

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA**

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL EM OSTRAS-DO-PACÍFICO
Crassostrea gigas EXPOSTAS A ESGOTO DOMÉSTICO *IN SITU***

Guilherme de Toledo e Silva

**FLORIANÓPOLIS
2009**

GUILHERME DE TOLEDO E SILVA

ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL EM OSTRAS-DO-PACÍFICO
Crassostrea gigas* EXPOSTAS A ESGOTO DOMÉSTICO *IN SITU

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Afonso Celso Dias Bainy

FLORIANÓPOLIS
2009

Toledo-Silva, Guilherme

Análise da expressão gênica diferencial em ostras-do-pacífico *Crassostrea gigas* expostas a esgoto doméstico *in situ*./ Guilherme de Toledo e Silva.
Florianópolis, 2009. 94 p.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2009.

1. Esgoto doméstico 2. *Crassostrea gigas* 3. Biomarcadores 4. PCR quantitativo em tempo real (qPCR) 5. Hibridização subtrativa supressiva (SSH).

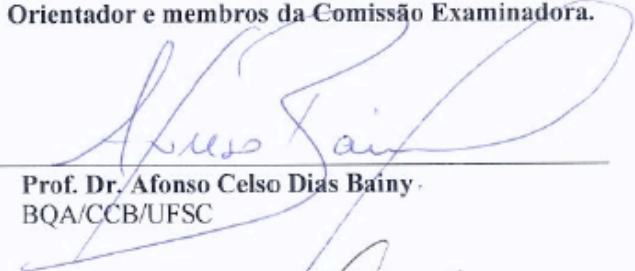
**“Identificação de genes diferencialmente expressos em
Crassostrea gigas expostas à esgoto doméstico *in situ*”**

POR

GUILHERME DE TOLEDO E SILVA


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

Orientador:




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


Comissão Examinadora:




Prof. Dr. Edmundo Carlos Grisard
MIP/CCB/UFSC



Prof. Dr. Cláudio Manoel Rodrigues de Melo
AQI/CCA/UFSC



Prof. Dr. Marcos Luiz Pessatti
Universidade do Vale do Itajaí



Prof. Dr. Edmundo Carlos Grisard – MIP/CCB/UFSC
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia da UFSC

Florianópolis, julho de 2009.

AGRADECIMENTOS

À minha família, que possibilitou a realização de mais esta etapa na minha formação com muito suporte a distância, mesmo nunca entendendo o que faço realmente.

Ao meu orientador Afonso, por ter me aceitado como aluno de mestrado e ter sido muito compreensivo quando precisei me afastar por problemas de saúde. Obrigado pela orientação.

Ao Dr. Igor Dias Medeiros, que sempre esteve presente ajudando (e muito!) neste trabalho, seja ralando na bancada ou orientando na escrita. Fico triste por saber que não encontrarei pessoa tão bacana para trabalhar junto novamente. Não teria conseguido sem você cara, obrigado mesmo!

À minha namorada Aline, que caiu do céu agora no final do mestrado, mas que fez com que essa parte desgastante fosse coadjuvante perto do que estamos vivendo. Obrigado por toda ajuda e apoio moral, e principalmente pela compreensão e paciência inacreditáveis que teve nesse período.

À Sara, que me buscou no fundo do poço, que me ensinou a ver e compreender muitas e muitas coisas, ajudando a ser a pessoa bem melhor que sou hoje em dia. Sem dúvidas, sem sua ajuda eu nem estaria aqui escrevendo estes agradecimentos. Sou eternamente grato!

À todos do LABCAI, onde fiz amigos nestes quase seis anos de casa. Obrigado pela ajuda e compreensão nesta reta final, senti a energia boa de todos. Jú, sentirei saudade das festas contigo e Ricardo. Karim, Valeu por toda ajuda na segunda subtração, sozinho eu nunca teria me animado pra repetir. Marília e Jacó, agradeço demais as aulas de estatística e na compreensão dos cálculos para o real time. Tarquin, valeu pela força e conversas em inglês sobre futebol e fórmula 1. Gostaria de agradecer em especial a Isabel, que ajudou demais quando eu não tinha condições, sempre disposta a ouvir mais um maluco em sua vida.

Ao Fabrício e Juliano, que juntamente com o Igor realizaram a maior parte do experimento de campo. Obrigado por terem cedido as amostras e dados para realização deste trabalho.

Às minhas queridas estagiárias, Flávia e Aline, que são meus orgulhos por já estarem tão independentes. Agradeço todo apoio, principalmente a Flávia que acompanhou todas as etapas, frustrações e sucessos deste trabalho, sempre dando forças pra concluir.

À Prof. Dra. Maria Risoleta, que sempre foi minha “co-orientadora”, sendo como uma segunda mãe aqui em Florianópolis, ouvindo e dando conselhos, não só na vida profissional como na pessoal.

Aos meus grandes amigos em Florianópolis: Japa, valeu pelo último semestre de 2008, com certeza um dos mais divertidos da minha vida. Viannera, obrigado por ter aturado minha fase de solteiro, com toda zona e latas pela casa que acompanharam esse período. Ainda faltam Zé, Jaquelino, Nakama, Marcão, Alemão, Macca, Hugo, Platt, entre outros que provavelmente esqueci. Valeu por toda amizade nestes anos, pelas peladas e cervejas pós-futebas, pela torcida (nem sempre a favor mas tudo bem) aqui em casa vendo os jogos do São Paulo, paintballs noturnos, e principalmente pelas horas felizes e cervejadas nos inúmeros botecos. Vou sentir muita falta de todos!

Aos amigos distantes mas mesmo assim presentes: Álvaro, Claudinho, Amaral, Guga, Carioca, André e Fábio. Valeu galera!

Ao Prof. Dr. Edmundo Carlos Grisard, que possibilitou os sequenciamentos em seu laboratório, e pelos sempre ótimos conselhos e sugestões sobre o meu trabalho.

À minha amiga Patrícia, que foi fundamental neste trabalho realizando os sequenciamentos. Obrigado Pati, você foi demais com todo apoio e disponibilidade. Todo sucesso do mundo pra você, merece muito!

Ao pessoal do Instituto Oceanográfico da USP pelas análises químicas.

À Joice, que me aturou esses dois anos e alguns meses com inúmeras situações administrativas para resolver. Quando a situação parecia calma, eu aparecia com um pepino novo. Obrigado pela ajuda e paciência comigo.

Ao Laboratório de Moluscos Marinhos, pelas ostras utilizadas neste trabalho.

À CAPES pela bolsa concedida e ao CNPQ pelos recursos para realização do trabalho.

Ao Prof. Dr. Alcir Dafre, que concedeu a bolsa para me manter durante o período de prorrogação do mestrado.

RESUMO

Nas últimas décadas, a contaminação dos ecossistemas marinhos tem aumentado como consequência da atividade humana, expondo os organismos a uma variedade de contaminantes oriundos da atividade industrial, agricultura e efluentes urbanos. O despejo de esgoto doméstico é a principal fonte de contaminação em ambientes costeiros e é considerado como uma das principais causas da diminuição da qualidade destes ecossistemas. Estudos que vêm sendo desenvolvidos no Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica visam a identificação e validação de novos biomarcadores de exposição ao esgoto doméstico em ostras para que possam ser futuramente utilizadas em programas de avaliação e biomonitoramento dos efeitos tóxicos causados por estes contaminantes. Este trabalho está dividido em dois capítulos. No primeiro capítulo são apresentados os resultados de experimentos realizados com ostras *Crassostrea gigas* expostas em um ambiente contaminado por esgoto doméstico. Foram analisadas a expressão de alguns genes previamente identificados em uma biblioteca subtrativa supressiva de cDNA em brânquias de *C. gigas* expostas a esgoto doméstico em condições de laboratório. A expressão do gene FABP apresentou uma indução significativa (28x) após 24 h de exposição, enquanto o gene GSTO obteve um aumento significativo na expressão após 1, 2 e 7 dias de exposição (8, 3.5 e 3.3x respectivamente). No segundo capítulo estão apresentados os resultados e uma discussão sobre os genes ativados e identificados em uma biblioteca subtrativa supressiva de cDNA em glândula digestiva de ostras *C. gigas* expostas por 24h no ambiente, sob condições de exposição real ao esgoto doméstico não tratado. Genes de diferentes categorias de função biológica foram encontrados após buscas no *GenBank*, incluindo alguns relacionados a resposta ao estresse, classe tipicamente utilizada em programas de biomonitoramento como biomarcadores moleculares de exposição. Também foram identificados genes relacionados com a o citoesqueleto, cadeia respiratória, desenvolvimento e diferenciação, divisão celular, metabolismo básico, maquinaria transcricional e traducional, transporte e armazenamento. Ambos trabalhos complementam os estudos em andamento no laboratório, ajudando na viabilização de metodologias práticas para o monitoramento de recursos marinhos utilizando organismos sentinela.

Palavras-chave: 1. Esgoto doméstico 2. *Crassostrea gigas* 3. Biomarcadores 4. PCR quantitativo em tempo real (qPCR) 5. Hibridização subtrativa supressiva (SSH).

ABSTRACT

In recent decades, marine ecosystem contamination has increased significantly due to anthropogenic activity. Marine organisms are therefore continually exposed to a variety of compounds with industrial, agricultural and urban origins. Domestic sewage is the main source of contamination in coastal environments and is considered to be one of the main causes of ecosystem degradation. Studies are being developed by the Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica in order to identify/validate new biomarkers of effect in oysters exposed to domestic sewage. These new biomarkers could be used in future biomonitoring programs to evaluate the toxic effects of these contaminants. This work is divided into two chapters. Chapter one shows the results of field experiments with the oyster *Crassostrea gigas* exposed to non-treated domestic sewage, using genic expression analysis of genes previously identified in a *C. gigas* subtractive library constructed from laboratory exposure. FABP gene expression showed a significant induction (28x) after 24 hours of exposure, while GSTO gene expression increased significantly after 1, 2 and 7 days of exposure (8, 3.5 and 3.3x respectively). The second chapter shows the results and discussion about induced and identified genes in a cDNA subtractive suppressive hybridization library from oysters (*C. gigas*) exposed for 24 hours *in situ*, to actual concentrations of domestic sewage contamination. Different classes of biological function were identified among the induced genes, like respiratory chain and stress response genes. Both chapters complement previous and current studies in the laboratory, contributing to the validation of practical methodologies for marine environmental monitoring using sentinel organisms.

Keywords: 1. Domestic sewage 2. *Crassostrea gigas* 3. Biomarkers 4. Real time quantitative PCR (qPCR) 5. Subtractive suppressive hibridization (SSH).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Produção mundial das 12 espécies mais cultivadas na aquicultura no ano de 2002. Em destaque a produção de ostras <i>Crassostrea gigas</i> no período.....	19
Figura 2: Porcentagem de sequências nucleares de DNA presentes no <i>GenBank</i> (excluindo microssatélites), por espécie ou gênero de moluscos. Porcentagens menores que 1% não representadas. Gênero <i>Crassostrea</i> em destaque.....	19
Figura 3: Exemplo de delimitação de limiar e determinação do valor de CT. Dados típicos de uma reação de PCR em tempo real com 40 ciclos. O ponto em que a curva encontra o limiar (linha horizontal vermelha) é o CT. No exemplo o CT é 22,5.....	23
Figura 4: Localização dos locais de exposição das ostras <i>Crassostrea gigas</i> na Baía Norte da região da Grande Florianópolis, SC, Brasil. O ponto contaminado (foz do Rio Bücheler) situa-se nas coordenadas 27°34'22,98" S; 48°35'58,59" O; ponto referência (Pedra das Tipitingas) 27°31'31,77"S; 48°36'23,00"O (5.500 m do contaminado).....	33
Figura 5: Perfis das curvas de dissociação dos genes de interesse. (A) Actina (B) Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (C) Proteína ribossomal 28S.....	40
Figura 6: Perfis das curvas de dissociação dos genes de interesse. (A) Proteína ligante de ácidos graxos (B) Citocromo P450 família 356A1 (C) Glutathione S-transferase classe ômega (D) Proteína de resistência a múltiplas drogas (E) δ-Aminolevulinato sintase.....	41
Figura 7: Expressão relativa nos quatro diferentes tempo de exposição (1, 2, 7 e 14 dias) comparando os locais referência e contaminado. Dados mostrados como média ± d.p. * representa diferença significativa conforme teste não-paramétrico de Mann-Whitney, com $p < 0,05$	42
Figura 8: Esquema detalhando as etapas executadas na metodologia de hibridização subtrativa supressiva.....	53
Figura 9: Distribuição dos fragmentos obtidos na biblioteca de SSH de ostras <i>Crassostrea gigas</i> expostas a esgoto doméstico <i>in situ</i> . Sequências distribuídas segundo função biológica putativa.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sequência dos pares de iniciadores desenhados, tamanho dos amplicons e temperatura de anelamento utilizada nas reações de qPCR.....	35
Tabela 2: Curvas padrões geradas na padronização das reações de qPCR. Valores dos coeficientes de correlação (R^2), inclinação da reta (M), amplificação (100%=2) e eficiência da reação (100%=1).....	38
Tabela 3: Variação da expressão gênica em relação ao local referência, nos períodos de exposição de 1, 2, 7, e 14 dias. Em negrito as expressões relativas com significância estatística.....	39
Tabela 4: Características gerais da biblioteca subtrativa de ostras <i>Crassostrea gigas</i> expostas a esgoto doméstico <i>in situ</i>	60
Tabela 5: Anotação dos genes encontrados na biblioteca subtrativa de ostras <i>Crassostrea gigas</i> expostas a esgoto doméstico. Descrição e espécie do gene comparado, número de acesso no <i>genbank</i> , e-value da busca do algoritmo BLASTX ou BLASTN e tamanho do fragmento.....	60

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABC	ATP binding cassette
ABL	Alquil benzeno linear
ALAS	5-aminolevulinato sintase
BPC	Bifenila policlorada
CT	Limiar do ciclo
CYP	Citocromo P450
CYP356A1	Citocromo P450 família 356A1
DBO₅	Demanda bioquímica de oxigênio
DDT	Dicloro difenil tricloroetano
DEPC	Dietil pirocarbonato
EDC	Desregulador endócrino
EE₂	Etinilestradiol
FABP	Proteína ligante de ácidos graxos
GST	Glutathione S-transferase
GSTO	Glutathione S-transferase classe ômega
HPA	Hidrocarboneto policíclico aromático
ICES	Conselho Internacional para Exploração do Mar
LMM	Laboratório de Moluscos Marinhos
MDR	Proteína de resistência a múltiplas drogas
MXR	Proteína de resistência a xenobióticos
Nr	Base de dados de sequências de proteínas não-redundantes
OC	Organoclorado
PCR	Reação em cadeia da polimerase
P-gp	Glicoproteína P
PPAR	Receptor ativado de proliferação peroxissomal
qPCR	PCR quantitativo em tempo real
SGLT	Co-transportador de sódio e glicose
SSH	Hibridização subtrativa supressiva

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	13
1.1 Contaminação costeira e esgoto doméstico.....	13
1.2 Biomarcadores.....	16
1.3 Ostra-do-Pacífico <i>Crassostrea gigas</i>	17
2. CAPÍTULO I: Teste <i>in situ</i> do uso de biomarcadores moleculares de exposição a esgoto doméstico através da avaliação da expressão gênica por PCR em tempo real	20
1. INTRODUÇÃO	21
1.1 PCR em tempo real.....	21
1.2 Genes candidatos a biomarcadores de exposição a esgoto doméstico.....	25
1.2.1 Proteína ligante de ácidos graxos (FABP).....	25
1.2.2 Citocromo P450 família 356A1 (356A1).....	26
1.2.3 Glutathiona S-transferase classe ômega (GSTO).....	27
1.2.4 Proteína de resistência a múltiplas drogas (MDR).....	28
1.2.5 δ-Aminolevulinato sintase (ALAS).....	29
1.3 Análise da expressão gênica por PCR em tempo real.....	30
2. OBJETIVOS	31
2.1 Objetivo geral.....	31
2.2 Objetivos específicos.....	31
3. METODOLOGIA	32
3.1 Área de estudo e desenho experimental.....	32
3.2 Biometria e extração de tecidos.....	33
3.3 Extração de RNA total.....	34
3.4 Síntese do cDNA.....	34
3.5 Desenho dos iniciadores.....	35
3.6 Padronização das reações de qPCR.....	35
3.7 Análise da expressão gênica por qPCR.....	36
4. RESULTADOS	38
4.1 Padronização das reações de qPCR.....	38
4.2 Análise da expressão dos genes normalizadores.....	38
4.3 Análise da expressão dos genes de interesse.....	39
5. DISCUSSÃO	43
5.1 Caracterização dos locais de estudo.....	44
5.2 Análise da expressão gênica por qPCR.....	44
6. CONCLUSÕES	49
3. CAPÍTULO II: Análise da expressão gênica diferencial em ostras <i>Crassostrea gigas</i> expostas a esgoto doméstico <i>in situ</i> utilizando a técnica de hibridização subtrativa supressiva	50
1. INTRODUÇÃO	51
2. OBJETIVOS	55
2.1 Objetivo geral.....	55
2.2 Objetivos específicos.....	55
3. METODOLOGIA	56
3.1 Extração do RNAm.....	56
3.2 Hibridização subtrativa supressiva (SSH).....	56

3.3 Clonagem dos fragmentos de cDNA diferencialmente expressos.....	57
3.4 Sequenciamento.....	57
3.5 Anotação das sequência.....	58
4. RESULTADOS.....	59
5. DISCUSSÃO.....	62
6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	76
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Contaminação costeira e esgoto doméstico

Nas últimas décadas, a contaminação dos ecossistemas marinhos tem aumentado como consequência da atividade humana (CAJARAVILLE et al., 2000). Assim, a água apresenta um papel paradoxal em que é simultaneamente um recurso indispensável à vida e um veículo de descarte de poluentes (SCHNURSTEIN e BRAUNBECK, 2001). Neste contexto, organismos marinhos têm sido continuamente expostos a uma variedade de contaminantes oriundos da atividade industrial, agricultura e efluentes urbanos (BOUTET et al., 2004). Organismos submetidos a uma situação de estresse químico gastam mais energia para a manutenção de sua homeostase, sobrevivência e reprodução (GAGNÉ et al., 2006). Este custo metabólico pode acarretar na diminuição de suas defesas e retardamento no desenvolvimento (STEGEMAN et al., 1992). A relevância de se avaliar os efeitos do estresse ambiental sobre os organismos aquáticos é ainda maior quando se tratam de espécies cultivadas para o consumo humano.

O despejo de esgoto doméstico é a principal fonte de contaminação em ambientes costeiros e é considerado como uma das principais causas da diminuição da qualidade destes ecossistemas (WALKER et al., 2001; CHALER et al., 2004). Contaminantes como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), organoclorados (OC), bifenilas policlorados (BPC), metais traços (zinco, cádmio, chumbo, arsênio), esteróides, surfactantes, nonilfenóis, petróleo e seus produtos refinados e derivados de detergentes como os alquilbenzenos lineares (ABL), podem estar presentes em efluentes domésticos (SCANES, 1996; GIBSON et al., 2005; PENG et al., 2005). Também são encontrados nestes despejos, fármacos e produtos de higiene pessoal, como por exemplo, ibuprofeno, aspirina, antibióticos (sulfonamidas e macrolidas), reguladores de colesterol (clofibratos e estatinas), β -bloqueadores (propranolol), drogas neuroativas (caféina, carbamazepina, fluoxetina e morfina), perfumes e outros compostos (GAGNÉ et al., 2007). Esses contaminantes não necessitam ser persistentes no ecossistema para causar efeitos negativos, visto que são introduzidos continuamente no ambiente (PETROVIC et al., 2003).

Efluentes domésticos podem conter também substâncias capazes de interferir com o sistema hormonal de animais, denominados como desreguladores endócrinos

(EDC) (QUINN et al., 2004). Alguns EDC são compostos químicos que imitam atividades estrogênicas através de sua ligação aos receptores de estrógeno. Estrógenos naturais, como fitoestrógenos e esteróides naturais principalmente excretados por humanos podem induzir efeitos estrogênicos em animais aquáticos. Nos últimos anos um número crescente de compostos químicos industriais, como os fenóis, ftalatos, BPC e OC têm sido reconhecidos como potenciais desreguladores endócrinos (LYE, 2000). Além disso, pode haver interações sinérgicas entre os compostos estrogênicos naturais e sintéticos, amplificando os efeitos estrogênicos dos efluentes urbanos (CURIEUX-BELFOND et al., 2005). O hormônio sintético etinilestradiol (EE₂) é prescrito como contraceptivo oral para milhões de mulheres em todo o planeta. Sua afinidade pelo receptor de estrógeno é maior do que o hormônio natural 17-β-estradiol. A presença de EE₂ é regularmente detectada em efluentes (CROLEY et al., 2000) e causa a feminilização de machos (METCALFE et al., 2001), levando a uma diminuição do sucesso reprodutivo de algumas espécies de peixes (MATTHIESSEN e LAW, 2002).

Patógenos, principalmente entéricos, como vírus e bactérias também são encontrados em efluentes domésticos em concentrações elevadas associado a um alto teor de matéria orgânica, o que favorece seu desenvolvimento nos locais de descarte. Em termos epidemiológicos a contaminação de ambientes aquáticos por patógenos constitui-se um veículo potencial de dispersão de microrganismos, causadores de uma série de doenças, tanto de origem viral quanto bacteriana (PARASHAR et al., 2003).

A inexistência de rede geral de esgoto compromete o ambiente e, conseqüentemente, a saúde da população que utiliza rios, lagos, lagoas e solo contaminados por esgoto lançado *in natura* (IBGE, 2000). Embora alguns países desenvolvidos tenham melhorado a qualidade de seus efluentes, esta prática não é comum ao redor do mundo. Entre os serviços de saneamento básico, o esgotamento sanitário é o que tem menor presença nos municípios brasileiros. Dos 4.425 municípios existentes no Brasil, em 1989, menos da metade (47,3%) possuía algum tipo de serviço de esgotamento sanitário e, 11 anos mais tarde, os avanços não foram muito significativos: de 5.507 municípios, apenas 52,2% eram servidos. Apesar de ter havido um aumento de, aproximadamente, 24% no número de municípios no período de 1989-2000, o serviço de esgotamento sanitário não

acompanhou este crescimento, pois aumentou apenas 10% (IBGE, 2000). O Brasil apresenta mais de 2/3 da sua população vivendo ao longo da costa, sendo que a mesma não dispõe de sistemas apropriados de captação, tratamento e lançamento de esgoto (ABESSA et al., 2005). Em regiões urbanas, estima-se que somente cerca de 51,6% do esgoto total seja coletado e deste, apenas 35,3% passe por algum sistema de tratamento (IBGE, 2000). No Estado de Santa Catarina, uma pesquisa recente realizada pelo Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento demonstrou que apenas 9,69% da população catarinense são atendidas pela rede de coleta de esgoto (AZEVEDO, 2008). Segundo a Secretaria de Estado do Desenvolvimento Sustentável, apenas 7% da população urbana possuem coleta de esgoto e somente uma parte desta, é tratada (PARODI, 2006). A região da Grande Florianópolis tem as melhores redes de coleta, porém beneficia apenas 25,04% dos habitantes, uma média bastante abaixo do índice brasileiro, que é de 56% (RIBEIRO, 2008). Geralmente, o esgoto é despejado *in natura* nos corpos de água ou no solo, comprometendo a qualidade da água utilizada para o abastecimento, irrigação e recreação. Do total de distritos que não tratam o esgoto sanitário coletado, a grande maioria (84,6%) despeja o esgoto nos rios (IBGE, 2000).

