb e tem características de plasmídeo que lhe permite expressar os genes nele contido. Contudo, os fagos têm a desvantagem de ser muito sensíveis, não tolerando por exemplo nenhum ciclo de descongelamento/congelamento. Uma vez descongelados têm de ser usados de imediato ou ficam inviabilizados. Dado que a biblioteca não é a ideal, não foi possível avançar na prospeção da mesma. Não seria rentável já que seria quase impossível detetar qualquer gene com tão poucos clones recombinantes. No futuro será

necessário recomeçar o processo tentando melhorar os pontos críticos. No que diz respeito à separação dos fragmentos por tamanho uma opção será correr todo o ADN complementar em gel juntamente com um marcador de peso molecular e excisar as bandas de interesse que serão as de maior peso. Deste modo, as perdas de ADN, embora possam ocorrer, não serão tão grandes.

Pela técnica de “Immunogold” foi possível determinar a localização da matriz orgânica na concha. Os resultados mostraram que esta se encontra essencialmente nos espaços entre os cristais (posição intercrystalina) mas também se incorpora no próprio cristal (posição intracrystalina). Estas observações são semelhantes às obtidas em trabalhos realizados numa espécie da família Pinnidae (Marin *et al.*, 2007). A íntima associação entre a matriz orgânica e os cristais releva a importância que esta terá no desenvolvimento e organização dos cristais. Apesar de esta técnica ser de uma grande utilidade no estudo estrutural da concha, algumas dificuldades estão inerentes a ela que dificultam a obtenção de bons resultados. Entre elas conta-se o tratamento a que a concha é submetida, que pode lesar locais de reconhecimento das proteínas pelos anticorpos, dificultando assim a ligação e deteção desta. Outra grande dificuldade está relacionada com a amplificação do sinal com o nitrato de prata devido ao elevado “background” que impede muitas vezes de tirar conclusões. Pelo procedimento controlo onde se usou apenas o kit de amplificação com nitrato de prata verificou-se que esta estava também presente. Uma vez que não havia neste procedimento qualquer incubação com anticorpos, conclui-se que os iões prata também precipitam naturalmente, ou seja, mesmo quando não há nenhum anticorpo que lhe permita estabelecer ligação. Embora inconveniente porque pode adulterar resultados na medida de dar falsos positivos, esta precipitação não é um resultado surpresa sendo facilmente explicado pela presença natural de outros iões metálicos nas águas onde o bivalve habita (Moura *et al.*, 2001; Moura *et al.*, 2003c). Assim é normal que alguns destes iões existam no fluido extrapaleal e no manto e sejam incorporados durante a formação e crescimento da concha interagindo então com os iões prata usados no procedimento. Uma vez que o uso de nitrato de prata apresentou esta dificuldade experimentou-se usar um anticorpo secundário acoplado a partículas de ouro de maior tamanho na tentativa de evitar aplicar

o nitrato de prata. No entanto, embora as imagens obtidas desta forma tenham sido mais limpas devido à ausência de “background”, não denotaram nenhuma ligação proteína-anticorpo clara que permitisse concluir algo sobre a localização das proteínas. A ausência de ligação clara verificou-se também quando na presença do mesmo anticorpo secundário se aplicou o nitrato de prata. Esta ocorrência é difícil de explicar contudo é provável que o motivo pelo qual acontece esteja inerente à forma como o anticorpo foi produzido ou ao tamanho da partícula de ouro que poderá interferir com a ligação do anticorpo ao antigene.

A tentativa de visualizar o local de ligação da quitina por este método não forneceu qualquer resultado. Na presença de prata verificaram-se os mesmos filamentos precipitados ao acaso e sem ela não foi detetado qualquer sinal. Uma vez que os anticorpos primários usados nesta deteção não foram produzidos especificamente para esta matriz mas sim adquiridos comercialmente, não é de estranhar que não tenham tido a capacidade de reconhecer os epítopes das proteínas da concha. Além disso estes anticorpos só foram testados pelo fabricante na técnica de western blotting não sendo portanto descritas sugestões para o uso dos anticorpos em técnicas imuno-histoquímicas.

6. CONCLUSÃO

Sendo o bivalve *Anodonta cygnea* um bom modelo de estudo da biomineralização pelo seu grande tamanho e facilidade em aceder aos fluidos e tecidos calcificantes, e dado que pouco se sabe sobre a natureza da matriz orgânica que constitui a sua concha bem como a de qualquer outra espécie pertencente a esta família, é importante continuar o estudo iniciado neste trabalho. Embora haja algumas dificuldades técnicas, os resultados finais serão compensadores. Neste trabalho os resultados encontrados incidem mais sobre a constituição e localização da matriz orgânica mas nada dizem sobre, por exemplo, as suas funções. Assim, para esse fim está a ser feita uma nova tentativa para se obter uma biblioteca de ADN complementar mais representativa. Atingido esse objetivo ter-se-á uma ferramenta importante que além de permitir identificar os genes responsáveis pela transcrição dos componentes da matriz orgânica e consequentemente identificar claramente esses componentes, o que já permitirá inferir sobre possíveis funções, permitirá também fazer um estudo sazonal sobre o nível de expressão génica. Esse estudo nunca antes realizado, permitirá saber quantos, quais e quando estão ativos os genes indicando assim se a formação da matriz orgânica é um processo contínuo ou faseado. No caso de ser faseado poderá saber-se quantas são as fases e quando ocorrem. Para além deste estudo é também objetivo futuro analisar melhor em gel as frações encontradas neste trabalho através de coloração diferenciada. Finalmente pretende-se fazer uma análise semelhante na fração insolúvel da matriz e comparar os resultados das duas frações (solúvel e insolúvel).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Addadi, L., Joester, D., Nudelman, F. and Weiner, S. (2006). Mollusk Shell Formation: A Source of New Concepts for Understanding Biomineralization Processes. *Chem. Eur. J.* 12, 980-987.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Caiping, M.A., Cen, Z., Yancheng, N., Liping, X. and Rongqing, Z. (2005). Extraction and Purification of Matrix Protein from the Nacre of Pearl Oyster *Pinctada fucata*. *Tsinghua Science and Technology ISSN 1007-0214*, volume 10, number 4, 499-503.
- Cartwright, J.H.E. and Checa, Antonio, G. (2007). The Dynamics of Nacre Self Assembly. *J. Roy. Soc. Interface* 4, 491-504.
- Checa, A. (2000). A new model for periostracum and shell formation in Unionidae (Bivalvia, Mollusca). *Tissue & Cell* 32, Harcourt Publishers Ltd, 405-416.
- Checa, A., Jiménez-López, C., Rodríguez-Navarro, A., Machado, J.P. (2007). Precipitation of aragonite by calcitic bivalves in MG-enriched marine waters. *Marine Biology*, volume 150, number 5, 819-827.
- Coimbra, J., Machado, J., Ferreira, K.G. and Ferreira, H.G. (1988). Electrophysiology of the mantle of *Anodonta cygnea*. *Jour. of Exp. Biol.* 140, 65-88.
- Duplat, D., Puisségur, M., Bédouet, L., Rousseau, M., Boulzaguet, H., Milet, C., Sellos, D., Van Wormhoudt, A. and Lopez, E. (2006). Identification of calconectin, a calcium-binding protein soecifically expressed by the mantle of *Pinctada margaritifera*. *FEBS Letters* 580, 2435-2441.