Considerando que algumas áreas potencialmente contaminadas da costa brasileira e particularmente no Estado de Santa Catarina estão associadas a zonas de mitilicultura, ostreicultura, pesca, recreação e abastecimento, o monitoramento da contaminação destas regiões requer uma atenção especial. O aumento na variedade e complexidade dos problemas causados pelos despejos de efluentes municipais e industriais no ambiente gerou a necessidade de proteger seus recursos hídricos e avaliar as condições de seus sistemas físicos, químicos e biológicos (KENNISH, 1991). Com isso, o monitoramento dos lançamentos deste tipo de efluente e seu efeito potencial sobre os organismos aquáticos deve se tornar uma ferramenta importante não somente na conservação de ambientes aquáticos, mas ainda na prevenção de acidentes ambientais, na fiscalização e na implementação de projetos para a recuperação de ambientes impactados por esgoto doméstico, e preservação da qualidade dos recursos biológicos para consumo humano.

1.2 Biomarcadores

A ecotoxicologia é uma ciência interdisciplinar que lida com as interações entre contaminantes lançados no ambiente e a biota, analisando os efeitos adversos causados nos diferentes níveis de organização biológica (FENT, 2004). Nos últimos anos foi estabelecido por organizações internacionais e agências ambientais, que avaliações de impacto ambiental não podem ser baseadas somente na análise química de amostras do ambiente porque essa abordagem não proporciona qualquer indicação dos efeitos deletérios causados pelos contaminantes na biota (CAJARAVILLE et al., 2000). Para avaliar os efeitos tóxicos causados pela presença dos contaminantes no ambiente aquático, diferentes tecnologias alternativas têm sido desenvolvidas, dentre as quais destacam-se os biomarcadores. Segundo Walker e colaboradores (2001), biomarcadores são alterações biológicas à nível molecular, celular e fisiológico que expressam os efeitos tóxicos causados pelos poluentes. Grupos de trabalho formados por pesquisadores e políticos de vários países, tais como o ICES (Conselho Internacional Para a Exploração do Mar), têm recomendado que o monitoramento marinho incorpore a análise de biomarcadores bioquímicos e moleculares (BURGEOT et al., 1996). A principal vantagem do uso de biomarcadores na avaliação ambiental sobre as análises químicas se deve ao fato de serem obtidas informações a respeito dos efeitos biológicos causados pelas substâncias tóxicas. A análise destes biomarcadores apresenta na maioria dos casos, menor custo, maior facilidade e rapidez do que as análises químicas convencionais (GALLOWAY et al., 2004). Contudo, para padronizar o procedimento analítico e estabelecer a aplicabilidade do uso de biomarcadores no monitoramento ambiental é necessário um conhecimento profundo das suas funções biológicas e as possíveis variações naturais que possam influenciar essas respostas (RICCIARDI et al., 2006). Uma das principais características dos biomarcadores celulares e moleculares é o seu potencial de antecipar mudanças em níveis maiores de organização biológica, seja em nível de população, comunidade ou ecossistema. Dentre estes, os biomarcadores moleculares ou bioquímicos apresentam a vantagem de servirem como sinais precoces da degradação ambiental causadas pelos contaminantes (RAND, 1995).

A resposta biológica é ativada rapidamente pelo organismo modelo selecionado (de poucos minutos a poucas horas) permitindo a análise dos

xenobióticos do ambiente antes que os efeitos negativos de toda comunidade se tornem evidentes (RICCIARDI et al., 2006). Esta característica pode definir os biomarcadores como indicadores de curto prazo de efeitos biológicos a longo prazo. O uso de biomarcadores foi incorporado em diversos programas de monitoramento de poluição na Europa e EUA, como o *North Sea Task Force Monitoring Master Plan* e o *NOAA's National Status and Trends Program* (CAJARAVILLE et al., 2000).

1.3 Ostra-do-pacífico *Crassostrea gigas*

A fim de monitorar a contaminação dos ecossistemas aquáticos, estudos têm utilizado diferentes organismos sentinela (BEEBY, 2001). Neste sentido, moluscos bivalves têm sido amplamente adotados, uma vez que apresentam ampla distribuição geográfica, são filtradores, cosmopolitas, sésseis e, portanto estacionários, frequentemente eurialinos e espécies dominantes em seu hábitat (BAINY et al., 2000; CAJARAVILLE et al., 2000; CHEUNG et al., 2002; LAU e WONG, 2003). Uma das espécies mais estudadas e cultivadas no mundo é a ostra do pacífico ou ostra japonesa *Crassostrea gigas* (SAAVEDRA e BACHERE, 2006). A ostra *C. gigas* apresenta concha sólida, extremamente enrugada e laminada. A forma da concha varia muito com o ambiente e a cor é geralmente esbranquiçada por fora e branca por dentro. Apresenta um único músculo adutor que pode ser escuro, mas nunca púrpura ou preto, característica que a difere da espécie *Crassostrea virginica*. É uma espécie cosmopolita tendo ocorrência registrada no Japão, Coréia, Sibéria, Estados Unidos, Canadá e Austrália. Atualmente foi introduzida em outros países e é uma das espécies mais cultivadas no mundo.

Segundo Saavedra e Bachere (2006), foi estabelecido recentemente um consórcio internacional para a identificação e sequenciamento de genes da ostra *C. gigas*. Assim, esta espécie constitui-se em um ótimo modelo para estudos moleculares, uma vez que possui um grande repertório de genes identificados, sequenciados e utilizados em estudos de expressão gênica, se comparada a outros bivalves. A ostreicultura é um dos ramos da aquicultura mais importantes economicamente no mundo, conforme mostra a Figura 1. Além dos habitats em costas marítimas, os bivalves são adaptados a uma variedade de outros ambientes, como mares profundos com baixa luminosidade e águas turvas pobres em oxigênio. Contudo, as bases fisiológicas e moleculares dessas adaptações ainda são pouco

conhecidas. Neste sentido, grande parte dos estudos genômicos com bivalves têm sido realizados com animais do gênero *Crassostrea* (SAAVEDRA e BACHERE, 2006), como mostra a Figura 2.

Este trabalho está dividido em dois capítulos. No primeiro capítulo são apresentados os resultados de experimentos realizados com ostras *C. gigas* expostas em um ambiente contaminado por esgoto doméstico. Foi analisada a expressão de cinco genes em brânquias de *C. gigas*, em quatro períodos de exposição, através da técnica de PCR em tempo real.

No segundo capítulo estão apresentados os resultados e uma discussão sobre os genes ativados e identificados em uma biblioteca subtrativa supressiva de cDNA de glândula digestiva de ostras *C. gigas* expostas por 24h no ambiente, sob condições de exposição real ao esgoto doméstico não tratado. Ambos capítulos complementares dão sequência aos estudos que vêm sendo desenvolvidos no Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica, do Núcleo de Estudos em Patologia Aquícola, que visam a identificação e validação de novos biomarcadores de exposição ao esgoto doméstico em ostras para que possam ser futuramente utilizadas em programas de avaliação e biomonitoramento dos efeitos tóxicos causados por estes contaminantes.

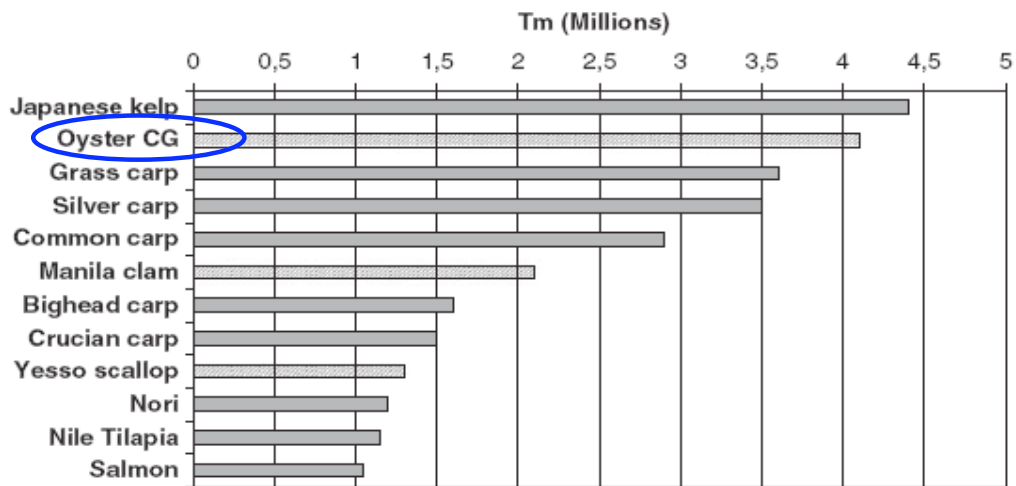


Figura 1: Produção mundial das 12 espécies mais cultivadas na aquicultura no ano de 2002. As barras claras representam moluscos bivalves. Em destaque a produção de ostras *Crassostrea gigas* no período (Fonte: SAAVEDRA e BACHERE, 2006).

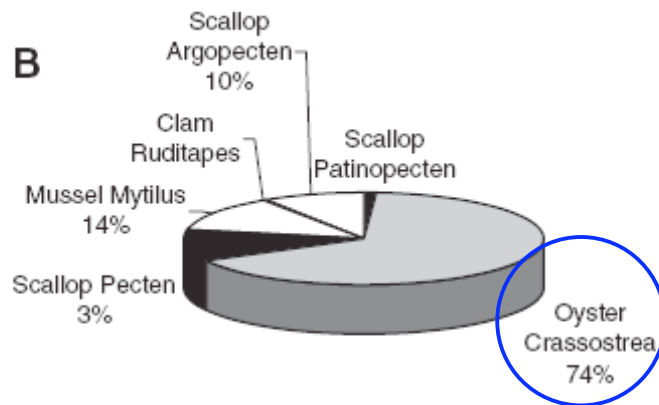


Figura 2: Porcentagem de sequências nucleares de DNA presentes no *GenBank* (excluindo microssatélites), por espécie ou gênero de moluscos. Porcentagens menores que 1% não representadas. Gênero *Crassostrea* em destaque (Fonte: SAAVEDRA e BACHERE, 2006).

CAPITULO I:
TESTE *IN SITU* DO USO DE BIOMARCADORES MOLECULARES DE
EXPOSIÇÃO A ESGOTO DOMÉSTICO ATRAVÉS DA AVALIAÇÃO
DA EXPRESSÃO GÊNICA POR PCR EM TEMPO REAL

1. INTRODUÇÃO

1.1 PCR em tempo real

No final da década de 90, um novo método quantitativo de diagnóstico, o PCR quantitativo em tempo real (qPCR), passou a ser utilizado para a quantificação de vírus em humanos, como por exemplo, hepatite B (CANE et al., 1999) e HIV (LEWIN et al., 1999). A simplicidade conceitual e prática, em conjunto com a combinação de velocidade, sensibilidade, e especificidade em um mesmo ensaio, tornaram a técnica de qPCR como referência para a quantificação de ácidos nucleicos (BUSTIN et al., 2009) e uma poderosa ferramenta para quantificação da expressão gênica (SCHMITTGEN e LIVAK, 2008). O acúmulo de produtos da PCR é detectado e monitorado diretamente pela leitura do aumento da fluorescência do composto fluorescente utilizado, enquanto na PCR tradicional os produtos precisam ser posteriormente analisados por eletroforese. O principal fundamento na utilização deste método é o chamado limiar do ciclo, ou *threshold cycle* (CT). O CT é definido como o ciclo da reação de PCR no qual o sinal fluorescente do corante sinalizador atravessa uma linha arbitrária denominada limiar, conforme ilustrado na Figura 3. Para apresentar os dados na forma de CT, deve-se certificar que o limiar está delimitado na fase exponencial de amplificação, acima do ruído de fundo e abaixo da fase de platô da reação de PCR. O valor numérico do CT é inversamente proporcional a quantidade inicial do transcrito de interesse na reação, ou seja, quanto menor o valor de CT, maior a quantidade inicial do transcrito na amostra (SCHMITTGEN e LIVAK, 2008).

Existem dois diferentes métodos para se analisar os resultados de um experimento utilizando PCR em tempo real: quantificação absoluta e quantificação relativa. Quantificação absoluta determina o número exato de cópias do transcrito de interesse, geralmente relacionando o sinal da PCR a uma curva padrão. Já a quantificação relativa descreve a alteração na expressão do gene alvo relativa a algum grupo referência como um controle não-tratado ou uma amostra tempo zero. Quantificação absoluta é utilizada quando se precisa conhecer a quantidade de amplicons, por exemplo, na quantificação em cálculos de carga viral. O custo x benefício da quantificação absoluta é menor devido ao maior número de horas

dedicadas às análises e ao maior gasto com reagentes, necessários para gerar as curvas padrões (SUDGEN e WINTER, 2008).

Em muitos casos é desnecessário apresentar os dados como número absoluto de cópias, sendo suficiente a expressão relativa dos mesmos. Por exemplo, se um tratamento aumenta a expressão de um gene em particular de 10.000 para 50.000 cópias por célula, é mais interessante apresentar o resultado como um aumento de cinco vezes na expressão gênica (SCHMITTGEN e LIVAK, 2008). Ensaio de expressão gênica relativa são tipicamente relacionados a um gene controle interno como gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase ou β -actina, para normalizar as diferenças nas quantidades de RNAm. Essa quantidade pode variar devido a diferenças na massa tecidual, número celular, tratamento experimental, eficiência na extração de RNA e/ou síntese de cDNA. Uma das condições necessárias para que um gene possa ser considerado como controle interno é que as condições do experimento não influenciem sua expressão (SCHMITTGEN e ZAKRAJSEK, 2000). Em condições ideais, a eficiência da reação é 100% ($E = 1$), com a quantidade de produto gerado crescendo exponencialmente, dobrando a cada ciclo da PCR. Na prática, a eficiência da amplificação observada é frequentemente menor que 100%, podendo variar substancialmente (SUDGEN e WINTER, 2008).

A eficiência da reação depende de muitos fatores, incluindo as sequências dos iniciadores, o tamanho dos amplicons, sua composição de GC, e presença de impurezas nas amostras (MCDOWELL et al., 1998). Esses fatores afetam o anelamento dos iniciadores, o ponto de dissociação da sequência alvo e o processamento da enzima *Taq* polimerase. Para utilizar o método de CT comparativo é necessária a otimização das reações para que as eficiências fiquem próximas de 100% e também a certificação de que a eficiência da reação do gene de interesse é similar a do gene controle interno (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001). Entre as vantagens do método comparativo de CT estão a facilidade de aplicação do método e a possibilidade de apresentação dos dados através do aumento em vezes na expressão. As desvantagens do método comparativo de CT incluem a obrigação das eficiências de PCR serem muito próximas ou iguais, o que requer uma otimização prévia (SCHMITTGEN e LIVAK, 2008).

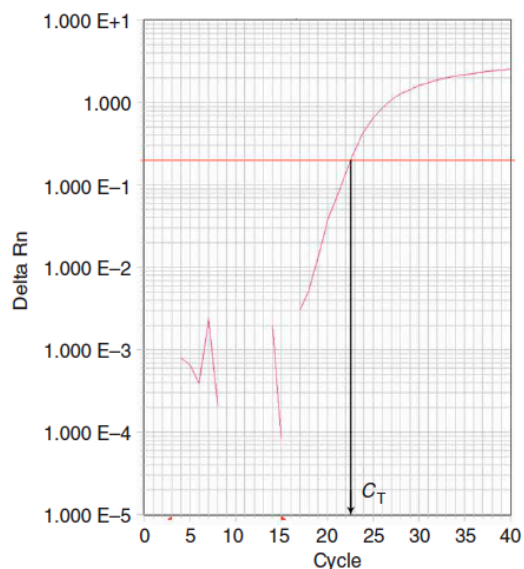


Figura 3: Exemplo de delimitação de limiar e determinação do valor de CT. Dados típicos de uma reação de PCR em tempo real com 40 ciclos. O ponto em que a curva encontra o limiar (linha horizontal vermelha) é o CT. No exemplo o CT é 22,5 (Fonte: SCHMITTGEN e LIVAK, 2008).

Como exemplo, em um estudo onde se deseja calcular a expressão gênica relativa em duas amostras diferentes (amostra A como grupo tratado e amostra B como grupo não tratado), onde cada amostra é relativizada a um gene de controle interno, a equação ficaria:

$$2^{-\Delta\Delta CT} = \frac{[(CT \text{ gene de interesse} - CT \text{ gene controle}) \text{ amostra A} - (CT \text{ gene de interesse} - CT \text{ gene controle}) \text{ amostra B}]}{}$$

Não importa qual valor de CT é utilizado em primeiro ou segundo na equação, contudo a ordem afeta como os resultados são interpretados. Schmittgen e Livak (2008) recomendam nomear o controle não-tratado ou indivíduo normal como calibrador. Nesse caso os dados podem ser interpretados como “a expressão do gene de interesse relativa ao controle interno na amostra tratada em comparação com o controle não-tratado”.

O uso de PCR em tempo real para medir níveis de expressão de RNA mensageiros específicos requer o isolamento de RNA, conversão do mesmo em cDNA pela enzima transcriptase reversa e finalmente a amplificação e detecção dos produtos gerados em tempo real. Diferentes estratégias de detecção de fluorescência foram desenvolvidas. Estas incluem o uso de corantes “não-

específicos” ligantes ao DNA, como *SYBR Green I*, e uma variedade de métodos baseados em sondas que confiam na hibridização de uma sonda específica fluorescente a uma sequência única do amplicom. Os métodos baseados em sondas tem um grande potencial em ensaios com múltiplos genes em uma mesma reação, contando com a capacidade de muitos aparelhos de PCR em tempo real de medir sinais gerados por múltiplos fluoróforos simultaneamente (SUDGEN e WINTER, 2008). A metodologia de sondas específicas muitas vezes é considerada de maior confiabilidade, porém apresenta um custo maior.

SYBR Green I é um corante que se liga a volta menor do DNA (MORRINSON et al., 1998). Em solução (não ligada ao DNA) sua fluorescência é baixa mas quando se liga ao DNA dupla fita, a fluorescência aumenta. Comparado a outros compostos químicos disponíveis para PCR em tempo real, *SYBR Green I* é a opção mais econômica, além de dispensar a síntese de uma sonda específica, e pode ser usada com qualquer par de iniciadores utilizados em reações de PCR. É possível realizar ensaios com iniciadores desenhados para PCR convencionais, contudo, é recomendado o desenho de novos iniciadores, específicos para ensaios de PCR em tempo real (SUDGEN e WINTER, 2008). A medida que a reação de PCR progride, uma maior quantidade de *SYBR Green I* liga-se aos amplicons dupla-fita gerados, aumentando a fluorescência proporcionalmente à concentração do produto. A fluorescência é medida em cada ciclo, no final da etapa de extensão.

Ensaio de quantificação em tempo real utilizando *SYBR Green I* são tão sensíveis quanto qualquer uma das que utilizam estratégias de sondas específicas fluorescentes. Uma das desvantagens de usar *SYBR Green I* é que ele não detecta somente o alvo específico, mas também qualquer produto não específico que possa ser amplificado, como dímeros de iniciadores. Isto pode ser facilmente evitado desenhando-se iniciadores específicos de qualidade. Em qualquer um dos casos é possível verificar a identidade do produto de todas amostras amplificadas através da análise da curva de dissociação, disponível na maioria dos aparelhos de PCR em tempo real. No final da amplificação, a temperatura do instrumento é regulada para 50°C, permitindo que todos os produtos dupla fita se anelem ao *SYBR Green I*, obtendo um sinal máximo de fluorescência.

O aparelho é então programado para aumentar a temperatura lentamente (0.1-1 °C/s) enquanto o sinal de fluorescência é constantemente monitorado. Se

somente um produto simples foi gerado durante a reação de PCR, a fluorescência medida irá cair dramaticamente assim que todos amplicons idênticos desnaturarem, ou seja, quando a temperatura de dissociação dos produtos é atingida. É construído um gráfico contendo a relação entre a primeira derivada negativa (a taxa de variação da fluorescência em relação a temperatura, $-dF/dT$) e a temperatura, gerando um pico para amplicons idênticos. Se dímeros de iniciadores são formados, estes geralmente produzem o pico de dissociação em uma temperatura mais baixa, já que são de tamanho menor que os produtos verdadeiros.

1.2 Genes candidados a biomarcadores de exposição a esgoto doméstico

No presente trabalho foram verificadas as expressões gênicas relativas de cinco diferentes genes em ostras *C. gigas* expostas a esgoto doméstico *in situ*, na Baía Norte da Ilha de Santa Catarina, utilizando a técnica de PCR em tempo real. Os genes analisados são referentes a uma biblioteca subtrativa gerada no Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica (MEDEIROS et al., 2008a), onde ostras *C. gigas* foram expostas a esgoto doméstico em aquários por 48 horas. Os genes referentes a Proteína ligante de ácidos graxos (FABP), Glutathione S-transferase classe ômega (GSTO), Citocromo P450 família 356A1 (CYP356A1), Proteína de resistência a multidrogas (MDR) e δ -Aminolevulinato sintase (ALAS) foram identificados na biblioteca como tendo sua expressão aumentada pela exposição ao esgoto doméstico.

1.2.1 Proteína ligante de ácidos graxos (FABP)

Os variados tipos de ácidos graxos exercem diferentes funções no organismo. Eles são importantes fontes de energia e também são utilizados na formação de lipídeos complexos, como fosfolipídeos. Ainda, alguns ácidos graxos pode, agir como hormônios e compostos sinalizadores, conforme modificam proteínas específicas. A associação destas moléculas hidrofóbicas com albumina, lipocalinas e proteínas ligantes de ácidos graxos aumenta consideravelmente sua solubilidade em água e assim facilita seu transporte (CHMURZYNSKA, 2006). Proteínas ligantes de ácidos graxos (FABP) são pequenas proteínas citosólicas (14-15 kDa) que se ligam não-covalentemente a ligantes hidrofóbicos, principalmente ácidos graxos de cadeia longa e colesterol (ESTEVEZ e EHLRICH, 2006). Inúmeros tipos de FABP foram

identificados em vertebrados e nomeados conforme o tecido na qual eles predominantemente ocorrem. Estas proteínas desempenham um papel funcional no transporte intracelular e metabolismo de lipídeos. As FABP transportam uma variedade de compostos hidrofóbicos além dos ácidos graxos, desde moléculas endógenas como o grupo heme, ácidos biliares e eicosanóides, até drogas exógenas e poluentes ambientais (STORCH e THUMSER, 2000; ESTEVES e EHLRICH, 2006). Contudo, a alta concentração de FABP em hepatócitos e enterócitos (~3-6% de todas as proteínas citoplasmáticas) excede a concentração de ácidos graxos disponíveis. Assim, novas funções biológicas como participação na transdução de sinal e regulação da expressão gênica estão sendo investigadas (STORCH e THUMSER, 2000; ESTEVES e EHLRICH, 2006). As FABP são necessárias para transportar ácidos graxos de cadeia longa para os fatores de transcrição PPAR (receptor ativado de proliferação peroxissomal) quando ativados por ligante (PLANT, 2004). Membros da família PPAR são receptores nucleares conhecidos por regular a transcrição de muitos genes envolvidos no metabolismo lipídico (CHMURZYNSKA, 2006).