- Gaspard, D., Marin, F., Guichard, N., Morel, S., Alcaraz, G. and Luquet, G. (2008). Shell matrices of Recent rhynchonelliform brachiopods: microstructures and glycosylation studies. *Earth and Environmental Science Transactions of the Royal Society of Edinburgh* 98, 415-424.
- Giribet, G. and Wheeler, W. (2002). On bivalve phylogeny: a high-level analysis of the Bivalvia (Mollusca) based on combined morphology and DNA sequence data. *Invertebrate Biology* 121 (4), 271-324.
- Goldberg, H.A. and Warner, K.J. (1997). The Staining of Acidic Proteins on Polyacrylamide Gels: Enhanced Sensitivity and Stability of “Stains-All” Staining in Combination with Silver Nitrate. *Analytical Biochemistry* 251, 227-233.
- Gromova and Celis, J.E. (2006). Protein detection in Gels by Silver Staining: A Procedure Compatible with Mass-Spectrometry. In: *Cell Biology: A Laboratory Handbook*, 3rd edition, vol.4, Celis, J.E., Carter, N., Hunter, T., Simons, K., Small, J.V. and Shotton, D. (eds). *Academic Press, Elsevier*.
- Hudson, R.L. (1992). Ion transport by the isolated mantle epithelium of the freshwater clam, *Unio complanatus*. *Am. J. Physiol.* 263:R76–R83.
- Jones, A., Reed, R. and Weyers, J. (2003). *Practical Skills in Biology*, Third Edition, *Pearson Education Limited*, 312-318.
- Kobayashi, I. and Samata, T. (2006). Bivalve shell structure and organic matrix. *Materials Science and Engineering C* 26, 692-698.
- Levi-Kalisman, Y., Falini, G., Addadi, L. and Weiner, S. (2001). Structure of the Nacreous Organic Matrix of a Bivalve Mollusk Shell Examined in the Hydrated State Using Cryo-TEM. *Journal of Structural Biology* 135, 8-17.
- Lopes-Lima, M., Bleher, R., Forg, T., Hafner, M. and Machado, J. (2008). Studies on a PMCA-like protein in the Outer Mantle Epithelium of *Anodonta cygnea*: insights on calcium transcellular dynamics. *Journal of Comparative Physiology* 178(1), 17-25.

- Lopes-Lima, M., Rocha, A., Gonçalves, F., Andrade, J. and Machado, J. (2010). Microestrutural characterization of inner shell layers in the freshwater bivalve *Anodonta cygnea*. *Journal of Shellfish Research*, volume 29, number 4, 1-5.
- Machado, J., Castilho, F., Coimbra, J., Sá, C. and Monteiro, E. (1988). Ultrastructural and cytochemical studies in the mantle of *Anodonta cygnea*. *Tissue and Cell*, 20 (5), 797-807.
- Machado, J., Ferreira, H.G. and Fernandes, P.L. (1990). The acid-base balance of the outer mantle epithelium of *Anodonta cygnea*. *J. Exp. Biol.* 150, 159-169.
- Machado, J., Reis, M.L., Coimbra, J. and Sá, C. (1991). Studies on chitin and calcification in the inner layers of the shell of *Anodonta cygnea*. *Journal of Comparative Physiology B* 161, 413-418.
- Machado, J. and Lopes-Lima, M. (2011). Calcification mechanism in freshwater mussels: potential targets. *Toxicological & Environmental Chemistry*, volume 93, number 9, 1778–1787.
- Marie, B., Luquet, G., De Barros, J.P.P., Guichard, N., Morel, S., Alcaraz, G., Bollache, L. and Marin, F. (2007). The shell matrix of the freshwater mussel *Unio pictorum* (Paleoheterodonta, Unionoida) – Involvement of acidic polysaccharides from glycoproteins in nacre mineralization. *FEBS Journal* 274, 2933-2945.
- Marin, F., Pereira, L. and Westbroek, P. (2001). Large-Scale Fractionation of Molluscan Shell Matrix. *Protein Expression and Purification* 23, 175-179.
- Marin, F., Groot, K., and Westbroek, P. (2003). Screening molluscan cDNA expression libraries with anti-shell matrix antibodies. *Protein Expression and Purification* 30, 246-252.
- Marin, F. and Luquet, G. (2004). Molluscan shell proteins. *C. R. Palevol* 3, 469-492
- Marin, F. and Muquet, G. (2005). Molluscan biomineralization: The proteinaceous shell constituents of *Pinna nobilis* L.. *Materials Science and Engineering C* 25, 105-111.

- Marin, F., Pokroy, B., Luquet, G., Layrolle, P. and De Grrot, K. (2007). Protein mapping of calcium carbonate biominerals by immunogold. *Biomaterials* 28, 2368-2377.
- Marin, F., Luquet, G., Marie, B., and Medakovic, D. (2008). Molluscan Shell Proteins: Primary Structure, Origin and Evolution. *Current Topics in Developmental Biology* 80, 209-276.
- Marxen, J.C., and Becker, W. (1997). The organic Shell Matrix of the Freshwater Snail *Biomphalaria glabrata*. *Comp. Biochem. Physiol.* 118B-1, 23-33.
- Miyashita, T., Takagi, R., Okushima, M., Nakano, S., Miyamoto, H., Nishikawa, E. and Matsushiro, A. (2000). Complementary DNA Cloning and Characterization of Pearlin, a New Class of Matrix Protein in the Nacreous Layer of Oyster Pearls. *Mar. Biotechnol.* 2, 409-418.
- Møller, H.J. and Poulsen, J.H. (2002). Staining of Glycoproteins/Proteoglycans in SDS-Gels. In: The Protein Protocols Handbook, 2nd edition, part VI, Walker, J.M. (ed.) *Human Press Inc.*, Totowa, NJ, 773-777.
- Moura, G., Vilarinho, L., Santos, A.C. and Machado, J. (2000). Organic compounds in the extrapalial fluid and haemolymph of *Anodonta cygnea* (L.) with emphasis on the seasonal Biomineralization process. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 125, 293-306.
- Moura, G., Almeida, M.J., Machado, J.C and Machado, J. (2001). Effects of heavy metal exposure on ionic composition of fluids and nacre of *Anodonta cygnea* (Unionidae). *Haliotis* 30, 33-44.
- Moura, G., Machado, J. and Coimbra, J. (2003a). Insights on Nacre Formation in the Freshwater Clam, *Anodonta cygnea* (L.): an Overview. In: Biomineralization (BIOM2001): formation, diversity, evolution and application, Proceedings of the 8th International Symposium on Biomineralizations, Kobayashi, I. and Ozawa, H. (eds.), *Tokai University Press*, Kanagawa, 129-132.

- Moura, G., Almeida, M.J., Machado, M.J., Vilarinho, L. and Machado, J. (2003b). The Action of Environmental Acidosis on the Calcification Process of *Anodonta cygnea* (L.). In: Biomineralization (BIOM2001): formation, diversity, evolution and application, Proceedings of the 8th International Symposium on Biomineralizations, Kobayashi, I. and Ozawa, H. (eds.), *Tokai University Press*, Kanagawa, 178-182.
- Moura, G., Almeida, M.J., Machado, M.J., Vilarinho, L. and Machado, J. (2003c). Annual Variation of Some Inorganic Elements Present in the Biological Fluids of *Anodonta cygnea* (L.) and Possible Effects on Its Calcification Cycle. In: Biomineralization (BIOM2001): formation, diversity, evolution and application, Proceedings of the 8th International Symposium on Biomineralizations, Kobayashi, I. and Ozawa, H. (eds.), *Tokai University Press*, Kanagawa, 123-128.
- Nobre, A. (1930). *Moluscos terrestres fluviaes e das águas salobras de Portugal*, 230-237, Porto.
- Pereira-Mourière, L., Almeida, M.J., Ribeiro, C., Peduzzi, J., Barthélemy, M., Milet, C. and Lopez, E. (2002). Soluble silk-like organic matrix in the nacreous layer of the bivalve *Pinctada maxima* - A new insight in the Biomineralization field. *Eur. J. Biochem.* 269, 4994-5003.
- Reis, J. (2006). Atlas dos Bivalves de água doce em Portugal continental. Instituto da Conservação da Natureza, 23, 59-61.
- Sambrook, J.F. and Russel, D.W. (2001). Purification of RNA from cells and tissues by acid Phenol-guanidinium thiocyanate-chloroform Extraction. In: *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Third Edition, vol.1. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, America, 7.4-7.8.
- Weiner, S. (1983). Mollusk Shell Formation: Isolation of Two Organic Matrix Proteins Associated with Calcite Deposition in the Bivalve *Mytilus californianus*. *Biochemistry* 22, 4139-4145.
- Whiteman, P. (1973). The Quantitative Measurement of Alcian Blue-Glycosaminoglycan Complexes. *Biochem. J.* 131, 343-350.