1.2.2 Citocromo P450 família 356A1 (CYP356A1)

A principal resposta dos organismos aos contaminantes é a detoxificação destes xenobióticos em compostos biologicamente inativos e facilmente excretáveis. Essa rota do metabolismo emprega diversas enzimas e é normalmente dividida em duas fases, conhecida como fase I ou de reações funcionais, e fase II ou de reações conjugativas (PETUSHOK et al., 2002; GONZALEZ, 2005). A família dos citocromos P450 (CYP) é considerada uma das maiores e mais versáteis famílias de proteínas pertencentes ao metabolismo de fase I de uma variedade de xenobióticos lipofílicos como drogas, pesticidas e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (REWITZ et al., 2006). Os CYP são encontrados desde bactérias até humanos, e apresentam diversas isoformas em cada espécie (SNYDER, 1998). Muitos CYP possuem, contudo, funções endógenas, sendo especializadas no metabolismo de moléculas sinais, como hormônios esteróides, eicosanóides e ferormônios (REWITZ et al., 2006). Uma característica importante em várias isoformas de CYP é sua indutibilidade ou potencial inibição pela exposição a determinados xenobióticos.

Estudos anteriores realizados em nosso laboratório com ostras expostas a esgoto doméstico em laboratório identificaram uma nova isoforma de citocromo P450, classificada pelo Dr. David Nelson (Universidade do Tennessee) como CYP356A1. A análise filogenética da isoforma CYP356A1 demonstrou uma relação próxima com as subfamílias CYP1 e CYP17 (TOLEDO-SILVA et al., 2008). CYP356A1 pode ser classificada como integrante do Clã 2 dos CYP450 (CYP17-like) de invertebrados, com 32-36% de identidade de aminoácidos com CYP17s de vertebrados. A família CYP17 está associada ao metabolismo de esteróides. Halm e colaboradores (2003) afirmam que o papel central exercido pelo CYP17 na produção de esteróides sexuais o caracteriza como alvo potencial para compostos desreguladores endócrinos. Contudo, CYP356A1 também apresenta uma menor porcentagem de identidade (30-33%) com os genes CYP1 e CYP2. As famílias CYP1 e CYP2 metabolizam uma ampla variedade de compostos, incluindo derivados de petróleo (ARUKWE et al., 2008). A isoforma CYP1A1, a mais estudada do ambiente marinho, é induzida por dioxinas, HPA, BPC, naftalenos policlorados e compostos relacionados (LAM e GRAY, 2003). Boutet e colaboradores (2004) encontraram indução da expressão de duas isoformas de P450 (CYP3A4 e CYP1A1-like) em *C. gigas* expostas a hidrocarbonetos. Nenhum gene CYP17 foi encontrado em invertebrados não-cordados, contudo CYP17 está presente em anfioxos (MIZUTA e KUBOKAWA, 2007), e genes CYP17-like foram identificados no genoma do ouriço-do-mar, *Strongylocentrotus purpuratus* (GOLDSTONE et al., 2006). De maneira semelhante, genes CYP1 e CYP1-like foram detectados em tunicados (subfamílias CYP1E e CYP1F, GOLDSTONE et al., 2007) e ouriços-do-mar (GOLDSTONE et al., 2006, 2007), mas nenhuma sequência de CYP1 foi encontrada em invertebrados não-deuterostômios.

1.2.3 Glutathione S-transferase classe ômega (GSTO)

Glutathione S-transferases (GST) são uma família multigênica de enzimas que exercem um papel crítico na detoxificação de eletrófilos exógenos e endógenos, assim como produtos do estresse oxidativo. Tóxicos ambientais detoxificados pelas GST incluem HPA, pesticidas, e intermediários reativos produzidos pelas enzimas de biotransformação de fase I e outras reações bioquímicas (RICHARDSON et al., 2009). Estas enzimas são responsáveis pela conjugação do tripeptídeo glutathione

com moléculas eletrofílicas endógenas e xenobióticos aumentando sua solubilidade em água e facilitando assim sua excreção (SAMPAYO-REYS e ZAKHARYAN, 2006; BURMEISTER et al., 2008). As GST citosólicas também participam do catabolismo ou síntese de uma variedade de compostos endógenos. Outras funções realizadas por membros da superfamília GST incluem a síntese de eicosanóides, a ligação e transporte de ligantes como bilirubina e grupo heme, e a mediação de sinais regulatórios através de interações proteína-proteína (BURMEISTER et al., 2008). Os níveis de expressão das GST e os fatores que o modulam tem um importante significado biológico e implicações clínicas (BOARD et al., 2000). As GST constituem uma superfamília versátil, agrupadas em pelo menos 10 classes, envolvidas em variados aspectos da defesa celular.

As glutionas S-transferases de classe ômega (GSTO) foram recentemente classificadas e são amplamente distribuídas nas espécies, de *Caenorhabditis elegans* até humanos (BOARD e ANDERS, 2007). As GST classe ômega tem uma extensão *N*-terminal única, e a estrutura cristalina revelou um sítio ativo de resíduo de cisteína distinto dos resíduos de tirosina e serina característicos das outras GST eucarióticas (BOARD et al., 2000). Segundo Board e Anders (2007) houve interesse considerável pelas GST de classe ômega após a descoberta de seu papel na redução de espécies metiladas de arsênio e sua ligação genética com doenças humanas como Alzheimer e Parkinson. A GSTO realiza a transferência de tiol dependente de glutationa, e está associada à transformação de compostos carcinógenos, drogas terapêuticas e produtos do estresse oxidativo (SAMPAYO-REYES e ZAKHARYAN, 2006). As GST de classe ômega humanas apresentam atividade de tioltransferase, redutase de dehidroascorbato e redutase de monometilarsonato, todas dependentes do sítio ativo de resíduo de cisteína. Essas reações não são catalizadas por outras classes de GST (SCHMUCK et al., 2005).

1.2.4 Proteína de resistência a múltiplas drogas (MDR)

O gene MDR codifica um transportador de fase III, e possui um papel importante no mecanismo MXR (mecanismo de resistência a xenobióticos), auxiliando a expelir para fora das células contaminantes com toxicidade já reduzida (BARD, 2000; MINIER et al., 2002). Estudos ontogenéticos mostraram que a expressão e atividade do sistema MXR em ostra *C. gigas* começam na transição

entre os estágios iniciais de desenvolvimento (MINIER et al., 2002). Nesse estágio, as ostras já formaram todos os tecidos, incluindo brânquias, um órgão essencial para respiração, seleção de alimentos e biotransformação de xenobióticos, o que torna o mecanismo MXR ecologicamente importante em áreas poluídas (MEDEIROS et al., 2008b). O sistema MDR/MXR é bem caracterizado em mexilhões e foi descrito para a ostra *C. gigas* (MINIER et al., 2002). O gene MDR-1 de humanos codifica a glicoproteína-P (P-gp), proteína transmembrana de 170 kDa responsável pelo transporte ativo de drogas e xenobióticos para fora do ambiente celular (VAALBURG et al., 2005). A P-gp faz parte da superfamília de proteínas transmembrana transportadoras, conhecidas como transportadores ABC (*ATP-binding cassette*). Muitos compostos servem como substratos para a P-gp, sendo que a maioria deles tendem a ser compostos naturais moderadamente hidrofóbicos e planares, que podem ser substratos ou metabólitos das enzimas de biotransformação (BARD, 2000). A ação conjunta da P-gp e do citocromo P450 em organismos aquáticos foi revisada por Bard (2000). Este estudo mostra que as isoformas CYP1A e CYP3A e a P-gp podem apresentar uma co-indução ou uma redução inversa e que este comportamento depende da espécie, tecido e sexo do organismo. Deste modo a P-gp e os CYP podem ter papel complementar na metabolização e transporte dos xenobióticos, podendo atuar em conjunto ou não.

1.2.5 δ-Aminolevulinato sintase (ALAS)

Em animais, fungos e bactérias, a via de biosíntese do grupamento heme começa com a formação de ácido aminolevulínico pela enzima δ-Aminolevulinato sintase (ALAS) (SCHULZE et al., 2006). A enzima ALAS catalisa a condensação de succinil-CoA e glicina produzindo ácido aminolevulínico (DUNCAN et al., 1999). A disponibilidade de moléculas heme pode ser um fator limitante para biotransformação de xenobióticos e outros processos importantes, devido ao fato deste grupo prostético ser necessário a outras enzimas, como citocromos, catalase, e proteínas, como hemoglobina e mioglobina (ATAMNA, 2006; TSIFTSOGLU et al., 2006). Estudos recentes conduzidos *in vivo* confirmaram que a indução de ALAS é mediada em parte por receptores nucleares que também modulam isoformas de CYP450 (FRASER et al., 2003).

1.3 Análise da expressão gênica por PCR em tempo real

Utilizando a técnica de PCR semi-quantitativo foi verificado que estes cinco genes apresentaram uma aumento na expressão em brânquias de *C. gigas* após uma exposição de 48 h a esgoto em laboratório (MEDEIROS et al., 2008b). Contudo, quando essa mesma metodologia foi adotada em animais mantidos por 14 dias em um ambiente contaminado por esgoto doméstico na Baía Norte da Ilha de Santa Catarina, nenhuma alteração na expressão destes genes foi observada. Assim decidiu-se repetir este experimento em períodos de tempo menores (1, 2, 7 e 14 dias) e utilizar a técnica de qPCR para verificar se estes genes analisados nas brânquias das ostras expostas podem ou não ser utilizados como potenciais biomarcadores de contaminação causada por esgoto doméstico.

2.OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

- Analisar a expressão de genes em ostras *C. gigas* expostas a esgoto doméstico *in situ*, na foz do Rio Bücheler, na Baía Norte da Ilha de Santa Catarina.

2.2 Objetivos específicos:

- Analisar a expressão dos genes FABP, CYP356A1, GSTO, MDR e ALAS em ostras *C.gigas* expostas a esgoto doméstico *in situ*;
- Comparar a expressão destes genes nos organismos mantidos no local contaminado com os do local referência através do método de $\Delta\Delta CT$ comparativo, nos quatro períodos de exposição (1, 2, 7 e 14 dias);
- Correlacionar os parâmetros moleculares com os contaminantes presentes nos dois grupos de animais.

3. METODOLOGIA

3.1 Área de estudo e desenho experimental

A Baía Norte da Ilha de Santa Catarina é um corpo de água semi-confinado que separa o continente da Ilha de Santa Catarina. Em seu extremo norte comunica-se com o oceano, enquanto em seu extremo sul, através de uma pequena constricção, comunica-se com a Baía Sul. O local escolhido como a área que recebe o impacto de efluentes contendo esgoto doméstico (contaminado) situa-se na foz do Rio Bücheler, que possui cerca de 1.800 m desde seu início até sua foz, com uma largura aproximada de 5 m (Figura 4). O Rio Bücheler drena uma pequena bacia hidrográfica altamente urbanizada com uma concentração predominante de residências, condomínios e comércio. Possui um reduzido volume de água, é constantemente assoreado e poluído, e descarga suas águas na Baía Norte justamente na divisa entre os municípios de São José e Florianópolis. Este efluente contém resíduos líquidos e sólidos. A outra área de estudo (referência) situa-se nas proximidades da Pedra das Tipitingas, distante cerca de 5.500 m do local contaminado e cerca de 2.200 m do continente, 4.700 m do Rio Biguaçu e 2.500 m do Rio Carolina, outras fontes possíveis de contaminantes nesta Baía (Figura 4). A escolha destes locais foi baseada em dados de coliformes fecais obtidos em estudos anteriores realizados desde agosto de 2005, pelo Centro Municipal de Educação Ambiental Escola do Mar, Prefeitura de São José, SC. Este estudo confirmou a existência de um gradiente de contaminação por coliformes totais e fecais entre estes locais.

As ostras *C. gigas* utilizadas neste estudo (6–7 cm) foram obtidas na estação de cultivo do Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM/UFSC), na Praia de Sambaqui e transportadas para os locais de monitoramento onde permaneceram por até 14 dias acondicionadas em mini-balsas. As ostras foram retiradas em quatro diferentes tempos de exposição: 1, 2, 7 e 14 dias. Cada mini-balsa continha gaiolas flutuantes onde os animais (n=40) permaneceram submersos a 10 cm da superfície.

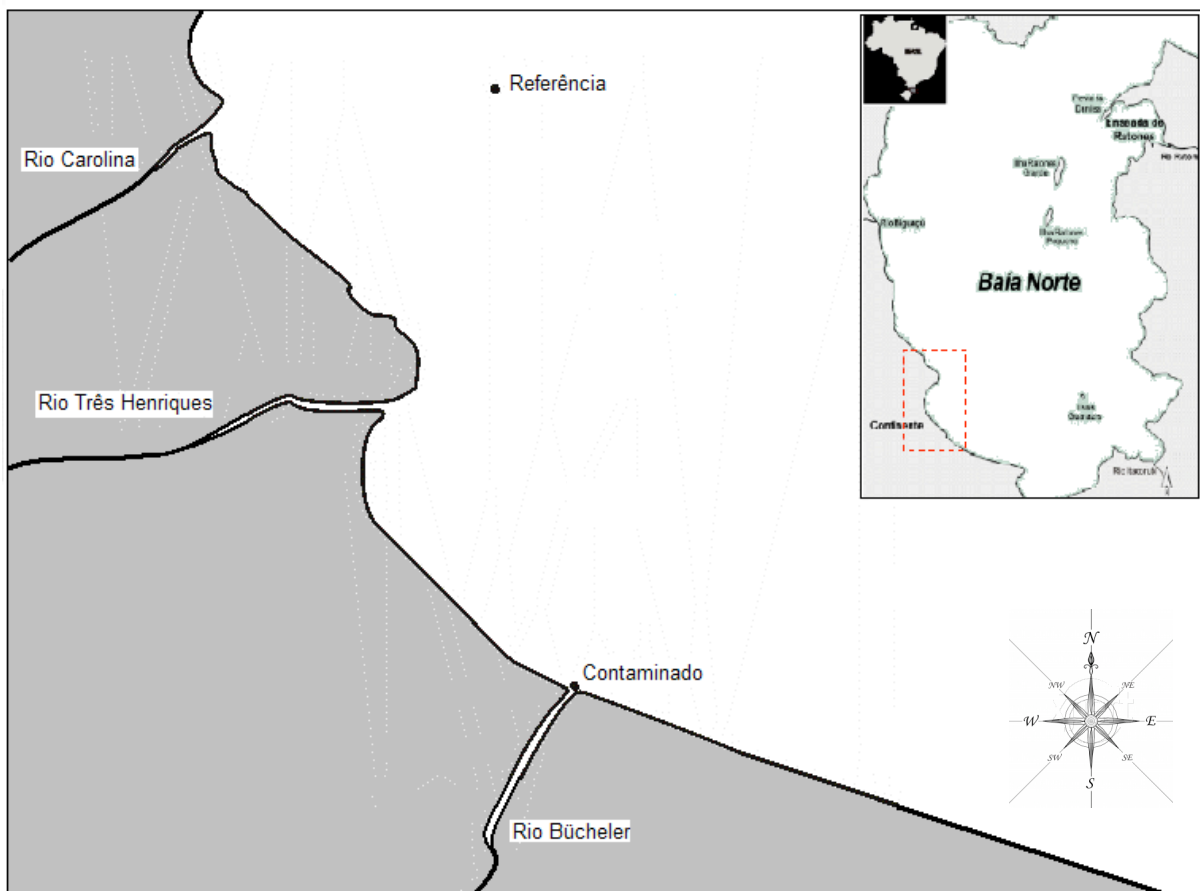


Figura 4: Localização dos locais de exposição das ostras *Crassostrea gigas* na Baía Norte da região da Grande Florianópolis, SC, Brasil. O ponto contaminado (foz do Rio Bücheler) situa-se nas coordenadas $27^{\circ}34'22,98''$ S; $48^{\circ}35'58,59''$ O; ponto referência (Pedra das Tipitingas) $27^{\circ}31'31,77''$ S; $48^{\circ}36'23,00''$ O (5.500 m do contaminado) (Fonte: NUNES, 2008).

3.2 Biometria e extração de tecidos

Após cada período de exposição, dez animais de cada local foram retirados e transportados para o Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica, permanecendo em aquários com água das áreas de coleta até o momento da biometria e dissecação. Logo após a coleta foi realizada a biometria das ostras e estas foram mortas por rompimento do músculo adutor. De cada ostras foram dissecadas as brânquias e a glândula digestiva, com instrumentos devidamente esterilizados e tratados com H_2O com dietil pirocarbonato (DEPC) para certificar que estariam livres de enzimas RNAses. As amostras biológicas foram então congeladas em nitrogênio líquido para posterior armazenamento em freezer $-80^{\circ}C$.

3.3 Extração de RNA total

As brânquias das ostras foram lavadas duas vezes com 1 ml de tampão TE (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA pH 8,0) seguido de centrifugação a 2.000 g por 2 min a 4°C, para remoção do muco e fitoplâncton. Esse procedimento não foi realizado com as amostras de glândula digestiva. A extração do RNA total das brânquias e glândula digestiva foi realizada em homogeneizador do tipo Potter com um reagente comercial a base de etanol e tiocianato de guanidina (TRIzol - Invitrogen) seguindo as instruções do fabricante com poucas modificações (200 mg tecido/1 ml de Trizol; 1 h de incubação após a homogeneização ao invés de 5 min). Ao final da extração as amostras foram ressuspensas em 100 µl de água para biologia molecular. Para a determinação da concentração e da pureza do RNA foi utilizado o espectrofotômetro Nanodrop ND-1000 UV-Vis (Nanodrop Technologies), a partir da absorbância a 260 nm, e razões 280/260 nm e 260/230 nm, respectivamente. A integridade do RNA foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1,2% em tampão TAE 1X corado com brometo de etídio e observado sob luz ultra-violeta.

3.4 Síntese do cDNA

Para comparar a expressão gênica das ostras mantidas em local contaminado por esgoto doméstico com as ostras mantidas no local referência, amostras de RNA dos organismos foram agrupados em pools (n=2). Foram analisados quatro pools (n=4) por tempo de exposição (1, 2, 7 e 14 dias) nos locais contaminado e referência. Os pools foram formados a partir do RNA total, utilizando 1 µg de RNA de cada indivíduo. A síntese do cDNA foi realizada utilizando o kit Omniscript Reverse Transcriptase (Qiagen) a partir de 2 µg de RNA total, acrescido de dNTP (5 mM); oligo-(dT)₁₅ (1 µM) (Promega); inibidor de RNase *RNAse OUT* (Invitrogen), transcriptase reversa Omniscript (Qiagen) (4U). As amostras foram incubadas por 90 min a 37°C para síntese do cDNA. Os cDNAs foram precipitados utilizando 2,5x volume de isopropanol (Sigma) e 10% de acetato de amônia 5 M, pH 5.2 (Fluka), a -80°C durante 1 h, para remoção de interferentes da reação de PCR, tais como os dNTPs não utilizados e enzima transcriptase reversa. A concentração e a pureza do cDNA foram checadas por espectrofotometria como descrito anteriormente.

3.5 Desenho dos iniciadores

Os iniciadores específicos utilizados neste estudo foram desenhados utilizando o programa Primer3 (ROZEN e SKALETSKY, 2000) com base em sequências pertencentes a uma biblioteca subtrativa de cDNA previamente gerada no Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica, onde ostras *C. gigas* foram expostas a esgoto doméstico por 48 h (MEDEIROS et al., 2008a). Os seguintes genes foram selecionados da biblioteca subtrativa: Proteína ligante de ácidos graxos (FABP), Citocromo P450 família 356A1 (CYP356A1), Glutathione S-transferase classe ômega (GSTO), Proteína de resistência a múltiplas drogas (MDR) e δ -Aminolevulinato sintase (ALAS). Além destes, foram desenhados iniciadores de *C. gigas* a partir de sequências depositadas no banco de genes para Actina (ACT), Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e Proteína ribossomal 28S (28S) para a normalização, necessária para utilização do método de expressão relativa por $\Delta\Delta$ CT (SCHMITTGEN e LIVAK, 2008). Os iniciadores utilizados estão apresentados na Tabela 1. Os iniciadores foram desenhados de forma a produzirem amplicons menores que 200 pb, pois acima deste tamanho a eficiência da reação de qPCR é prejudicada (COSSEAU et al., 2009).

Tabela 1: Sequência dos pares de iniciadores desenhados, tamanho dos amplicons e temperatura de anelamento utilizada nas reações de qPCR.

Gene	Acesso <i>GenBank</i>	Sequência dos iniciadores (5' – 3')		Amplicons (nt)	T _A (°C)
		<i>Foward</i>	<i>Reverse</i>		
ACT	AB071191	ATGTCCCCAGGTATTGCTGACCGT	TCCACATCTGTTGGAAGGTGGACA	157	53
GAPDH	CAD67717	AAGCAACAAGGATTGGCGTGGT	AACTGGTACGCGGAAAGCCATT	182	55
28S	AF137051	TGTGCGCAAGTCATTGGGTGTT	ACCATCTTTCGGGTACCAACGTGT	103	55
FABP	EU069496	TCCGACGGAAAGATGACGCTTT	ACGCCATTGCATGTTGCTGT	116	51
GSTO	AJ557141	TGATGAGTTCACCACCGCAA	TTCAAACCATGGCCACAGCA	155	50
CYP356A1	EF645271	ATGAAACCCGCGAAACCA GA	TAAATTCGGCTTACGCCCT	156	51
MDR	EU073425	TTCCGATCTGTTTACGCAGCCA	AGGTGCTGCAGGGTCTGAATTT	125	54
ALAS	ABU50033	TGCATAAGGCAGCATCACCA	AAGGCAAGCATCTGCGTGAA	136	52

3.6 Padronização das reações de qPCR

Todas reações de qPCR neste estudo foram realizadas utilizando o kit *ABsolute SYBR Green qPCR Mix* (Thermo Scientific). As reações de 20 μ l continham 10 μ l de SYBR Green qPCR Mix 1X, que possui o fluoróforo *SYBR Green I*, *Taq* polimerase, dNTPs, MgCl₂ e o tampão da enzima, e os 10 μ l restantes foram adaptados entre amostra, iniciadores e H₂O. Os ensaios foram realizados no

aparelho Rotor Gene 6000 (Corbett Lifesciences) com o rotor de 36 poços. Os programas de ciclagem de cada gene incluíam ativação da enzima a 95°C por 15 min, em seguida 40 ciclos de 10 s de desnaturação a 95°C, 15 s de anelamento com a temperatura conforme Tabela 1, e 20 s de extensão a 72°C, fase onde ocorreu a aquisição de fluorescência. Posteriormente a curva de dissociação foi realizada através do aumento de 1°C a cada 5 s, partindo de 50°C e terminando a 99°C, para analisar o perfil dos produtos formados. Cada par de iniciadores foi testado inicialmente em duplicatas de 100 ng de uma mistura de cDNA dos diferentes tempos de exposição, de ambos locais. Em seguida os iniciadores foram testados nas concentrações de 250 nM, 500 nM, 750 nM e 1000 nM. A escolha da concentração a ser utilizada nos ensaios foi baseada nos valores de CT, onde o menor valor foi selecionado, refletindo uma maior eficiência da reação. A análise da curva de dissociação também foi determinante na escolha da concentração de iniciador para as reações. As condições encontradas foram testadas na construção de uma curva padrão, construída a partir de diluições seriadas do pool de cDNA. As curvas padrão serviram como teste da eficiência da reação, onde uma curva padrão ótima apresenta valor de eficiência de 1 (100% de amplificação por ciclo), situação na qual as concentrações da curva devem corresponder com as diluições realizadas. O programa disponível no aparelho Rotor Gene 6000 transformou os valores brutos de fluorescência em uma escala logarítmica, e assim o limiar foi delimitado baseando-se no coeficiente de correlação (R^2) e na eficiência da curva, calculada pelo próprio aparelho.

3.7 Análise da expressão gênica por qPCR

Foram realizadas reações de PCR em tempo real para o cálculo da expressão gênica relativa, utilizando-se o método do $\Delta\Delta CT$ comparativo. As condições ótimas pré-estabelecidas na padronização foram testadas com a adição de 10 ng de cDNA nas análises. Os valores de CT gerados foram transformados em 2^{-CT} para realização das análises estatísticas, seguida de normalização pelos genes constitutivos. O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para verificar se os dados apresentavam uma distribuição normal. Os dados paramétricos foram analisados através do teste t de Student, enquanto que os não-paramétricos foram analisados através do teste de Mann-Whitney, todos com um nível de significância $\leq 0,05$. As

análises foram realizadas utilizando-se os programas Statistica 6 (Statsoft) e GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software).

4.RESULTADOS

4.1 Padronização das reações de qPCR

A reação de padronização inicial mostrou a amplificação de um único produto em todos os genes testados neste estudo, sem a presença de contaminação ou ruído de fundo (dados não mostrados). Para todos os genes testados a curva de concentração de iniciador apresentou os menores valores de CT na faixa de 1000 nM (dados não-mostrados), condição adotada em todas reações deste trabalho. A Tabela 2 mostra os valores de coeficiente de correlação (R^2), inclinação da reta (*slope* ou M), fator de amplificação (100%=2) e eficiência da reação (100%=1) obtidos para os diferentes genes testados. As reações padronizadas apresentaram uma eficiência semelhante, o que permitiu a utilização do método de $\Delta\Delta CT$ comparativo.

Tabela 2: Curvas padrões geradas na padronização das reações de qPCR. Valores dos coeficientes de correlação (R^2), inclinação da reta (M), amplificação (100%=2) e eficiência da reação (100%=1).

Gene	R^2	Inclinação	Amplificação	Eficiência
ACT	0.999	-3.358	1.99	0.99
GAPDH	0.997	-3.512	1.93	0.93
28S	0.999	-3.325	2.00	1.00
FABP	0.998	-3.424	1.96	0.96
CYP356A1	0.998	-3.322	2.00	1.00
GSTO	0.997	-3.487	1.94	0.94
MDR	0.998	-3.341	1.99	0.99
ALAS	0.997	-3.427	1.96	0.96

4.2 Análise da expressão dos genes normalizadores

Inicialmente foram analisados os genes normalizadores ACT, GAPDH e 28S. As reações foram realizadas em duplicata, assumindo a média entre os valores de CT encontrados. Estes valores foram transformados em 2^{-CT} para as análises estatísticas. Considerando que os dados apresentaram distribuição e variâncias normais foi utilizado o teste *t* de Student para a comparação dos dados dos animais oriundos do local contaminado com os do local referência em cada tempo de exposição. A expressão do gene 28S variou significativamente no tempo de 14 dias ($p < 0.05$), inviabilizando seu uso como gene normalizador, o que não ocorreu com os genes ACT e GAPDH. Este método de seleção dos genes normalizadores está de

acordo com o proposto por Schmittgen e Livak (2008). A média entre os valores de CT destes dois genes foi utilizada como valor normalizador das reações dos genes de interesse. A Figura 5 apresenta os gráficos das análises de curva de dissociação geradas nas corridas dos genes de controle interno. Foi observada a formação de um pico representando amplicons únicos em todos os genes.

4.3 Análise da expressão dos genes de interesse

As reações de qPCR dos genes de interesse (FABP, GST, CYP356A1, MDR e ALAS) foram realizadas conforme descrito anteriormente. A Tabela 3 mostra a expressão relativa do grupo contaminado em relação ao grupo referência em cada um dos quatro períodos de exposição. A Figura 6 apresenta os gráficos das análises de curva de dissociação geradas nas reações mostrando a formação de um pico que representa a amplificação de amplicons únicos em todos os genes analisados. Na Figura 7 estão representadas as expressões relativas dos genes das ostras mantidas no local contaminado em relação a os animais do local referência em cada tempo de exposição para cada gene de interesse. Houve um aumento significativo ($p < 0,05$) de 28 vezes na expressão do gene da FABP após um dia de exposição. A expressão do gene da GSTO também apresentou indução significativa nos animais mantidos no local contaminado durante 1, 2 e 7 dias ($p < 0,05$). Nenhuma alteração significativa na expressão dos genes CYP356A1, MDR e ALAS foi observada. Contudo pode ser observada uma forte tendência de descréscimo na expressão gênica de MDR ao longo dos períodos de exposição.

Tabela 3: Variação da expressão gênica em relação ao local referência, nos períodos de exposição de 1, 2, 7, e 14 dias. Em negrito as expressões relativas com significância estatística.

Tempo de exposição	FABP	CYP356A1	GSTO	MDR	ALAS
1 dia	28.67	1.09	8.50	1.43	1.05
2 dias	2.38	0.92	3.55	1.30	2.05
7 dias	2.81	0.88	3.33	1.11	1.99
14 dias	0.87	1.04	1.09	0.70	2.08

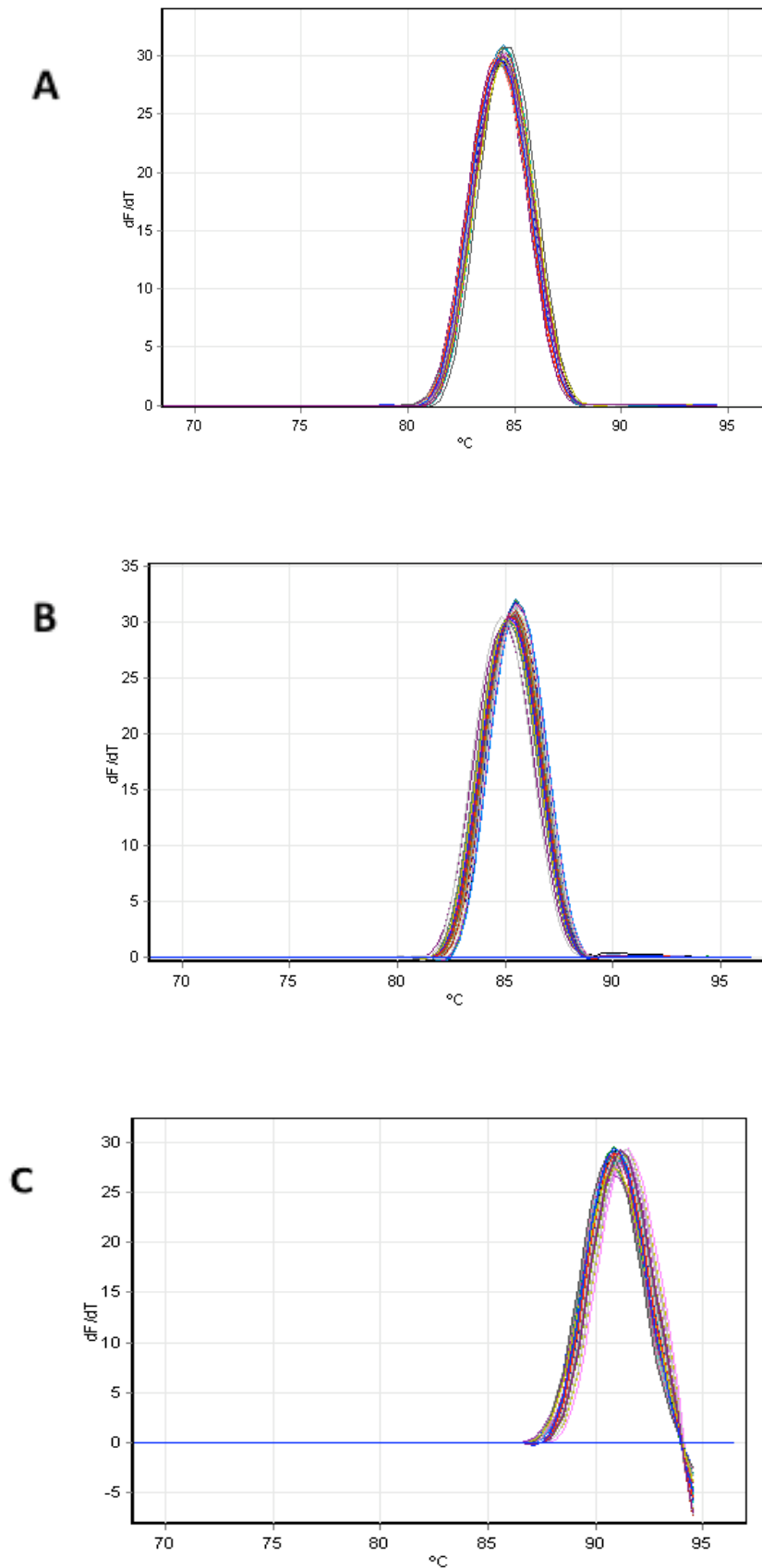


Figura 5: Perfis das curvas de dissociação dos genes de interesse. (A) Actina (B) Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (C) Proteína ribossomal 28S

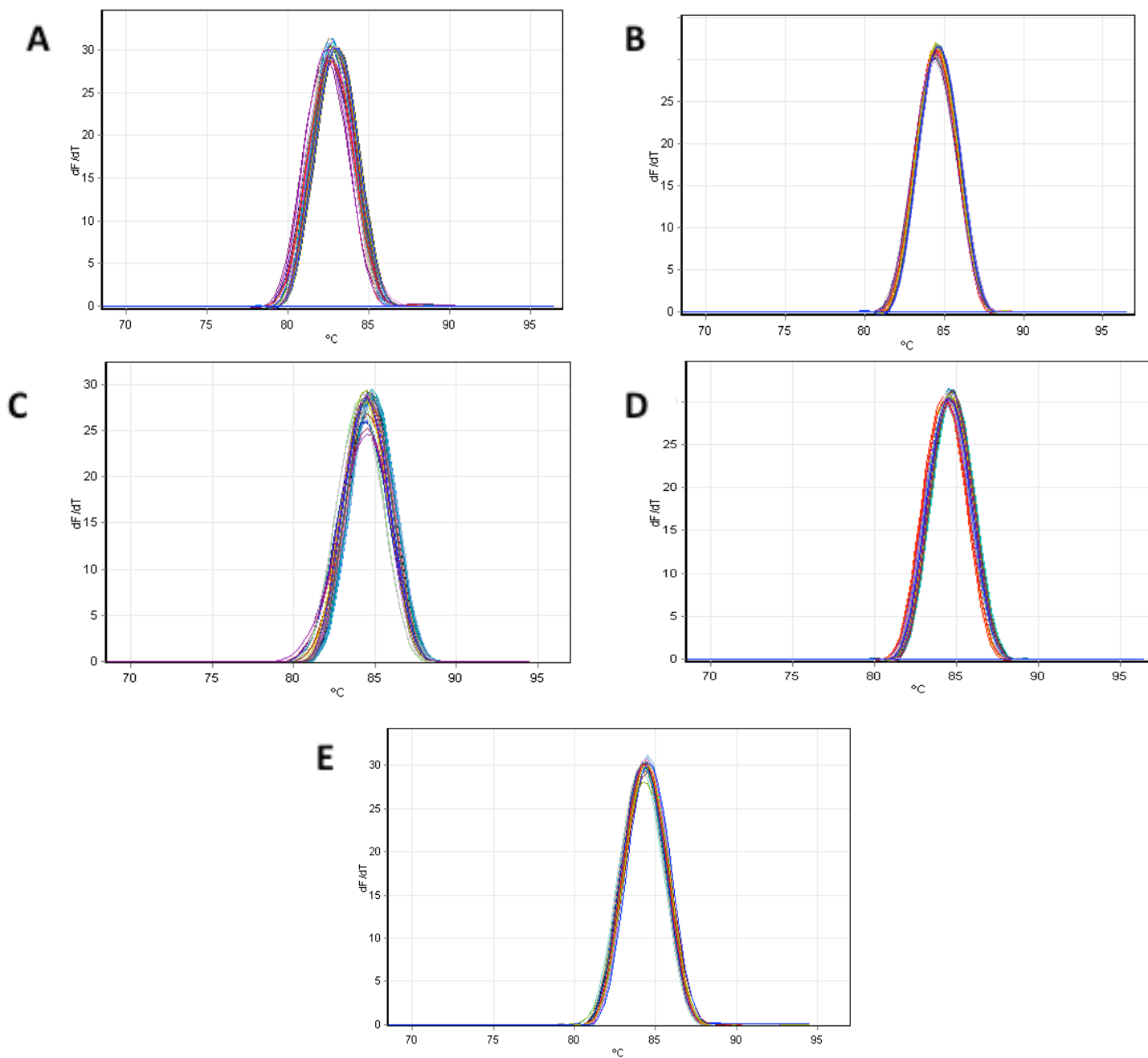


Figura 6: Perfis das curvas de dissociação dos genes de interesse. (A) Proteína ligante de ácidos graxos (B) Citocromo P450 família 356A1 (C) Glutationa S-transferase classe ômega (D) Proteína de resistência a múltiplas drogas (E) δ -Aminolevulinato sintase.

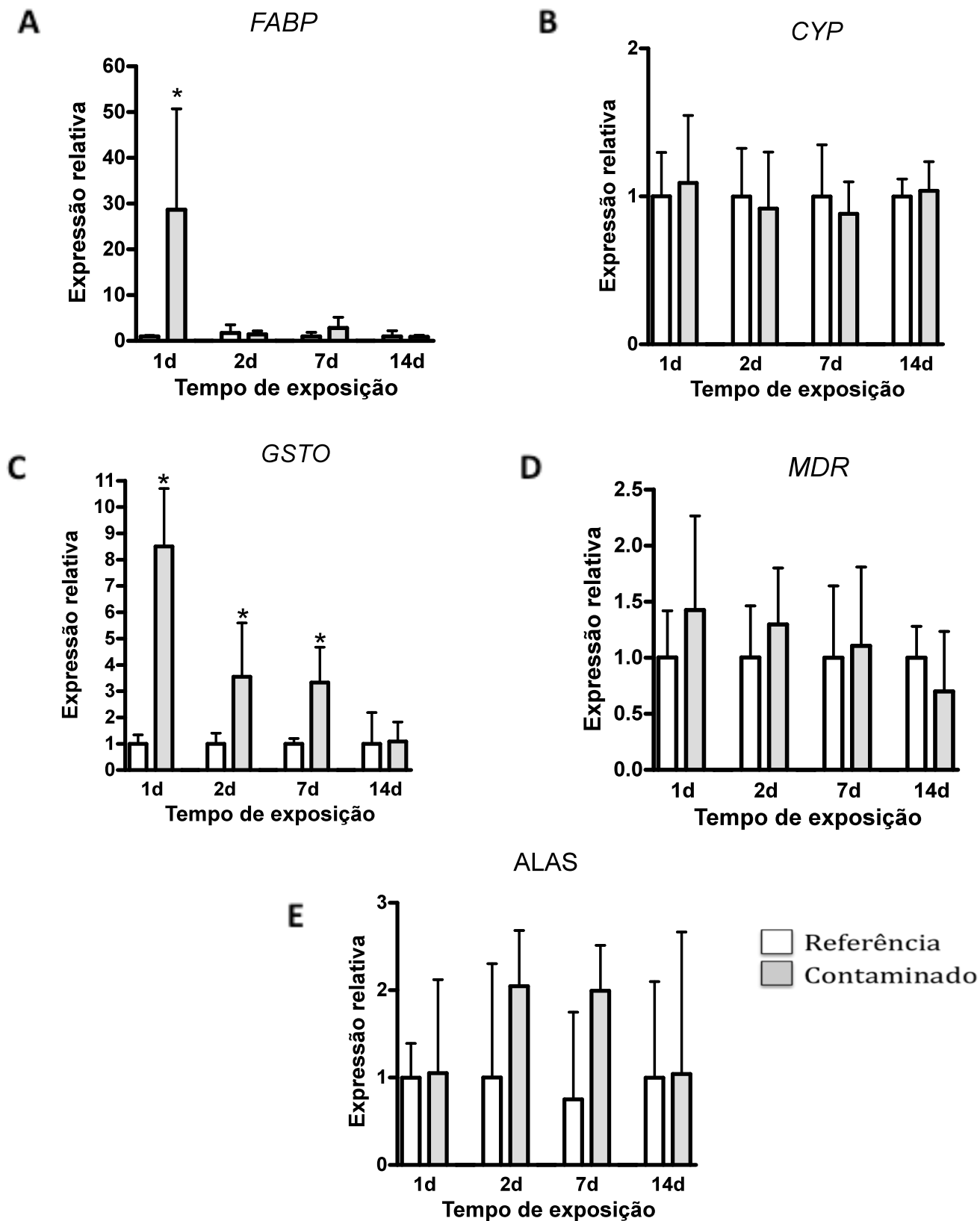


Figura 7: Expressão relativa nos quatro diferentes tempo de exposição (1, 2, 7 e 14 dias) comparando os locais referência e contaminado. Dados mostrados como média \pm d.p. * representa diferença significativa conforme teste não-paramétrico de Mann-Whitney, com $p < 0,05$.

5. DISCUSSÃO

O monitoramento da expressão de genes associados às respostas moleculares frente a uma agressão química é uma ferramenta promissora na análise ambiental. Vários métodos adequados estão disponíveis e o sequenciamento de um número cada vez maior de genomas tem contribuído para o desenvolvimento da ecotoxicogenômica. Para que esse tipo de análise se estabeleça entre os biomarcadores, entretanto, é necessário que se tenha uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos nos efeitos ativadores, repressores, sinérgicos, aditivos, etc., dos contaminantes, bem como dos potenciais interferentes ambientais sobre a expressão de cada gene. Com o objetivo de aumentar o número de genes candidatos como biomarcadores de exposição ao esgoto doméstico em *C. gigas*, estudos anteriores de nosso grupo de pesquisa geraram uma biblioteca subtrativa de cDNA. Neste trabalho foram identificados 15 genes cuja expressão foi induzida nas brânquias das ostras após 48 horas de exposição a efluentes de esgoto doméstico não tratado em condições de laboratório (MEDEIROS et al., 2008a). Cinco desses genes apresentaram sua indução confirmada por PCR semi-quantitativo em animais mantidos em condições similares no laboratório expostos a esgoto doméstico (MEDEIROS et al., 2008b). Esses resultados levaram a realização de um experimento *in situ* em que ostras foram transplantadas para locais referência e contaminado por esgoto doméstico e a expressão dos genes FABP, CYP356A1, GSTO, MDR e ALAS foi analisada individualmente após 14 dias de exposição, por PCR semi-quantitativo. Uma vez que esse experimento apresentou alta variabilidade dentro de cada grupo e ausência de alterações na expressão destes genes nas ostras dos grupos experimentais, surgiu o questionamento se o motivo desse resultado negativo seria a baixa concentração de esgoto presente no ambiente natural ou o extenso período de exposição adotado, quando comparados aos experimentos prévios em aquários. Assim, foi realizado o experimento com exposição das ostras em um local referência e um local contaminado por 1, 2, 7 e 14 dias em que foi analisada a expressão dos mesmos genes através da técnica de PCR em tempo real.

5.1 Caracterização dos locais de estudo

Dois trabalhos anteriores (NUNES, 2008; MEDEIROS, 2008c) do Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica, realizaram as análises químicas da água, sedimento e ostras nos pontos contaminado e referência, além de análises microbiológicas, coleta de parâmetros físico-químicos da água e dados meteorológicos, no intuito de caracterizar a contaminação por esgoto doméstico utilizando as metodologias convencionais.

Dentre os fatores abióticos analisados, a temperatura, a salinidade e o pH da água dos pontos monitorados foram bastante semelhantes. Os altos níveis de demanda bioquímica de oxigênio (DBO_5) e coliformes fecais na água do local escolhido como contaminado sugerem a existência de contaminação por esgoto doméstico. Outros indicadores do aporte de esgoto, tais como ABL e os esteróis fecais (coprostanol e colestanol) no sedimento, estavam elevados no local contaminado, confirmando esta hipótese. Os valores de coliformes fecais observados durante o experimento ultrapassaram o limite definido pela Resolução Conama Nº 357/2005 (CONAMA, 2005). No sedimento, os níveis de ABL, indicadores da presença de esgoto, foram significativamente maiores no local contaminado. Na análise dos esteróis fecais, os níveis de coprostanol e colestanol foram maiores no local contaminado, enquanto o de colesterol foi maior no local referência. Nas ostras, os níveis de HPA totais, ABL e DDT foram significativamente maiores nos animais que permaneceram no local contaminado, quando comparado ao local referência. Não foi observada diferença nos níveis de BCP.

Estes dados, segundo os trabalhos aqui citados (NUNES, 2008; MEDEIROS, 2008c), caracterizam o local contaminado como poluído por esgoto doméstico, de acordo com a literatura disponível sobre o tema.

5.2 Análise da expressão gênica por qPCR

A eficiência da reação foi similar para todos os genes e desta forma a normalização dos resultados foi realizada pela expressão dos genes da ACT e GADPH. A expressão dos genes normalizadores foi avaliada pelo teste *t* de Student e não apresentou diferença estatística. O mesmo não foi observado na expressão do gene da Proteína ribossomal 28S, sendo esta, portanto, descartada da normalização.

No presente estudo, após um dia de exposição no local contaminado foi observado um aumento significativo ($p < 0,05$) de 28 vezes na expressão do gene da FABP nas brânquias das ostras. Após dois e sete dias de exposição, os níveis de FABP não foram estatisticamente diferentes entre os grupos, apesar de permanecerem maiores no grupo exposto. Após duas semanas de exposição a expressão de FABP nos animais não apresentou diferença entre os grupos (Figura 7A). O aumento na expressão da FABP após um dia de exposição pode estar associado à um aumento na taxa de síntese de proteínas para transporte e/ou detoxificação de algum contaminante lipofílico, visto que várias substâncias foram detectadas nos animais deste local (NUNES, 2008; MEDEIROS, 2008c). A FABP poderia também estar atuando no transporte/metabolismo de ácidos graxos para suprir uma maior demanda energética metabólica inicial face à situação de estresse químico enfrentado. Em uma fase posterior, em que várias sistemas de biotransformação tivessem sido ativados, esta demanda inicial diminuiria, acarretando em uma diminuição na expressão do gene da FABP. De acordo com Velkov e colaboradores (2005) existem evidências de que o sub-tipo L-FABP, identificado originalmente no fígado de vertebrados, esteja envolvido na mediação da absorção e metabolismo de xenobióticos. A expressão do gene da FABP foi induzida junto ao gene do co-transportador de sódio e glicose (SGLT) responsável pela entrada de glicose na célula, em ostras de uma linhagem geneticamente resistente a uma mortalidade em massa de verão (HUVET et al., 2004). Peterson e Bain (2004) sugerem que FABP podem modular o metabolismo em conjunto com CYP2N2. Bain (2002) mostraram que pireno pode induzir a expressão de FABP em *Fundulus heteroclitus*. Apesar de não terem sido observadas diferenças na expressão de FABP nas brânquias das ostras de ambos locais após 14 dias de exposição, houve um aumento nesta expressão em ambos grupos (dados não mostrados), o que pode estar relacionado aos dados meteorológicos e de pluviosidade. Durante o período de 14 dias de exposição foram registrados altos índices de pluviosidade o que acarretou em um aumento no fluxo de todos os rios que desaguam na Baía Norte causando um aumento no aporte de esgoto doméstico. Este fato em conjunto com o sistema de maré cheia e predominância de vento nordeste dificultou o escoamento dos contaminantes da Baía Norte para o oceano. Com isso foram registrados maiores níveis de coliformes fecais também no

local referência neste período de 14 dias de exposição, justificando a indução encontrada no local referência. Mesmo não sendo significativas, estas diferenças observadas no local referência sugerem que a expressão de FABP é sensível a variação ambiental.

A expressão de GSTO nos animais mantidos no local contaminado foi significativamente maior do que aqueles mantidos no local referência após 1, 2 e 7 dias, respectivamente em 8,5, 3,5 e 3,3 vezes (Figura 7C). Após duas semanas de exposição a expressão deste gene retorna a valores semelhantes ao do grupo referência. O aumento na atividade de GST foi demonstrado em vários estudos com moluscos expostos a HPA, BPC e pesticidas (GOWLAND et al., 2002; CHEUNG et al., 2002). A GSTO tem um papel importante na resposta ao estresse oxidativo através da catálise da redução de disulfetos de complexos glutationa-proteína (KAMPKOTTER et al., 2003). Burmeister e colaboradores (2008) demonstraram que *C. elegans* transgênicos, com superexpressão do gene GSTO, gerados para estudar a resposta ao estresse *in vivo*, apresentam uma maior taxa de sobrevivência aos tratamentos de cumeno hidroperóxido, paraquat, arsenito e altas temperaturas, quando comparados a linhagem controle. Rhee e colaboradores (2007) demonstraram a indução dose-dependente de GSTO em poliquetos expostos a cobre. Boutet e colaboradores (2004) encontraram um aumento na expressão do gene GSTO em *C. gigas* expostas a hidrocarbonetos, após três dias de exposição que poderia estar ocorrendo em resposta ao estresse oxidativo gerado pela biotransformação dos xenobióticos. Em contraste com a expressão do gene FABP, a GSTO mantém um alto nível de expressão até sete dias de exposição, possivelmente pelo constante recrutamento das enzimas ou menor tempo de vida das proteínas sintetizadas. A análise nos locais contaminado e referência mostra um padrão semelhante à expressão do gene FABP, respondendo ao grande fluxo de contaminantes resultante da combinação de chuvas e vento nordeste no tempo de exposição de duas semanas, porém sem significância estatística. O aumento na expressão do gene GSTO nas brânquias das ostras expostas ao local contaminado (e local referência no período de duas semanas) poderia dessa forma estar relacionado à alta concentração de HPA observados nas ostras do local contaminado. Com base nestes resultados pode-se sugerir que o aumento na expressão do gene GSTO tenha sido desencadeado para diminuir o estresse

oxidativo gerado pelas enzimas de biotransformação de fase I. No entanto, cabe ressaltar que a expressão do gene CYP356A1 não foi alterada durante todo o experimento, indicando que esta isoforma não tem sua expressão aumentada pelo esgoto doméstico nas condições em que as ostras foram expostas neste presente trabalho. Apesar disso, outras isoformas de CYP, bem como as flavinas monooxigenase e outras enzimas de fase I poderiam estar causando um aumento na formação de espécies reativas de oxigênio.

No presente trabalho não foi verificada a indução dos genes CYP356A1, MDR e ALAS após exposição a esgoto doméstico *in situ* (Figura 7B, 7D e 7E), e os níveis de expressão se mantiveram semelhantes após todos os períodos de exposição. Estes resultados diferiram daqueles observados por Medeiros e colaboradores (2008b) que observaram um aumento significativo na expressão destes genes em ostras expostas a esgoto doméstico em aquários após uma exposição de 48 horas. Possivelmente as diferenças observadas nestas respostas estejam associadas aos diferentes níveis de contaminantes presentes no ambiente natural com aqueles em que os animais foram expostos no laboratório. No ambiente, condições meteorológicas associadas a dinâmica de fluxo de marés pode ter influenciado em uma maior dispersão dos contaminantes. Além disso, o próprio estresse causado pelo confinamento dos animais em laboratório e a contínua filtração da água com os contaminantes e os próprios metabólitos dos animais poderia ter contribuído para o aumento na expressão destes genes.

As análises anteriores (NUNES, 2008; MEDEIROS, 2008c) mostram que a foz do Rio Bücheler estava contaminada por esgoto doméstico pois apresentou níveis de diversos contaminantes orgânicos, coliformes e DBO₅ acima do permitido, e as ostras que ali permaneceram por duas semanas bioacumularam ABL, HPA e DDT. O presente trabalho mostrou que a indução da expressão dos genes FABP e GSTO (28x e 8,5x respectivamente) nas brânquias das ostras parece estar associada a essa contaminação, visto que ocorreu logo nas primeiras 24 horas. Todos esses dados mostram que há diferenças quanto ao tempo de resposta na indução da expressão dos genes, mas pode-se observar um padrão geral onde ocorre primeiro a transcrição do RNAm, seguido do aumento da quantidade e atividade da proteína enquanto os níveis de RNAm retornam ao basal. A ausência de aumento da expressão dos outros genes (CYP356A1, MDR e ALAS) talvez esteja

relacionada a menor concentração de contaminantes no ambiente. No experimento em aquários a quantidade de esgoto não tratado adicionado à água marinha foi a máxima possível para que a salinidade não baixasse mais que 25 psu, sendo no caso 33% do volume total do aquário. Já no experimento *in situ* a concentração de contaminantes certamente foi menor do que esta situação de laboratório.

Os resultados mostram que as ostras podem se adaptar a presença de diferentes químicos presentes no esgoto doméstico, fazendo uso de estratégias bioquímicas que as permitem sobreviver em áreas poluídas. Também mostrou a importância de se conhecer o padrão de resposta temporal da expressão gênica, onde constatamos que as análises moleculares devem ser realizadas nos primeiros dias de exposição. É viável a aplicação destes resultados em conjunto com análises químicas e dados oceanográficos, hidrológicos e meteorológicos, sendo crucial na interpretação correta das respostas encontradas. Mais estudos com esse tipo de abordagem são necessários visando a otimização e utilização dos perfis de expressão gênica destes animais como indicadores de contaminação ambiental. A expressão destes e de outros possíveis genes relacionados com exposição a esgoto doméstico devem ser analisadas em mais tecidos, como glândula digestiva e manto. Estes dados contribuem com a potencial aplicabilidade dos dados sobre expressão gênica e de proteínas e enzimas relacionadas com processos chave em programas de monitoramento de qualidade de água utilizando bivalves como organismo sentinela.

6. CONCLUSÕES

- A foz do Rio Bücheler é contaminada por esgoto doméstico, e a exposição de ostras *C. in situ* a este complexo poluente alterou a expressão de alguns genes;
- Os parâmetros moleculares se mostraram rápidos sendo que os picos de expressão dos genes estudados foram após as primeiras 24 horas de exposição; a expressão de GSTO permaneceu elevada mesmo após sete dias de exposição, possivelmente pela maior necessidade de conjugação de xenobióticos e/ou proteção contra o estresse oxidativo causado pela exposição aos contaminantes.
- Os genes ACT e GAPDH se mostraram bons controles internos para normalização dos resultados;
- Apesar de não ter havido diferença estatística, o aumento na expressão dos genes da FABP, GSTO e ALAS nas ostras do local referência estavam de acordo com o aumento dos níveis de coliformes fecais observados neste local após o período de 14 dias, devido a grande quantidade de chuvas e a incidência de vento nordeste.
- A análise da expressão gênica pela técnica de PCR em tempo real é altamente aplicável a estudos de biomonitoramento em campo, em conjunto com as análises químicas tradicionais e ensaios bioquímicos para avaliação da expressão de proteínas e atividade de enzimas relacionadas.

CAPITULO II:
ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL EM OSTRAS
Crassostrea gigas* EXPOSTAS A ESGOTO DOMESTICO *IN SITU
UTILIZANDO A TÉCNICA DE HIBRIDIZAÇÃO SUBTRATIVA
SUPRESSIVA

1. INTRODUÇÃO

O uso de técnicas de biologia molecular na ecotoxicologia permitiu ampliar o conhecimento dos mecanismos de ação dos contaminantes nos organismos. Padrões de expressão gênica fornecem informações sobre a integração entre os estressores ambientais e o genoma que, através da síntese protéica, desencadeiam a resposta do organismo às mudanças externas (BRULLE et al., 2008). A pesquisa contemporânea no campo da ecotoxicologia tenta elucidar como a regulação gênica é modulada pelos estímulos ambientais e estabelecer as diferenças nos níveis de expressão gênica nos diferentes tipos celulares e estágios de desenvolvimento. Considerando que a transcrição é um dos passos iniciais na regulação gênica, a determinação dos níveis de abundância dos transcritos em resposta aos contaminantes representa uma informação necessária para responder tais questões. As tecnologias que permitem estudar os perfis de expressão gênica são relativamente recentes na genômica funcional e visam a compreensão das mudanças globais na expressão gênica dos organismos, quando os mesmos são expostos a variados estressores e poluentes ambientais. Assim, no esforço de interpretar tais resultados foi caracterizado um novo campo da ciência denominado toxicogenômica (KOSKINEN et al., 2004).

Os estudos de expressão gênica diferencial podem ser divididos basicamente em duas de tecnologias: sistemas abertos e fechados. Para a utilização de sistemas fechados é necessário que seja conhecido o genoma, ou os genes de estudo da espécie em questão, como por exemplo os microarranjos. Por outro lado, as técnicas de sistema aberto, como por exemplo, as técnicas *differential display* e hibridização subtrativa supressiva (SSH), dispensam a necessidade de conhecimento prévio do genoma da espécie, o que se apresenta como uma vantagem para o estudo com organismos cujo genoma ainda é pouco caracterizado (BULTELLE et al., 2002). A necessidade de técnicas desenhadas para identificar genes que são diferencialmente expressos por determinados tipos celulares ou células sob inúmeras condições fisiológicas ou experimentais tem se tornado crítica para a pesquisa biológica moderna (PARDINAS et al., 1998). A SSH é um dos mais poderosos métodos para isolar transcritos diferencialmente expressos (HE et al., 2004) e vem sendo utilizada nos mais variados campos da ciência moderna

(WINSTANLEY, 2008). A estratégia de SSH foi originalmente descrita por Diatchenko e colaboradores em 1996. Através de kits comerciais é possível realizar os experimentos a partir de 0.5-2 µg de RNAm para cada um dos grupos tratados e controle. A SSH envolve a subtração de uma amostra de cDNA a ser testada (*tester*) a partir de uma amostra de cDNA referência (*driver*), e a subsequente identificação destas sequências presentes no cDNA *tester* mas ausentes no cDNA *driver*. Usando esta técnica, transcritos raros podem ser enriquecidos em até 1.000 vezes (WINSTANLEY, 2008). Contudo, uma das desvantagens deste método é a presença de clones representando cDNA não diferencialmente expressos nas bibliotecas subtraídas, necessitando de validação dos resultados por métodos mais sensíveis (REBRIKOV et al., 2000). No método de SSH as amostras RNAm são convertidas em cDNA dupla fita, e então digeridas por enzimas de restrição, usualmente *Rsa* I, e então o cDNA *tester* é separado em duas populações. Estes cDNA são ligados a um oligonucleotídeo adaptador diferente para cada grupo, nas extremidades 5' dos cDNA. Cada grupo de cDNA *tester* é hibridizado separadamente com cDNA *driver*, sendo o último em excesso em relação ao primeiro. Espera-se que as sequências diferencialmente expressas permaneçam como cDNA simples fita, enquanto as não-diferencialmente expressas se hibridizarão formando moléculas dupla fita. Subsequentemente os dois grupos são hibridizados, agora em conjunto, e com novo excesso de cDNA *driver*. As moléculas diferencialmente expressas agora devem se hibridizar e formar cDNA dupla fita, com um adaptador diferente em cada extremidade 5'. Utilizando iniciadores específicos para estes adaptadores, duas rodadas de reações de PCR são realizadas, visando a amplificação dos transcritos diferencialmente expressos. Moléculas híbridas com o mesmo adaptador formam uma estrutura secundária que evita a amplificação pela reação de PCR. Este efeito supressor garante que somente as sequências com adaptadores diferentes sejam amplificadas. Um esquema ilustra o método, conforme Figura 8.

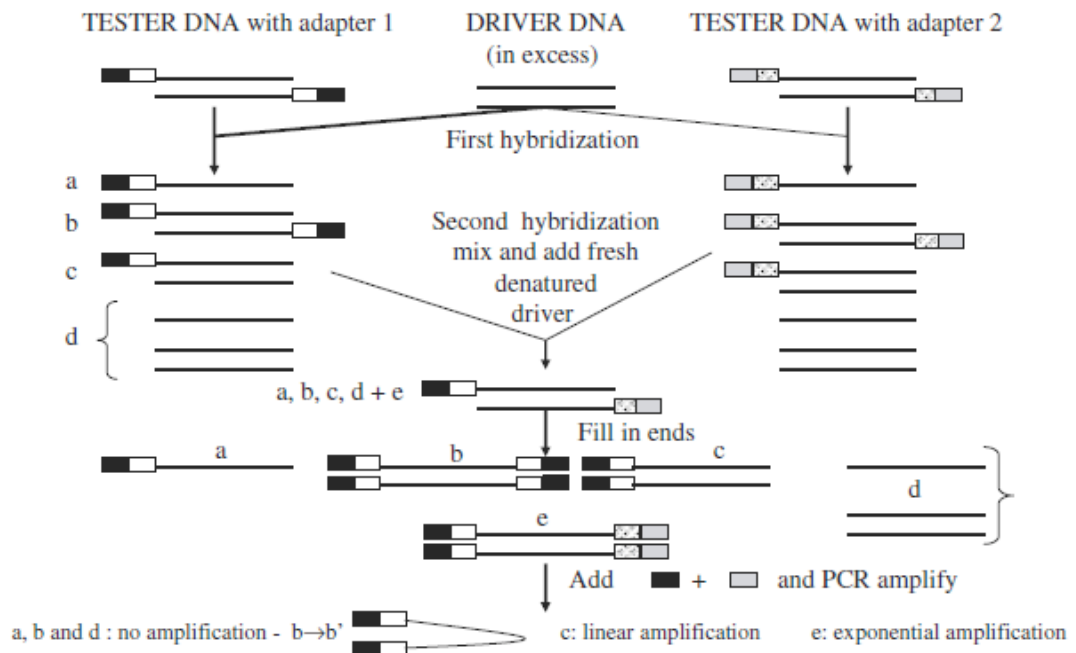


Figura 8: Esquema detalhando as etapas executadas na metodologia de hibridização subtrativa supressiva (Fonte: WISTANLEY, 2008).

Os produtos de PCR são então clonados em vetores apropriados para a produção de bibliotecas de cDNA subtraídas (WISTANLEY, 2008). Através da identificação de genes que tenham sua expressão alterada pela presença de contaminantes pode-se descobrir novos possíveis biomarcadores moleculares, baseados principalmente na expressão de genes relacionados com determinadas respostas bioquímicas e celulares. A técnica de SSH foi utilizada na pesquisa ecotoxicológica em diversas espécies (GREEN et al., 2009; ZAPATA et al., 2009; ZENG et al., 2009) entre elas a ostra *Crassostrea gigas* (BOUTET et al., 2004; HUVET et al., 2004; TANGUY et al., 2004; DAVID et al., 2005; MEDEIROS et al., 2008a). O resultado da técnica de SSH é a construção de bibliotecas subtrativas de cDNA. A partir destas bibliotecas, é possível desenhar pares de iniciadores específicos para a utilização de técnicas que validem a expressão de genes individuais, como pela técnica de PCR quantitativo. Tais bibliotecas também são importantes ferramentas para construção de macro e/ou microarranjos, possibilitando a análise quantitativa da expressão de uma variedade de genes simultaneamente. Como as outras tecnologias de sistema aberto, a técnica de SSH

pode gerar um grande número de sequências anônimas, que não devem ser desconsideradas pela possibilidade de anotação futura, na medida em que novos genes são sequenciados e identificados nos organismos modelos utilizados (WISTANLEY, 2008).

Neste estudo, foi avaliada a expressão de genes diferencialmente expressos em glândula digestiva de ostras *C. gigas* expostas *in situ* à esgoto doméstico, na região da Baía Norte da Ilha de Santa Catarina, utilizando a técnica de SSH. Tais bibliotecas contribuem para a compreensão dos perfis de expressão da ostra *C. gigas* expostas a esta complexa mistura de contaminantes. As bibliotecas geradas podem se tornar importantes fontes de informação para utilização em biomonitoramento de águas contaminadas por esgoto doméstico.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

- Analisar a expressão gênica diferencial em ostras *C. gigas* expostas a esgoto doméstico *in situ*, na foz do Rio Bücheler, na Baía Norte da Ilha de Santa Catarina.

2.2 Objetivos específicos:

- Analisar a expressão gênica diferencial através da técnica de hibridização subtrativa supressiva em glândula digestiva de ostras *C.gigas* após 24 h de exposição ao esgoto doméstico *in situ*,
- Construir uma biblioteca subtrativa a partir das sequências encontradas, através da anotação dos fragmentos pela comparação com o banco de genes (*GenBank*), com a base de dados de sequência de proteínas não-redundantes (nr) utilizando os algoritmos de busca BLASTX e BLASTN
- Classificar os genes homólogos obtidos a partir de sua função biológica, para uma melhor caracterização do perfil de expressão gênica

3. METODOLOGIA

3.1 Extração do RNAm

O protocolo de SSH pelo kit *PCR Select cDNA Subtraction* (Clontech) requer 0,5–2 µg de RNA mensageiro purificado. O RNAm foi isolado a partir de pools de RNA total de glândula digestiva das ostras que permaneceram 24 h nos locais contaminado e referência utilizando os kits Oligotex RNAm Mini (Qiagen) e MicroPoly(A) Purist (Ambion). Escolheu-se esse tempo de exposição pelo fato dos biomarcadores moleculares serem rapidamente ativados quando os organismos são expostos a xenobióticos, uma das características desse grupo de marcadores biológicos. Esses kits utilizam contas de látex que possuem oligonucleotídeos de timina (oligo-dT) que hibridizam com a cauda poli-A⁺ dos RNAm presentes na amostra, sendo que os demais tipos de RNA não são capturados. O procedimento foi realizado com 250 µg (kit Qiagen) e 400 µg (kit Ambion) de RNA total de cada grupo controle e exposto, com protocolo sendo seguido de acordo com as instruções dos fabricantes, incluindo uma segunda rodada de extração para garantir a retirada de RNA ribossomal quando utilizado o kit Ambion. Foram necessárias três repetições do procedimento com o kit da Qiagen para obtenção da quantidade de RNAm exigida pelo kit de SSH. As alíquotas de RNAm purificadas foram reunidas e precipitadas durante 1 h utilizando 2,5x volume de isopropanol (Sigma) e 10% de acetato de amônia 5M, pH 5.2 (Fluka), a -80°C. Para a determinação da concentração e da pureza do RNAm foi utilizado o espectrofotômetro Nanodrop ND-1000 UV-Vis (Nanodrop Technologies), a partir da absorbância a 260nm, e razões 280/260nm e 260/230nm, respectivamente.

3.2 Hibridização subtrativa supressiva (SSH)

A partir de 1 µg de RNAm das glândulas digestivas das ostras dos grupos controle e exposto ao esgoto foi realizada a SSH para construção da biblioteca *forward* (genes induzidos pelo esgoto doméstico). A síntese da primeira e segunda fita de cDNA, digestão por endonuclease *Rsa* I, ligação de adaptadores, hibridização e amplificação por PCR foram realizadas através do kit *PCR-select cDNA Subtraction*, conforme instruções do fabricante. A estrincência das hibridizações foi a padrão do kit, sendo 8 horas na primeira e 12 horas na segunda.

3.3 Clonagem dos fragmentos de cDNA diferencialmente expressos

Os produtos de PCR diferencialmente expressos foram purificados pelo kit *GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare) e ligados em vetores pGEM-T Easy (Promega) para transformação das células competentes *E.coli* DH5- α , através de choque térmico. Após a transformação, 100 μ l da solução contendo as bactérias transformadas foram aplicados em placa contendo ágar 35 g/l (LB Agar - Sigma), ampicilina (100 mM), IPTG (0,5 mM) e X-Gal (50 mM) e deixadas a 37°C por 18 h para crescimento de colônias. O sistema de identificação de eficiência da transformação do kit é colorimétrico, onde as colônias brancas teoricamente possuem o vetor com inserto. As colônias brancas foram transferidas para placas de fundo profundo de 96 poços para crescimento, contendo 1,5 ml meio de cultura líquido 20 g/l (LB Broth - Sigma) com ampicilina (100 mM), durante 18 horas a 37°C em agitação constante. Posteriormente, cerca de 300 μ l de cada poço foi repicado para uma placa 96-poços, com adição de 20% de glicerol autoclavado, para formação de placas estoque. O restante foi armazenado a 4°C para sequenciamento.

3.4 Sequenciamento

O sequenciamento foi realizado no Laboratório de Protozoologia (UFSC), em colaboração com o Prof. Dr. Edmundo Grisard. A extração plasmidial para sequenciamento foi realizada através de lise alcalina das colônias crescidas em 1 ml de meio líquido. A reação de amplificação dos fragmentos contidos nos plasmídeos foi realizada utilizando-se o kit DYEnamic ET Dye Terminator (GE Healthcare, Reino Unido). O sequenciamento foi realizado no equipamento MegaBACE 1000 DNA Analysis System (GE Healthcare). As sequências obtidas foram primeiramente submetidas a uma avaliação de qualidade pelo programa Phred (*Phred* ≥ 15), do pacote Phred/Phrap/Consed (EWING e GREEN, 1998; EWING et al., 1998), e posteriormente agrupadas pelo programa CAP3 (*Sequence Assembly Program*) (HUANG e MADAN, 1999), formando sequências consenso (*contigs*).

3.5 Anotação das sequências

Todas sequências obtidas foram agrupadas pelo programa CAP3. Os *contigs* e *singletons* (sequências únicas) foram comparados com o *GenBank*, utilizando o programa BLAST2GO (CONESA et al., 2005). A base de dados utilizada foi a de sequência de proteínas não-redundantes (nr). Para uma análise inicial foi utilizado o algoritmo BLASTX com filtro de *e-value* mantido em 10^{-5} . Sequências sem similaridades válidas (hits com *e-value* abaixo do filtro) foram então comparadas utilizando o BLASTN, com os mesmos parâmetros. As sequências anotadas foram então classificadas por função biológica, através de informações sobre os genes disponíveis na literatura.

4. RESULTADOS

Foram obtidos 614 clones com a biblioteca subtrativa de glândula digestiva de *C. gigas* expostas a esgoto doméstico *in situ* por 24 horas. Destes 614 clones, 463 clones foram sequenciados, e 367 apresentaram sequências de boa qualidade após o sequenciamento. Após agrupamento pelo programa CAP3, foram formados 42 *contigs* e 56 *singletons*, com a biblioteca apresentando 71% de redundância, conforme mostra a Tabela 4. Cerca de 8% das sequências analisadas não foram identificadas devido falta de similaridade com os genes já descritos no banco de genes. As sequências anotadas foram classificadas segundo suas respectivas funções biológicas, como cadeia respiratória, desenvolvimento, diferenciação, divisão celular, resposta ao estresse, citoesqueleto e estrutura, metabolismo, maquinaria transcricional e traducional e transporte, conforme a Figura 9. A Tabela 5 apresenta as sequências anotadas com as respectivas descrições dos genes homólogos encontrados, assim como o número de acesso no *GenBank*, *e-value* e tamanho do fragmento.

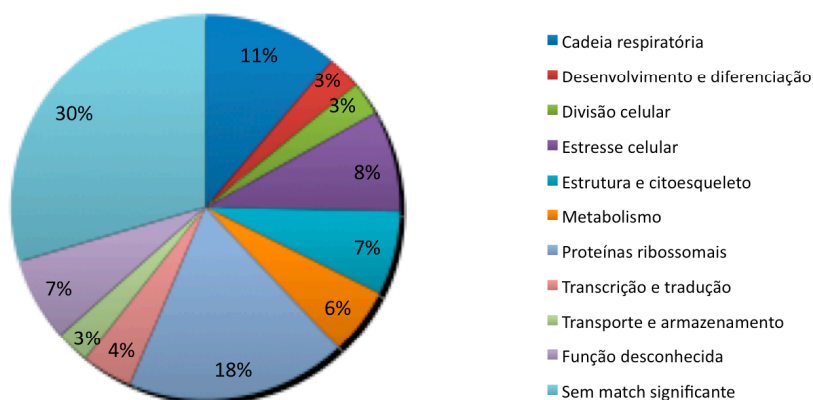


Figura 9: Distribuição dos fragmentos obtidos na biblioteca de SSH de ostras *Crassostrea gigas* expostas a esgoto doméstico *in situ*. Sequências distribuídas segundo função biológica putativa

Tabela 4: Características gerais da biblioteca subtrativa de ostras *Crassostrea gigas* expostas a esgoto doméstico *in situ*.

Total clones sequenciados	463
Total sequências válidas	367
Total sequências com <i>match</i> significativo	342
<i>Contigs</i>	42
<i>Singletons</i>	56
Redundância	71%
Total sequências sem <i>match</i>	25

Tabela 5: Anotação dos genes encontrados na biblioteca subtrativa de ostras *Crassostrea gigas* expostas a esgoto doméstico. Descrição e espécie do gene comparado, número de acesso no *GenBank*, *e-value* da busca dos algoritmos BLASTX ou BLASTN e tamanho do fragmento.

Função celular/descrição	Espécie	Acesso <i>GenBank</i>	<i>e-value</i>	pb
Estrutura e citoesqueleto				
Actina	<i>Rattus norvegicus</i>	EDL91150.1	9,71E-104	560
Colágeno alfa 1	<i>Homo sapiens</i>	EAW48748.1	2,30E-10	828
Transgelina	<i>Bombyx mori</i>	ABF51271.1	4,23E-16	605
Tubulina alfa	<i>Crassostrea gigas</i>	AB196533	4,31E-58	153
Tubulina beta	<i>Crassostrea gigas</i>	AB196534	2,54E-28	206
Cadeia respiratória				
ATP sintase subunidade beta	<i>Nucula proxima</i>	AAT06142	7,73E-60	375
Citocromo b	<i>Crassostrea gigas</i>	YP_002860212	3,07E-158	1103
Citocromo c oxidase I	<i>Crassostrea gigas</i>	YP_002860210.1	9,88E-105	649
Citocromo c oxidase II	<i>Crassostrea gigas</i>	NP_037546	1,11E-65	827
Citocromo c oxidase III	<i>Crassostrea gigas</i>	NP_037544	2,50E-67	560
NADH desidrogenase 2	<i>Crassostrea gigas</i>	ACD35417	1,91E-18	168
NADH desidrogenase 4L	<i>Crassostrea gigas</i>	NP_037554	1,56E-36	451
NADH desidrogenase 6	<i>Crassostrea gigas</i>	NP_037551	1,53E-64	1101
Desenvolvimento e diferenciação				
Complexo achaete-scute like 1b	<i>Danio rerio</i>	BC120047	9,23E-13	259
Neurogenina 3	<i>Danio rerio</i>	AF181996	3,98E-11	262
Divisão celular				
Proteína de estabelecimento coesão	<i>Mus musculus</i>	BC008220.1	1,76E-08	713
Quinase de checkpoint 1	<i>Mus musculus</i>	BC058421	9,78E-08	344
Estresse celular				
Ferritina GF1	<i>Crassostrea gigas</i>	AY321299	2,13E-29	278
Ferritina GF2	<i>Crassostrea gigas</i>	AAP83794.1	4,13E-35	436
Proteína de choque térmico pequena	<i>Trichinella pseudospiralis</i>	ABJ55915	1,79E-16	755
Proteína QM	<i>Pinctada fucada</i>	AAQ09228	2,87E-38	347
Receptor de adenosina A1	<i>Mus musculus</i>	BC058421	1,38E-10	261
Ubiquitina	<i>Taeniopygia guttata</i>	2GBM-A	1,59E-15	193
Metabolismo				
APS redutase	<i>S.contortum</i> endosimbionte	CAP03145	6,31E-06	363
Colestoquinina-N	<i>Salmo salar</i>	AB443434.1	7,07E-11	149
Fator de ribosilação de ADP 6	<i>Homo sapiens</i>	NM_022374.2	1,62E-40	204
Mevalonato quinase	<i>Mus musculus</i>	BC005606.1	5,28E-09	748

Proteínas ribossomais

Proteína ribossomal 16S	<i>Crassostrea gigas</i>	EU672831	0,00E+00	792
Proteína ribossomal 28S	<i>Ostrea chilensis</i>	DQ242470	2,38E-21	129
Proteína ribossomal L12	<i>Argopecten irradians</i>	AAN05610	6,35E-56	399
Proteína ribossomal L17	<i>Argopecten irradians</i>	AAN05596	5,38E-69	417
Proteína ribossomal L17A	<i>Argopecten irradians</i>	AAN05612.1	1,98E-63	393
Proteína ribossomal L24	<i>Crassostrea gigas</i>	CAD91424	6,65E-11	293
Proteína ribossomal L37A	<i>Lycosa singoriensis</i>	EU247140	7,50E-13	673
Proteína ribossomal L7	<i>Crassostrea gigas</i>	CAD89885	4,92E-38	286
Proteína ribossomal S13	<i>Argopecten irradians</i>	AAN05601	4,06E-24	253
Proteína ribossomal S14	<i>Novocrania anomala</i>	ACD65103	1,15E-47	299
Proteína ribossomal S15A	<i>Arenicola marina</i>	ABW23145	6,11E-63	503
Proteína ribossomal S4	<i>Mytilus edulis</i>	ABA55738	1,79E-40	262
Proteína ribossomal S8	<i>Crassostrea gigas</i>	CAD91426	8,95E-24	228

Transcrição e tradução

Fator de alongamento 1 alfa	<i>Crassostrea gigas</i>	BAD15289	6,08E-28	497
Proteína ribonuclear heterogênea D	<i>Xenopus tropicalis</i>	AAA64654	2,39E-22	509
Transposase	<i>Proteus mirabilis</i>	YP_002302242.1	1,64E-79	789

Transporte e armazenamento

Carreador de soluto 9 membro 8	<i>Mus musculus</i>	BC058947.1	1,26E-11	914
Cavortina	<i>Crassostrea gigas</i>	AAT44352	4,34E-47	360

Função desconhecida

3D7 cromossomo 11	<i>Plasmodium falciparum</i>	AE014186.1	3,42E-07	122
BAC clone CH251-243P17	<i>Pan troglodytes</i>	AC186183.2	5,40E-07	526
Clone wlsu2.pk0001.h3	<i>Triticum aestivum</i>	BAD15289	3,27E-10	572
DNA mitocondrial	<i>Crassostrea gigas</i>	AF177226.1	0,0	631
DNA mitocondrial	<i>Crassostrea gigas</i>	AF177226.1	1,09E-34	515
DNA mitocondrial	<i>Crassostrea gigas</i>	AF177226.1	9,35E-53	130
DNA mitocondrial	<i>Crassostrea gigas</i>	AF177226.1	8,65E-118	472
DNA mitocondrial	<i>Crassostrea gigas</i>	AF177226.1	4,59E-158	341
DNA mitocondrial	<i>Crassostrea gigas</i>	AF177226.1	1,33E-33	518
DNA mitocondrial	<i>Crassostrea gigas</i>	AF177226.1	5,63E-38	206
PG-8 ^a	<i>Acholeplasma laidlawii</i>	CP000896.1	0,0	951

5. DISCUSSÃO

O esgoto doméstico é um poluente complexo, contendo várias classes e níveis de contaminantes que variam consideravelmente de região para região. Nos aglomerados urbanos a composição do esgoto reflete os hábitos de vida da população e com frequência novos tipos de contaminantes são criados e lançados no ambiente. A exposição a este tipo de fonte poluidora causou a indução de diferentes classes de genes nas ostras *C. gigas*. Os resultados de análise química, discutidos anteriormente no Capítulo I desta dissertação, mostram que a região de exposição estava contaminada por esgoto doméstico.

Existem poucos estudos sobre a expressão gênica diferencial em organismos expostos a contaminação por esgoto doméstico, utilizando a metodologia de SSH (MEDEIROS et al., 2008a). No presente trabalho, foi construída uma biblioteca subtrativa através do uso da técnica de SSH em glândulas digestivas de ostras *C. gigas* após terem sido expostas no ambiente por 24 horas *in situ* a esgoto doméstico não tratado. Foram clonados 463 fragmentos representando genes induzidos pela exposição ao poluente: 27 % das sequências não apresentaram similaridade com os genes descritos no banco de genes; 14% das sequências apresentaram similaridades que não possibilitaram sua classificação funcional, como no caso das diversas sequências de DNA mitocondrial encontradas. Essa faixa percentual de genes de função desconhecida também foi obtida em outros estudos utilizando SSH em moluscos (BOUTET et al., 2004; DAVID et al., 2005; TANGUY et al., 2005; ZAPATA et al., 2009). Isto se deve a necessidade de geração de mais informações sobre os transcriptomas destes organismos sentinela. Estas sequências ainda não identificadas representam um potencial para o futuro, quando puderem ser identificadas na medida em que mais genes forem depositados no *GenBank*. Contudo, 44 sequências puderam ser classificadas após uma procura utilizando algoritmos BLASTX e BLASTN no *GenBank*. Os fragmentos gênicos foram anotados devidamente e agrupados por função biológica.

Vários componentes da cadeia transportadora de elétrons, responsável por gerarem a diferença de potencial eletroquímico necessária para síntese de ATP, foram identificados como induzidos nas ostras *C. gigas* expostas ao esgoto doméstico. Representantes de genes dos complexos I, III e IV foram encontrados na

biblioteca subtrativa. A NADH desidrogenase é uma enzima localizada na membrana interna das mitocôndrias que catalisa a transferência de elétrons do NADH para coenzima Q. Também é conhecida como NADH:quinona oxiredutase. É a primeira enzima (complexo I) na cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria, que contribui no estabelecimento do potencial eletroquímico usado para gerar ATP (VOET e VOET, 2004). Zapata e colaboradores (2009) observaram que a subunidade 2 da NADH desidrogenase foi induzida após tratamento com cobre em *Argopecten purpuratus*, agindo na proteção contra o estresse oxidativo. A inibição da subunidade 3 parece estar relacionada com a indução de apoptose (WONG et al., 2000). Ronzitti e colaboradores (2008) detectaram comportamento inverso, com a expressão da subunidade 5 de NADH conferindo resistência apoptótica em moluscos, e propõe o uso de NADH desidrogenase como biomarcador de contaminação tóxica por compostos apoptóticos em moluscos. No presente trabalho, três sequências com a expressão induzida apresentaram similaridade com os genes das subunidades 2, 4L e 6 de NADH desidrogenase de *C. gigas*. O citocromo b, também induzido nos animais deste trabalho, é parte do complexo III da cadeia respiratória e transfere elétrons do ubiquinol para o citocromo c (BLAKELY, 2005). A enzima citocromo C oxidase ou complexo IV, é um grande complexo protéico transmembrana encontrado em bactérias e nas mitocôndrias. É a última enzima da cadeia transportadora de elétrons. Contribui na formação da diferença de potencial transmembrana utilizado pela ATP sintase para sintetizar o ATP (VOET e VOET, 2004). A estrutura principal do citocromo c oxidase contém 3 subunidades (I, II e III) (OSWALD et al., 2009) e os respectivos genes foram todos induzido pela contaminação por esgoto doméstico. Outro gene relacionado foi o da *ATP sintase subunidade beta*. Uma ATP sintase é um termo geral para uma enzima que pode sintetizar ATP a partir de ADP e fosfato inorgânico usando alguma forma de energia. Essa energia é geralmente obtida na forma de prótons movendo-se por um gradiente eletroquímico. São de importância crucial em quase todos organismos, sendo ATP a forma de energia mais comum das células. O gene da *ATP sintase* foi induzido em copépodes expostos a uma mistura de contaminantes ambientais (HANSEN et al., 2007). Essa indução de genes relacionados a cadeia respiratória e síntese de ATP são comuns em experimentos de SSH com moluscos em condições adversas (DAVID et al., 2004; HUVET et al., 2004; ZAPATA et al., 2009). Este

aumento da expressão gênica pode estar relacionado a demanda energética devido ao estresse enfrentado, utilizando a cadeia transportadora de elétrons para gerar mais energia na forma de ATP.

Outra classe de genes induzidos são os que codificam proteínas estruturais e do citoesqueleto. Colágeno é a principal proteína do tecido conectivo em animais e a proteína mais abundante em mamíferos, contribuindo com 25 a 35 % do total de proteína do corpo. Tubulina é um dos variados membros de uma pequena família de proteínas globulares. Os membros mais comuns da família das tubulinas são a α -tubulina e β -tubulina, proteínas que compõem os microtúbulos. A *tubulina alfa* foi induzida em *C. gigas* expostas a herbicidas (TANGUY et al., 2005). Actina é uma proteína globular, de cerca de 42 kDa encontrada praticamente em todas as células eucarióticas (exceção conhecida é o espermatozóide de nemátodos). É uma das mais conservadas proteínas, não diferindo mais do que 20% em espécies distantes como em algas e humanos. Actina participa de importantes processos celulares incluindo contração muscular, motilidade celular, divisão celular e citocinese, movimento de vesículas e organelas, sinalização celular, estabelecimento e manutenção de junções celulares e forma celular. Em vertebrados, existem 3 principais isoformas descritas (alfa, beta e gama). Os genes estruturais em sua maioria apresentam expressão constitutiva, sendo muitas vezes utilizados como normalizadores. Zapata e colaboradores (2009) sugerem que a indução de genes estruturais pode estar relacionada com a proteção/reparo do citoesqueleto, que pode se danificar em virtude da ação de estressores celulares. Uma outra proteína estrutural identificada foi a transgelina. A transgelina foi inicialmente identificada em 1987 por Lees-Miller e colaboradores, como uma proteína de 22 kDa de função desconhecida sendo nomeada SM22. A sequência gênica é altamente conservada entre as espécies e homologias foram encontradas em *Drosophila melanogaster* e *Caenorhabditis elegans*. É um membro da família das calponinas das proteínas ligantes de actina, localizada no aparato do citoesqueleto. É uma proteína associada ao estresse do citoesqueleto (LAWSON et al., 1997). A proteína desempenha um papel importante nos sistemas circulatório, respiratório e digestivo (LI et al., 2008). Algumas evidências indicam que transgelina pode atuar como supressor tumoral em algumas células. A expressão de transgelina é totalmente inibida a nível transcricional pelo oncogene *Ras* em tumores de cólon e mama (SHIELDS et al.,

2002), o que implica que a perda da expressão de transgelina pode ser um importante evento anterior a progressão do tumor. A expressão da proteinase metalo-matriz 9, necessária para remodelamento tecidual, que permite as células cancerosas invadir os tecidos adjacentes e migrar, é inibida pela transgelina (NAIR et al., 2006). Essa supressão tumoral é possível graças a um reforço dado pelas proteínas ligantes de actina, aumentando a rigidez dos filamentos, protegendo contra despolarização. A desorganização do citoesqueleto de filamentos de actina é um evento fundamental no desenvolvimento de fenótipo de célula cancerosa. Assim, a transgelina é considerada um novo alvo no desenvolvimento de intervenções contra tipos mais comuns de câncer (ASSINDER et al., 2009). A presença deste gene na lista daqueles induzidos nos animais expostos ao esgoto doméstico sugere que os contaminantes podem estar provocando alterações importantes no citoesqueleto que possivelmente estejam associados a eventos patológicos de maior gravidade.

Uma outra classe de genes induzidos pela exposição ao esgoto doméstico são os responsáveis pela manutenção da integridade genômica e divisão celular. Esse importante processo é necessário ao longo da vida e falhas nesse sistema podem levar, muitas vezes, a apoptose ou formação de tumores. Fatores exógenos e endógenos podem levar a uma desestruturação do DNA, necessitando de reparo e manutenção para garantir que a informação genética seja corretamente transmitida para as próximas gerações (WATRIN e PETERS, 2006). Uma das características mais conhecidas de células cancerígenas é o acúmulo de aberrações cromossômicas causadas por falhas no mecanismo de manutenção genômica, tanto em ciclos celulares normais como na divisão celular (PEDDIBHOTLA et al., 2009). A quinase de checkpoint 1 (Chk1) é uma quinase essencial na manutenção da integridade genômica e dos *checkpoints* do ciclo celular, através da fosforilação de diversos alvos (ENDERS, 2008). Chk1 é essencial tanto durante as fases S e G2 do ciclo celular, quanto na mitose e citocinese para completar a divisão celular (PEDDIBHOTLA et al., 2009). Chk1 é considerado como um potencial supressor tumoral em modelos de câncer (BARTEK e LUKAS, 2003; PEDDIBHOTLA et al., 2009). Na mesma categoria de função biológica, o gene da *proteína de estabelecimento de coesão 1 (ESCO1)* participa ativamente no processo de divisão mitótica ou meiótica, conferindo coesão às cromátides irmãs e é essencial na

orientação dos cromossomos (HOU e ZOU, 2005). ESCO1 apresenta um domínio de acetiltransferase, sendo fosforilada durante a mitose, enquanto a ESCO2 é degradada (HOU e ZOU, 2005). Essa família de acetiltransferases não participa na síntese de coesina, mas na ligação do complexo protéico aos cromossomos, em conjunto com outros genes como *DECO* (DORSETT, 2007). A coesão também é importante na fase G2 do ciclo celular e no reparo de DNA dupla fita por recombinação homóloga (WATRIN e PETERS, 2006). O aumento na expressão de *Chk1* e *ESCO* nos animais expostos *in situ* aos contaminantes presentes no esgoto doméstico pode estar associado a uma indução devido a uma maior divisão celular ou à necessidade de reparo da estrutura genômica.

Na categoria de diferenciação celular e desenvolvimento, foi identificado o gene *complexo achaete-scute-like 1B (ascl1b)*. A família *achaete-scute (ac-sc)* codificam fatores *helix-loop-helix* (bHLH) e são amplamente conservados através do reino animal. Sua expressão permite o desenvolvimento de células nervosas (NEGRE e SIMPSON, 2009). As funções principais conhecidas dos genes *ac-sc* são a regulação na formação dos precursores do sistema nervoso central e periférico. Contudo, podem haver outras funções além da neurogênese, como a observada em insetos onde participam do desenvolvimento do túbulo do Malpighi (ZHOU et al., 2008). De acordo com análise das sequências e funções em diferentes espécies, os genes *ac-sc* estão conservados evolutivamente. Homólogos foram isolados em diversos invertebrados e vertebrados, desde celenterados até humanos. Todos possuem um domínio conservado bHLH e alguns ainda apresentam um motivo C-terminal conservado (ZHOU et al., 2008). Recentemente, foi demonstrado que camundongos deletados de um gene homólogo *achaete-scute 1* não apresentavam células C que são consideradas como precursoras de câncer na tireóide (CHEN et al., 2005). Papel semelhante também foi demonstrado em possíveis células precursoras para câncer de pulmão (BALL, 2004). Estruturalmente, os genes que delimitam o *complexo achaete-scute* são *yellow* e *Citocromo P450 (CYP450)*, presentes na mesma posição na maioria das espécies. Negre e Simpson (2009) demonstraram que esta sintenia é mantida entre 18 espécies pertencentes a cinco diferentes linhagens. Apesar de existirem algumas evidências de que esta distribuição espacial foi conservada por questões funcionais, esta hipótese não foi comprovada. Em *Danio rerio* o gene *similar a complexo achaete-scute 1A e 1B*

(*ascl1a* e *ascl1b*) é altamente expresso no cérebro durante a embriogênese (ALLENDE e WEINBERG, 1994). Contudo, mutantes com falhas no gene *rad21*, que codifica uma subunidade de coesina (complexo protéico que participa da divisão mitótica), apresentaram inibição da expressão dos genes *ascl1a* e *ascl1b* (HORSFIELD et al., 2007). A sequência de *C. gigas* obtida no presente trabalho apresentou similaridade com o gene *ascl1b* de *Danio rerio*. Também foi identificada na biblioteca subtrativa o gene da *neurogenina 3*. Neurogeninas são parte de uma família de fatores de transcrição bHLH envolvidos na diferenciação de neurônios. *Neurogenina 3* (*ngn3*) foi identificada como um importante fator de transcrição necessário para as células endócrinas diferenciarem-se no trato gastrointestinal (JENNY et al., 2002). Contudo, após a diferenciação a expressão é inativada (SCHWITZGEBEL et al., 2000). Os moluscos apresentam um sistema nervoso simples, e poucos estudos existem sobre a neurogênese dessas espécies. Dados mostram que a neurogênese em moluscos difere em vários aspectos em relação a outros invertebrados bem estudados (ROLL e VORONEZHSKAYA, 1996). A indução de *ascl1b* e *ngn3* nos indivíduos expostos a esgoto doméstico poderia estar associada a algum composto xenobiótico com potencial neurotóxico.

Devido ao estresse gerado pelos poluentes presentes no esgoto doméstico, genes responsáveis pela resposta ao estresse foram ativados. Um deles é o *receptor de adenosina A1*. Adenosina é um metabólito do ATP, e participa de inúmeros processos fisiológicos nos organismos. Entre os mais estudados em mamíferos estão a sedação, braquiocardia, vasorelaxamento, inibição da lipólise e regulação do sistema imune (RAMKUMAR et al., 2001). Adenosina é produzida em ambientes hipóxicos, isquêmicos ou sob processo de inflamação, reduzindo os danos celulares e promovendo reparo (LINDEN, 2005). Também reduz os níveis de espécies reativas de oxigênio através da inibição da geração de ânions superóxidos por neutrófilos (RAMKUMAR et al., 2001). Grande parte destes processos ocorre através da ativação dos receptores de adenosina (AR). A adenosina se liga a quatro diferentes receptores acoplados a proteína G, bem conservados entre os vertebrados. Três deles (ARA1, ARA2a e AR2Ab) se ligam a droga mais utilizada mundialmente, a cafeína (FREDHOLM, 2007). Ortólogos de receptores de adenosina foram encontrados em *D. melanogaster* e outros protostômios. Burke e colaboradores (2006) encontraram o gene de AR no ouriço-do-mar

Strongylocentrotus purpuratus. Em peixes foram encontrados os receptores A1, em cérebro de *Danio rerio* (ROSERMBER et al., 2008), *Carassius auratus* (BERAUDI et al., 2003) e *Salmo trutta* (POLI et al., 1999). Em *C. auratus*, os receptores ARA1 se assemelham farmacologicamente e funcionalmente aos AR de mamíferos, porém com uma densidade muito menor. Barraco e Stefano (1990) demonstraram um possível envolvimento de receptores de adenosina na inibição na liberação de monoaminas no molusco bivalve *Mytillus edulis*. Em ratos, a ativação do subtipo A1 inibe os canais de cálcio voltagem dependentes pré-sinápticos em várias regiões do cérebro, contribuindo na citoproteção (RAMKUMAR et al., 2001). Os mesmos autores também observaram um aumento na atividade de enzimas antioxidantes com a administração de adenosina em ratos. Além disso, observaram que a expressão do subtipo A1 de recetores de adenosina era induzida pelo estresse oxidativo gerado por agentes antineoplásicos, quimioterápicos e H₂O₂, em células de músculo liso de hamster. Essa indução de ARA1 pode ser um mecanismo adaptativo ao estresse oxidativo. A exposição dos animais ao esgoto doméstico tem um potencial de causar estresse oxidativo celular. A indução deste gene encontrado em *C. gigas* poderia estar funcionando de maneira análoga ao encontrado em vertebrados, respondendo ao estresse para regular os mecanismos de citoproteção.

Outro gene identificado na lista dos genes ativados é o responsável pela codificação da *proteína QM*. O gene *QM* foi originamente identificado em experimentos de SSH de células cancerígenas humanas. A proteína QM foi proposta como sendo um supressor tumoral. Devido a esta importante função, diversos estudos foram realizados em várias espécies. Foram identificadas proteínas QM em plantas, animais e fungos, sendo estas, proteínas básicas e hidrofílicas, com pesos moleculares que variam de 24 a 26 kDa. Estas proteínas são altamente conservadas sugerindo funções fundamentais e críticas nos organismos eucariotos (XU et al., 2008). Estudos demonstram que as proteínas QM estão envolvidas no crescimento celular, diferenciação celular e apoptose (GREEN et al., 2000). A proteína QM atua juntamente com fatores transcricionais conhecidos em proliferação celular, apoptose e resposta ao estresse oxidativo (WEN et al., 2005). Porém, as funções precisas das proteínas QM permanecem incertas (XU et al., 2008). Um fragmento de um gene *QM-like* foi encontrado em camarões infectados pelo vírus da mancha branca, com a técnica de SSH, considerando então uma possível função imunológica em

invertebrados (HE et al., 2004; PAN et al., 2005). Xu e colaboradores (2008) observaram que o gene da *proteína QM* é induzido em camarões resistentes a vírus. Os resultados demonstraram que a proteína correspondente poderia regular a atividade de fenol oxidase interagindo com hemocianina, sugerindo o envolvimento da proteína QM na ativação do sistema imune dos camarões. Pan e colaboradores (2005) sugeriram o envolvimento da proteína QM com processo apoptótico, onde uma maior expressão do gene estaria relacionado com a remoção de células infectadas por vírus em camarões. A indução encontrada no presente trabalho poderia estar relacionada a uma situação de estresse oxidativo, processo apoptótico ou mesmo a uma função putativa de supressor tumoral, devido a presença de compostos carcinogênicos no esgoto doméstico.

Ainda na classe de genes de resposta ao estresse, foi identificado o gene da *proteína de choque térmico pequena*. Pequenas proteínas de choque térmico são parte de uma família de chaperonas moleculares induzidas por estresse, com tamanho entre 12 a 43 kDa. Um dos subtipos, a proteína de choque térmico pequena 20 pode participar na modulação dos sistemas de defesa celulares na resposta ao estresse ambiental (SEO et al., 2006a). Seo e colaboradores (2006a) observaram que bactérias *Escherichia coli* transformadas com gene da proteína de choque térmico pequena 20 apresentavam uma maior termotolerância. As proteínas de choque térmico são expressas em muitos tecidos, a indução na expressão de pequenas proteínas de choque térmico melhora a taxa de sobrevivência de células expostas a uma variedade de agentes estressores, como por exemplo o estresse oxidativo (WELSH et al., 1998; ARRIGO et al., 2005) e exposição a toxinas ambientais. O copépoda *Tigriopus japonicus* apresenta expressão diferencial do gene da *pequena proteína de choque térmico 20*, quando expostos a diversos desreguladores endócrinos (SEO et al., 2006b). Guay e colaboradores (1997) propuseram que uma mudança conformacional permitiria a ligação da pequena proteína de choque térmico a actina, prevenindo despolimerização como uma resposta adaptativa as condições de estresse.

O gene da ubiquitina também foi induzido nas ostras *C. gigas* expostas ao esgoto doméstico. Ubiquitina é uma pequena e altamente conservada proteína regulatória expressa em todos eucariotos. Ubiquitinação é uma modificação pós-traducional de proteínas causada pela ligação covalente de monômeros de

ubiquitina. A função mais comum desta modificação é a marcação para degradação proteossomal, mas também serve para controlar a estabilidade, função e localização intracelular de uma variedade de proteínas. A indução do gene da ubiquitina pode estar relacionada aos mecanismos de resposta ao estresse, eliminando proteínas danificadas ou mal-formadas com potencial de dano celular.

O gene da *ferritina* também foi induzido no presente trabalho. As duas isoformas conhecidas de *C. gigas* foram identificadas, GF1 e GF2. A ferritina apresenta duas funções, detoxificação do ferro livre e armazenamento do mesmo. Com a última função, acumulando o excesso de ferro livre, a proteína desempenha importante papel na homeostase celular, sendo a fonte fisiológica de ferro para a célula. A ferritina é amplamente distribuída entre as espécies e altamente conservada (DURAND et al., 2004). A expressão gênica da ferritina é induzida ou controlada por diferentes tipos de moléculas, incluindo ferro, outros metais traços, citocinas, hormônios, drogas e cAMP (ZAPATA et al., 2009). No bivalve *Pinctada fucata*, esta proteína está relacionada com a formação da concha em adultos (ZHANG et al., 2003). A expressão de ferritina foi induzida em camarões expostos a estresse por pH, tanto ácido quanto alcalino, respondendo mais sensivelmente ao pH alto (ZHOU et al., 2008). Torti e Torti (2002) sugerem que a ferritina não seja somente considerada como proteína regulatória do grupo ferro, mas seja incluída nas famílias que orquestram a defesa celular contra o estresse e a inflamação. Algumas ferritinas de invertebrados foram induzidas após infecção por lipopolissacarídeos (BECK et al., 2002). Alguns patógenos dependem do ferro livre e a quelação do ferro livre pela ferritina pode auxiliar no combate a estes organismos invasores (TANGUY et al., 2008). Martinovic e colaboradores (2008) observaram uma indução de ferritina na resposta a hipóxia em *Danio rerio*. Também foi sugerido um papel na proteção contra radicais livres (ORINO et al., 1997). Existem poucos estudos sobre o papel da ferritina a nível molecular em moluscos (DE ZOYSA e LEE, 2007). A indução do gene da ferritina no presente trabalho possivelmente esteja relacionada a proteção contra estresse oxidativo e a homeostase do ferro livre.

O último gene desta categoria é a *carvotina*. A carvotina foi descrita inicialmente no molusco *Perna canaliculatus*, como um grande agregado protéico formado por centenas de subunidades semelhantes a partículas virais, que

representam grande parte das proteínas livres na hemolinfa (SCOTTI et al., 2001). Carvotina é uma proteína não-pigmentada, glicosilada, com atividade de inibição de protease sérica, sendo associada com ferro, indicando uma possível função como quelante (ZAPATA et al., 2009). Tem sido proposta que a função da carvotina esteja relacionada com o armazenamento de oxigênio, transporte de proteínas, ligação a lipopolissacarídeos, e possivelmente ligada ao sistema imune (GONZALEZ et al., 2005). Delaporte e colaboradores (2007) também sugerem que este gene possa contribuir no processo de detoxificação de espécies reativas de oxigênio. Estudos anteriores mostraram que esta proteína é regulada por hipóxia em *C. gigas* (DAVID et al., 2005). Zapata et al. (2009) observaram uma indução deste gene no molusco *Argopecten purpuratus* após 8 dias de exposição a cobre. O gene da *carvotina* também foi induzido em ostras *C. gigas* resistentes à mortalidade de verão (HUVET et al., 2004). Ostras *Crassostrea virginica* apresentaram aumento na expressão gênica da carvotina em situações de infecção (TANGUY et al., 2004). Goldstone et al. (2006) encontraram um gene relacionado a carvotina de moluscos em ouriço-do-mar. A *carvotina* poderia estar sendo induzida pelas espécies reativas de oxigênio geradas pela biotransformação dos contaminantes, assim como pela própria hipóxia que é comum em ambientes poluídos. Poderia também estar atuado como quelante de possíveis metais pesados encontrados no esgoto doméstico.

Alguns genes de metabolismo básico foram também identificados na biblioteca subtrativa das ostras expostas ao esgoto. Um deles é o *fator de ribosilação de ADP-like 6*. A superfamília Ras de proteínas de baixo peso molecular ligantes de GTP podem ser divididas em diversos subgrupos com diversas funções, incluindo proliferação celular e diferenciação (Ras), rastreamento intracelular (Rab), remodelamento do citoesqueleto (Rho) e transporte nuclear (Ran). A característica comum desta superfamília é a regulação por hidrólise de GTP (INGLEY et al., 1999). Fatores de ribosilação de ADP (ARF) e as estruturalmente similares proteínas ARF-like (ARL) são parte da superfamília RAS de GTPases regulatórias (SEBALD et al., 2003). Fatores de ribosilação de ADP são reguladores cruciais da secreção, endocitose, fagocitose e transdução de sinal (BURD et al., 2004). ARL-6 apresenta um padrão de expressão único entre a família ARF/ARL com os maiores níveis de RNAm encontrados no cérebro e rins. Isso sugere que ARL-6 possui importante função nestes tecidos, e ambos possuem uma importante função de secreção, como

liberação de neurotransmissores no cérebro e secreção de eritropoietina dos rins (INGLEY et al., 1999). Contudo, a função precisa da ARL-6 é desconhecida (CHIANG et al., 2004). As funções celulares da maioria das ARL GTPases é desconhecida, e as especulações sobre suas funções são direcionadas na maioria pelo conhecimento de sua localização intracelular e pela identificação de proteínas ligantes de ARL (PASQUALATO et al., 2002; BURD et al., 2004). Medeiros e colaboradores (2008a) também encontraram uma sequência pertencente a esta superfamília nos genes induzidos ao esgoto doméstico em *C. gigas*, sendo no caso o gene de *Small Rho GTPase*.

O gene da *colestoquinina (CCK)* também induzido nos animais expostos codifica uma proteína que é normalmente secretada pelas células endócrinas no intestino de mamíferos. CCK é chave na regulação das funções gastrointestinais, como secreção de ácido e inibição da fome. Assim, coordena a entrada de nutrientes conforme as necessidades do organismo. Porém apresenta também funções digestivas (RAYBOULD, 2007). A liberação de CCK induz a satisfação alimentar, processo que é disparado com o término de refeições (MACINTOSH et al., 1999; RAYBOULD, 2007). Murashita e colaboradores (2009) demonstraram que os subtipos CCK-L e CCK-N são principalmente expressos no cérebro, em níveis maiores do que no trato gastrointestinal. A indução da CCK na glândula digestiva de *C. gigas* poderia estar associada ao sinal de saciedade, devido a grande quantidade de matéria orgânica encontrada nesse tipo de ambiente, servindo de alimento para as ostras. O gene que codifica a enzima *mevalonato quinase (MVK)*, enzima chave na via do mevalonato pertencente a via de biosíntese de isopentenil difosfato (VOYNOVA et al., 2004), também foi induzido nos animais expostos ao esgoto doméstico. A síntese ocorre a partir de acetil-CoA ou gliceraldeído 3-fosfato e piruvato. Em células eucarióticas, a via do mevalonato produz esteróis e alguns tipos de isoprenóides, que estão envolvidos na estrutura de membrana, glicosilação e transdução de sinal (HUANG et al., 1999). Na comparação entre as espécies onde a enzima teve sua sequência descrita, foi observado um alto grau de heterologia entre as sequências deduzidas (CHO et al., 2001).

Outro gene identificado nos animais expostos ao esgoto pertence a família dos transportadores. Os transportadores presentes em todas as células e organelas, controlam a entrada e o efluxo de componentes cruciais como carboidratos,

aminoácidos, nucleotídeos, íons inorgânicos, xenobióticos, entre outros. Cerca de 300 genes são conhecidos por codificar *proteínas carreadoras de soluto* (SLC), participando na manutenção da homeostase celular. Esses genes são classificados em 43 famílias gênicas (HEDIGER et al., 2004). Os membros das famílias SLC possuem variadas propriedades bioquímicas, podendo ser transportadores acoplados, transportadores passivos, ou translocando moléculas devido ao gradiente de concentração. A localização celular também varia com a maioria dos transportadores estando na membrana plasmática, com menor número na mitocôndria ou perioxossomos (FREDRIKSSON et al., 2008). O membro 8 da família 9 de carreadores de soluto é caracterizado por realizar a transferência do íon sódio pelo íon hidrogênio, contribuindo na homeostase celular, que pode estar sendo interferida pelos poluentes presentes no esgoto doméstico.

A última classe de genes identificada está relacionada com os processos de transcrição e tradução. O gene *Fator de alongamento 1 alfa* (EF1) codifica uma GTPase conservada, cofator na síntese protéica de eucariotos, responsável pela ligação do aminoacil-tRNA ao ribossomo durante o alongamento dos polipeptídeos (EDMONDS et al., 1996; TALAPATRA et al., 2002). Em ostras *C. gigas* submetidas a hipoxia *EF1* foi induzida (DAVID et al., 2005), assim como no copépoda *Calanus finmarchicus* exposto a estressores ambientais (HANSEN et al., 2007). Talapatra e colaboradores (2002) observaram que a expressão de *EF1* previniu a morte celular por estresse no retículo endoplasmático (RE), sugerindo uma função de regulador do estresse da organela. Em contrapartida, Dhar e colaboradores (2009) elegeram a *EF1* como o melhor gene referência para estudos com camarões infectados pelo vírus da mancha branca. Outro gene identificado codifica a *proteína ribonuclear heterogênea D*. Regulação da estabilidade do RNAm é um importante mecanismo de controle da expressão gênica. A meia-vida de um RNAm varia de alguns minutos até dias. Genes que controlam funções importantes como crescimento celular, repostas inflamatórias do sistema imunológico e transdução do sinal tem uma meia vida muito curta, em torno de 15 a 40 minutos. Irregularidades nesta estabilidade podem trazer profundas consequências que podem ser manifestadas em diferentes fenótipos (KILEDJIAN et al., 1997). Um dos determinantes de instabilidade é composto pelos elementos ricos em adenosina e uracila (ARE), encontrados na região 3' não traduzidas de muitos genes. As regiões ARE são rapidamente

degradadas, com o restante do RNAm sendo destruído na sequência (WAGNER et al., 1998). Zhang e colaboradores (1993) descreveram a purificação e caracterização de *AUF1*, um mediador da degradação da região ARE nos RNAm. *AUF1* se liga a moléculas RNA que possuem sequências ARE, não demonstrando afinidade pelos RNA que não o possuem.

Vários genes que codificam proteínas ribossomais foram identificados neste estudo. Estas proteínas são componentes integrais da maquinaria celular basal envolvida na síntese de proteínas. Contudo, proteínas ribossomais, assim como fatores de transcrição e alongamento foram identificados como envolvidos na regulação celular, transformação e morte, conferindo novas funções a estas proteínas (ZAPATA et al., 2009). Segundo Noara e Noara (1999), seus produtos gênicos podem estar relacionados a ajustes metabólicos durante o estresse em geral.

Comparando a metodologia de SSH utilizada em experimento em aquários (MEDEIROS et al., 2008a) com o presente trabalho houve uma diferença no perfil de expressão gênica. Foi observada uma alta redundância de genes de proteínas ribossomais e mitocondriais desconhecidas, o que pode ter dificultado a identificação de outros genes de resposta a contaminação. No trabalho de Medeiros e colaboradores (2008a), apesar de terem sido sequenciados um número bem menor de clones (cerca de 70) foi possível identificar genes de biotransformação de fase I, II e III, como os utilizados nos experimentos com PCR em tempo real no primeiro capítulo desta dissertação. Esta diferença no resultado das hibridizações subtrativas, assim como discutido anteriormente no primeiro capítulo, deve-se possivelmente a forma de exposição ao esgoto doméstico, onde no experimento de laboratório (Medeiros, et al., 2008a) esta exposição aos poluentes foi contínua e com quantidades controladas de esgoto doméstico não-tratado. Já no experimento de campo, a concentração de esgoto certamente foi menor e variável ao longo do tempo, devido as variações ambientais.

Assim, através deste trabalho foi possível acrescentar novas informações que poderão contribuir para a elucidação dos mecanismos gênicos envolvidos na contaminação por esgoto doméstico em ostras *C. gigas*, contudo novos estudos são necessários para a validação destes resultados em campo. Os genes aqui encontrados precisam passar por uma validação com metodologias mais sensíveis,

como o PCR quantitativo em tempo real. Alguns genes podem se tornar candidatos a biomarcadores de exposição, como a proteína QM, transgelina e as proteínas de estresse. O perfil de expressão identificado mostra que grande parte da maquinaria metabólica do organismo é afetada pela exposição ao esgoto doméstico, demonstrando uma grande capacidade adaptativa destes organismos sentinela em estudos de ecotoxicologia molecular.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

- A utilização da técnica de SSH em ostras *Crassostrea gigas* expostas a esgoto doméstico *in situ* gerou uma biblioteca subtrativa de 614 clones, sendo 463 clones sequenciados contendo fragmentos de genes induzidos pela contaminação;
- Cerca de 30% das sequências obtidas não puderam ser classificadas satisfatoriamente, devido a carência de sequências similares depositadas no banco de genes;
- Foram encontrados 44 genes responsáveis por diferentes funções nos organismos expostos, como integrantes da estrutura e citoesqueleto, cadeia respiratória, desenvolvimento e diferenciação, divisão celular, estresse celular, metabolismo básico, maquinaria transcricional e traducional, transporte e armazenamento;
- O aumento da expressão destes genes será validado, para que possam integrar a bateria de genes candidados a biomarcadores de exposição a esgoto doméstico. Essa validação será feita por qPCR a partir de iniciadores específicos já desenhados;
- Estes mesmos genes, caso sejam validados, também devem ter suas sequências completas obtidas através de uso de técnicas como RACE, para amplificação das extremidades 5' e 3' dos respectivos genes, visando sua correta classificação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABESSA, D.; CARR, R.; RACHID, B.; SOUSA, E.; HORTELANI, M.; SARKIS, J. Influence of a Brazilian sewage outfall on the toxicity and contamination of adjacent sediments. **Marine pollution bulletin**, v. 50(8), p. 875-885, 2005.

ALLENDE, M.L. e WEINBERG, E.S. The expression pattern of two zebrafish achaete-scute homolog (ash) genes is altered in the embryonic brain of the cyclops mutant. **Development Biology**, v. 166, p. 509–530, 1994.

ARRIGO, A.P.; VIROT, S.; CHAUFOUR, S.; FIRDAUS, W.; KRETZ-REMY, C.; DIAZ-LATOUD, C. Hsp27 consolidates intracellular redox homeostasis by upholding glutathione in its reduced form and by decreasing iron intracellular levels. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 7(3-4), p. 414-422, 2005.

ARUKWE, A.; NORDTUG, T.; KORTNER, T.M.; MORTENSEN, A.S.; BRAKSTAD, O.G. Modulation of steroidogenesis and xenobiotic biotransformation responses in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to water-soluble fraction of crude oil. **Environmental Research**, v. 107(3), p. 362-370, 2008.

ASSINDER, S.J.; STANTON, J.A.L.; PRASAD, P.D. Transgelin: An actin-binding protein and tumour suppressor. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 41(3), p. 482-486, 2009.

ATAMNA, H. Heme binding to amyloid-beta peptide: mechanistic role in Alzheimer's disease. **Journal of Alzheimers Disease**, v. 10, p. 255–266, 2006.

AZEVEDO, T. Em SC, só 9,69% têm rede de coleta de esgoto. **Jornal Diário Catarinense, Florianópolis**, 10 jun. 2008. Geral, p. 28.

BAIN, L.J. cDNA cloning, sequencing, and differential expression of a heart-type fatty acid-binding protein in the mummichog (*Fundulus heteroclitus*). **Marine environmental research**, v. 54(3-5), p. 379-383, 2002.

BAINY, A.C.D.; ALMEIDA, E.A.; MULLER, I.C.; VENTURA, E.C.; MEDEIROS, I.D. Biochemical responses in farmed mussel *Perna perna* transplanted to contaminated sites on Santa Catarina Island, SC, Brazil. **Marine Environmental Research**, v. 50, p. 411-416, 2000.

BALL, D.W. Achaete-scute homolog-1 and Notch in lung neuroendocrine development and cancer. **Cancer letters**, v. 204(2), p. 159-169, 2004.

BARD, S.M. Multixenobiotic resistance as a cellular defense mechanism in aquatic organisms. **Aquatic Toxicology**, v. 48(4), p. 357-389, 2000.

BARRACO, R.A. e STEFANO, G.B. Pharmacological evidence for the modulation of monoamine release by adenosine in the invertebrate nervous system. **Journal of neurochemistry**, v. 54(6), p. 2002-6, 1990.

BARTEK, J. e LUKAS, J. Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. **Cancer Cell**, v. 3(5), p. 421-429, 2003.

BECK, G.; ELLIS, T.W.; HABICHT, G.S.; SCHLUTER, S.F.; MARCHALONIS, J.J. Evolution of the acute phase response: iron release by echinoderm (*Asterias forbesi*) coelomocytes, and cloning of an echinoderm ferritin molecule. **Dev. Comp. Immunol**, v. 26, p. 11-26, 2002.

BEEBY, A. What do sentinels stand for? **Environmental Pollution**, v. 112, p. 285-298, 2001.

BERAUDI, A.; TRAVERSA, U.; VILLANI, L.; SEKINO, Y.; NAGY, J.; POLI, A. Distribution and expression of A1 adenosine receptors, adenosine deaminase and adenosine deaminase-binding protein (CD26) in goldfish brain. **Neurochemistry international**, v. 42(6), p. 455-464, 2003.

BLAKELY, E.; MITCHELL, A.; FISHER, N.; MEUNIER, B.; NIJTMANS, L.; SCHAEFER, A.; JACKSON, M.; TURNBULL, D.; TAYLOR, R. A mitochondrial cytochrome b mutation causing severe respiratory chain enzyme deficiency in humans and yeast. **The FEBS journal**, v. 272(14), p. 3583-92, 2005.

BOARD, P.G.; COGGAN, M.; CHELVANAYAGAM, G.; EASTEAL, S.; JERMIIN, L.S.; SCHULTE, G.K.; DANLEY, D.E.; HOTH, L.R.; GRIFFOR, M.C.; KAMATH, A.V.; ROSNER, M.H.; CHRUNYK, B.A.; PERREGAUX, D.E.; GABEL, C.A.; GEOGHEGAN, K.F.; PANDIT, J. Identification, characterization, and crystal structure of the Omega class glutathione transferases. **The Journal of biological chemistry**, v. 275(32), p. 24798-806, 2000.

BOARD, P.G. e ANDERS, M.W. Glutathione transferase omega 1 catalyzes the reduction of S-(phenacyl) glutathiones to acetophenones. **Chemical Research in Toxicology**, v. 20(1), p. 149-154, 2007.

BOUTET, I.; TANGUY, A.; MORAGA, D. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hydrocarbon contamination under experimental conditions. **Gene**, v. 329, p. 147-157, 2004.

BRULLE, F.; COCQUERELLE, C.; MITTA, G.; CASTRIC, V.; DOUAY, F.; LEPRÊTRE, A.; VANDENBULCKE, F. Identification and expression profile of gene transcripts differentially expressed during metallic exposure in *Eisenia fetida* coelomocytes. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 32(12), p. 1441-1453, 2008.

BULTELLE, F.; PANCHOUT, M.; LÉBOULENGER, F.; DANGER, J. Identification of differentially expressed genes in *Dreissena polymorpha* exposed to contaminants. **Marine environmental research**, v. 54(3-5), p. 385-389, 2002.

BURD, C.; STROCHLIC, T.; GANGI SETTY S. Arf-like GTPases: not so Arf-like after all. **Trends in cell biology**, v. 14(12), p. 687-694, 2004.

BURGEOT, T.; BOCQUENE, G.; PORTE, C.; DIMEET, J.; SANTELLA, R.M.; GARCIA DE LA PARRA, L.M.; PFHOL-LESZKOWICZ, A.; RAOUX, C.; GALGANI, F. Bioindicators of pollutant exposure in the northwestern Mediterranean Sea. **Marine Ecology Progress Series**, v. 131, p. 125-141, 1996.

BURKE, R.D.; ANGERER, L.M.; ELPHICK, M.R.; HUMPHREY, G.W.; YAGUCHI, S.; KIYAMA, T.; LIANG, S.; MU, X.; AGCA, C.; KLEIN, W.H.; BRANDHORST, B.P.; ROWE, M.; WILSON, K.; CHURCHER, A.M.; TAYLOR, J.S.; CHEN, N.; MURRAY, G.; WANG, D.; MELLOTT, D.; OLINSKI, R.; HALLBÖÖK, F.; THORNDYKE, M.C. A genomic view of the sea urchin nervous system. **Developmental Biology**, v. 300(1), p. 434-60, 2006.

BURMEISTER, C.; LÜERSEN, K.; HEINICK, A.; HUSSEIN, A.; DOMAGALSKI, M.; WALTER, R.D.; LIEBAU, E. Oxidative stress in *Caenorhabditis elegans*: protective effects of the Omega class glutathione transferase (GSTO-1). **The FASEB journal**, v. 22(2), p. 343-54, 2008.

BUSTIN, S.A.; BENES, V.; GARSON, J.A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, M.W.; SHIPLEY, G.L. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55(4), p. 611, 2009.

CAJARAVILLE, M.P.; BEBIANNO, M.J.; BLASCO, J.; PORTE, C.; SARASQUETE, C.; VIARENGO, A. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. **The Science of the Total Environment**, v. 247, p. 295-311, 2000.

CANE, P.A.; COOK, P.; RATCLIFFE, D.; MUTIMER, D.; PILLAY, D. Use of real time PCR and fluorimetry to detect lamivudine resistance-associated mutations in hepatitis B virus. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, p. 1600– 1608, 1999.

CHALER, R.; CANTON, L.; VAQUERO, M.; GRIMALT, J.O. Identification and quantification of n-octyl esters of alkanolic and hexanedioic acids and phthalates as urban wastewater markers in biota and sediments from estuarine areas. **Journal of Chromatography A**, v. 1046, p. 203–210, 2004.

CHEN, H.; KUNNIMALAIYAAN, M.; VAN GOMPEL, J.J. Medullary thyroid cancer: the functions of raf-1 and human achaete-scute homologue-1. **Thyroid : official journal of the American Thyroid Association**, v. 15(6), p. 511-21, 2005.

CHEUNG, C.C.C.; ZHENG, G.J.; LAM, P.K.S.; RICHARDSON, B.J. Relationships between tissue concentrations of chlorinated hydrocarbons (polychlorinated biphenyls and chlorinated pesticides) and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis*. **Marine Pollution Bulletin**, v. 45, p. 181-191, 2002.

CHIANG, A.; NISHIMURA, D.; SEARBY, C.; ELBEDOUR, K.; CARMI, R.; FERGUSON, A.; SECRIST, J.; BRAUN, T.; CASAVANT, T.; STONE, E. Comparative genomic analysis identifies an ADP-ribosylation factor-like gene as the cause of Bardet-Biedl syndrome (BBS3). **The American Journal of Human Genetics**, v. 75(3), p. 475-484, 2004.

CHMURZYŃSKA, A. The multigene family of fatty acid-binding proteins (FABPs): function, structure and polymorphism. **Journal of Applied Genetics**, v. 47(1), p. 39-48, 2006.

CHO, Y.; RIOS, S.; KIM, J.; MIZIORKO, H. Investigation of Invariant Serine/Threonine Residues in Mevalonate Kinase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276(16), p. 12573-12578, 2001.

CLARK, R.B. **Marine Pollution**. Oxford: Claredo Press, p. 132, 1992.

CONESA, A.; GÖTZ, S.; GARCÍA-GÓMEZ, J.M.; TEROL, J.; TALÓN, M.; ROBLES, M. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. **Bioinformatics**, v. 21(18), p. 3674-6, 2005.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE (CONAMA), 2005. Resolução No 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes. Disponível no endereço: <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>, acessado em 20 de julho de 2008.

COSSEAU, C.; AZZI, A.; SMITH, K.; FREITAG, M.; MITTA, G.; GRUNAU, C. Native chromatin immunoprecipitation (N-ChIP) and ChIP-Seq of *Schistosoma mansoni*: Critical experimental parameters. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 166(1), p. 70-6, 2009.

CROLEY, T.R.; HUGHES, R.J.; METCALFE, C.D.; MARCH, D.E. Mass spectrometry applied to the analysis of estrogens in the environment. **Rapid Communications of Mass Spectrometry**, v. 14(13), p. 1087-1093, 2000.

CROLL, R.P e VORONEZHSKAYA, E.E. Early elements in gastropod neurogenesis. **Developmental Biology**, v. 173(1), p. 344-7, 1996.

CURIEUX-BELFOND, O.; FIEVET, B.; SERALINI, G.E.; MATHIEU, M. Short-term bioaccumulation, circulation and metabolism of estradiol-17 β in the oyster *Crassostrea gigas*. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 325(2), p. 125-133, 2005.

DAVID, E.; TANGUY, A.; PICHAVANT, K.; MORAGA, D. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hypoxia exposure under experimental conditions. **The FEBS journal**, v. 272(21), p. 5635-52, 2005.

DELAPORTE, M.; SOUDANT, P.; LAMBERT, C.; JEGADEN, M.; MOAL, J.; POUVREAU, S.; DÉGREMONT, L.; BOUDRY, P.; SAMAIN, J. Characterisation of physiological and immunological differences between Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) genetically selected for high or low survival to summer mortalities and fed different rations under controlled conditions. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 353(1), p. 45-57, 2007.

DE ZOYSA, M.; e LEE, J. Two ferritin subunits from disk abalone (*Haliotis discus discus*): Cloning, characterization and expression analysis. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 23(3), p. 624-635, 2007.

DHAR, A.K.; BOWERS, R.M.; LICON, K.S.; VEAZEY, G.; READ, B. Validation of reference genes for quantitative measurement of immune gene expression in shrimp. **Molecular Immunology**, v. 46(8-9), p. 1688-95, 2009.

DIATCHENKO, L.; LAU, Y.F.; CAMPBELL, A.P.; CHENCHIK, A.; MOQADAM, F.; HUANG, B.; LUKYANOV, S.; LUKYANOV, K.; GURSKAYA, N.; SVERDLOV, E.D.; SIEBERT, P.D. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93(12), p. 6025-30, 1996.

DORSETT, D. Roles of the sister chromatid cohesion apparatus in gene expression, development, and human syndromes. **Chromosoma**, v. 116(1), p. 1-13, 2007.

DUNCAN, R.; FAGGART, M.A.; ROGER, A.J.; CORNELL, N.W. Phylogenetic analysis of the 5-aminolevulinic synthase gene. **Molecular Biology and Evolution**, v. 16(3), p. 383-396, 1999.

DURAND, J.; GOUDARD, F.; PIERI, J.; ESCOUBAS, J.; SCHREIBER, N.; CADORET, J. *Crassostrea gigas* ferritin: cDNA sequence analysis for two heavy chain type subunits and protein purification. **Gene**, v. 338(2), p. 187-195, 2004.

EDMONDS, B.; WYCKOFF, J.; YEUNG, Y.; WANG, Y.; STANLEY, E.; JONES, J.; SEGALL, J.; CONDEELIS, J. Elongation factor-1 alpha is an overexpressed actin binding protein in metastatic rat mammary adenocarcinoma. **Journal of Cell Science**, v. 109(11), p. 2705-2714, 1996.

ENDERS, G.H. Expanded roles for Chk1 in genome maintenance. **The Journal of biological chemistry**, v. 283(26), p. 17749-52, 2008.

ESTEVEES, A. e EHRLICH, R. Invertebrate intracellular fatty acid binding proteins. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C, v. 142(3-4), p. 262-74, 2006.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M.; GREEN, P. Basecalling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, v. 8, p. 175-185, 1998.

EWING, B. e GREEN, P. Basecalling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, v. 8, p. 186-194, 1998.

FENT, K. Ecotoxicological effects at contaminated sites. **Toxicology**, v. 205(3), p. 223-240, 2004.

FRASER, D.J.; ZUMSTEG, A.; MEYER, U.A. Nuclear receptors CAR and PXR activate a drug responsive enhancer of the murine 5-aminolevulinic acid synthase gene. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278(41), p. 39392-401, 2003.

FREDHOLM, B. Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair. **Cell Death and Differentiation**, v. 14(7), p. 1315-23, 2007.

FREDRIKSSON, R.; NORDSTRÖM, K.J.; STEPHANSSON, O.; HÄGGLUND, M.G.; SCHIÖTH, H.B. The solute carrier (SLC) complement of the human genome: phylogenetic classification reveals four major families. **FEBS letters**, v. 582(27), p. 3811-6, 2008.

GAGNÉ, F.; BLAISE, C.; ANDRÉ, C.; SALAZAR, M. Effects of pharmaceutical products and municipal wastewaters on temperature-dependent mitochondrial electron transport activity in *Elliptio complanata* mussels. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 143(4), p. 388-393, 2006.

GAGNÉ, F.; BLAISE, C.; PELLERIN, J.; ANDRE, C. Neuroendocrine disruption in *Mya arenaria* clams during gametogenesis at sites under pollution stress. **Marine Environmental Research**, v. 64(2), p. 87-107, 2007.

GALLOWAY, T.S.; BROWN, R.J.; BROWNE, M.A.; DISSANAYAKE, A.; LOWE, D.; JONES, M.B.; DEPLEDGE, M.H. A multi-biomarker approach to ecosystem management. **Marine Environmental Research**, v. 58, p. 233-237, 2004.

GIBSON, R.; WANG, M.; PADGETT, E.; BECK, A. Analysis of 4-nonylphenols, phthalates and polychlorinated biphenyls in soils and biosolids. **Chemosphere**, v. 61, p. 1336-1344, 2005.

GOLDSTONE, J.V.; HAMDOUN, A.; COLE, B.J.; HOWARD-ASHBY, M.; NEBERT, D.W.; SCALLY, M.; DEAN, M.; EPEL, D.; HAHN, M.E.; STEGEMAN, J.J. The chemical defensome: environmental sensing and response genes in the *Strongylocentrotus purpuratus* genome. **Developmental Biology**, v. 300(1), p. 366-384, 2006.

GOLDSTONE, J.V.; GOLDSTONE, H.M.; MORRISON, A.M.; TARRANT, A.; KERN, S.E.; WOODIN, B.R.; STEGEMAN, J.J. Cytochrome P450 1 genes in early deuterostomes (tunicates and sea urchins) and vertebrates (chicken and frog): origin and diversification of the CYP1 gene family. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24(12), p. 2619-31, 2007.

GONZALEZ, F.J. Role of cytochromes P450 in chemical toxicity and oxidative stress: studies with CYP2E1. **Mutation Research**, v. 569(1-2), p. 101-110, 2005.

GONZALEZ, M.; ROMESTAND, B.; FIEVET, J.; HUVET, A.; LEBART, M.; GUEGUEN, Y.; BACHÈRE, E. Evidence in oyster of a plasma extracellular superoxide dismutase which binds LPS. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 338(2), p. 1089-1097, 2005.

GOWLAND, B.T.G.; MCINTOSH, A.D.; DAVIES, I.M.; MOFFAT, C.F.; WEBSTER, L. Implications from a field study regarding the relationship between polycyclic aromatic hydrocarbons and glutathione S-transferase activity in mussels. **Marine Environmental Research**, v. 54(3-5), p. 231-235, 2002.

GREEN, H.; CANFIELD, A.E.; HILLARBY, M.C.; GRANT, M.E.; BOOT-HANDFORD, R.P.; FREEMONT, A.J.; WALLIS, G.A. The ribosomal protein QM is expressed differentially during vertebrate endochondral bone development. **Journal of bone and mineral research**, v. 15(6), p. 1066-75, 2000.

GREEN, T.J.; DIXON, T.J.; DEVIC, E.; ADLARD, R.D.; BARNES, A.C. Differential expression of genes encoding anti-oxidant enzymes in Sydney rock oysters, *Saccostrea glomerata* (Gould) selected for disease resistance. **Fish & shellfish immunology**, v. 26(5), p. 799-810, 2009.

GUAY, J.; LAMBERT, H.; GINGRAS-BRETON, G.; LAVOIE, J.; HUOT, J.; LANDRY, J. Regulation of actin filament dynamics by p38 map kinase-mediated phosphorylation of heat shock protein 27. **Journal of Cell Science**, v. 110(3), p. 357-368, 1997.

HALM, S.; KWON, J.; RAND-WEAVER, M.; SUMPTER, J.; POUNDS, N.; HUTCHINSON, T.; TYLER, C. Cloning and gene expression of P450 17 α -hydroxylase, 17, 20-lyase cDNA in the gonads and brain of the fathead minnow *Pimephales promelas*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 130(3), p. 256-266, 2003.

HANSEN, B.H.; ALTIN, D.; NORDTUG, T.; OLSEN, A.J. Suppression subtractive hybridization library prepared from the copepod *Calanus finmarchicus* exposed to a sublethal mixture of environmental stressors. **Comparative Biochemistry And Physiology D**, v. 2(3), p. 250-256, 2007.

HE, N.; LIU, H.; XU, X. Identification of genes involved in the response of haemocytes of *Penaeus japonicus* by suppression subtractive hybridization (SSH) following microbial challenge. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 17(2), p. 121-128, 2004.

HEDIGER, M.; ROMERO, M.; PENG, J.; ROLFS, A.; TAKANAGA, H.; BRUFORD, E. The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteins. **Pflügers Archiv European Journal of Physiology**, v. 447(5), p. 465-468, 2004.

HORSFIELD, J.A.; ANAGNOSTOU, S.H.; HU, J.K.; CHO, K.H.; GEISLER, R.; LIESCHKE, G.; CROSIER, K.E.; CROSIER, P.S. Cohesin-dependent regulation of Runx genes. **Development**, v. 134(14), p. 2639-49, 2007.

HOU, F. e ZOU, H. Two human orthologues of Eco1/Ctf7 acetyltransferases are both required for proper sister-chromatid cohesion. **Molecular biology of the cell**, v. 16(8), p. 3908-3918, 2005.

HUANG, X. e MADAN, A. CAP3: A DNA sequence assembly program. **Genome Research**, v. 9(9), p. 868-77, 1999.

HUANG, K.; SCOTT, A.; BENNETT, G. Overexpression, purification, and characterization of the thermostable mevalonate kinase from *Methanococcus jannaschii*. **Protein expression and purification**, v. 17(1), p. 33-40, 1999.

HUVET, A.; HERPIN, A.; DÉGREMONT, L.; LABREUCHE, Y.; SAMAIN, J.; CUNNINGHAM, C. The identification of genes from the oyster *Crassostrea gigas* that are differentially expressed in progeny exhibiting opposed susceptibility to summer mortality. **Gene**, v. 343(1), p. 211-220, 2004.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Pesquisa nacional de saneamento**, 2000.

INGLEY, E.; WILLIAMS, J.H.; WALKER, C.E.; TSAI, S.; COLLEY, S.; SAYER, M.S.; TILBROOK, P.A.; SARNA, M.; BEAUMONT, J.G.; KLINKEN, S.P. A novel ADP-ribosylation like factor (ARL-6), interacts with the protein-conducting channel SEC61-beta subunit. **FEBS letters**, v. 459(1), p. 69-74, 1999.

JENNY, M.; U.H.L., C.; ROCHE, C.; DULUC, I.; GUILLERMIN, V.; GUILLEMOT, F.; JENSEN, J.; KEDINGER, M.; GRADWOHL, G. Neurogenin3 is differentially required for endocrine cell fate specification in the intestinal and gastric epithelium. **The EMBO journal**, v. 21(23), p. 6338-47, 2002.

KAMPKOTTER, A.; VOLKMANN, T.E.; DE CASTRO, S.H.; LEIERS, B.; KLOTZ, L.O.; JOHNSON, T.E.; LINK, C.D.; HENKLE-DUHRSEN, K. Functional analysis of the glutathione S-transferase 3 from *Onchocerca volvulus* (Ov-GST-3): a parasite GST confers increased resistance to oxidative stress in *Caenorhabditis elegans*. **Journal of Molecular Biology**, v. 325, p. 25-37, 2003.

KELCE, W.R.; STONE, C.R.; LAWS, S.C.; GRAY, L.E.; KEMPPAINEN, J.A.; WILSON, E.M. Persistent DDT metabolite p,p'-DDE is a potent androgen antagonist. **Nature**, v. 375, p. 581-585, 1995.

KENNISH, M.J. **Ecology of Estuaries: Anthropogenic Effects**. London: CRC Press, p. 494, 1991.

KILEDJIAN, M.; DEMARIA, C.; BREWER, G.; NOVICK, K. Identification of AUF1 (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D) as a component of the alpha-globin mRNA stability complex. **Molecular and cellular biology**, v. 17(8), p. 4870-4876, 1997.

KOSKINEN, H.; PEHKONEN, P.; VEHNÄÄINEN, E.; KRASNOV, A.; REXROAD, C.; AFANASYEV, S.; MÖLSA, H.; OIKARI, A. Response of rainbow trout transcriptome to model chemical contaminants. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 320(3), p. 745-53, 2004.

LAM, P.K.S. e GRAY, J.S. The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. **Marine pollution bulletin**, v. 46(2), p. 182-6, 2003.

LAU, P.S. e WONG, H.L. Effect of size, tissue parts and location on six biochemical markers in the green-lipped mussel, *Perna viridis*. **Marine Pollution Bulletin**, v. 46, p. 1563-1572, 2003.

LAWSON, D.; HARRISON, M.; SHAPLAND, C. Fibroblast transgelin and smooth muscle SM22 alpha are the same protein, the expression of which is down-regulated in many cell lines. **Cell Motil Cytoskeleton**, v. 38(3), p. 250-257, 1997.

LEES-MILLER, J.P.; HEELEY, D.H.; SMILLIE, L.B. An abundant and novel protein of 22 kDa (SM22) is widely distributed in smooth muscles. Purification from bovine aorta. **The Biochemical journal**, v. 244(3), p. 705-9, 1987.

LEWIN, S.R.; VESANEN, M.; KOSTRIKIS, L.; HURLEY, A.; DURAN, M.; ZHANG, L.; HO, D.D.; MARKOWITZ, M. Use of real time PCR and molecular beacons to detect virus replication in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals on prolonged effective antiretroviral therapy. **Journal of Virology**, v. 73, p. 6099-6103, 1999.

LI, M.; LI, S.; LOU, Z.; LIAO, X.; ZHAO, X.; MENG, Z.; BARTLAM, M.; RAO, Z. Crystal structure of human transgelin. **Journal of Structural Biology**, v. 162(2), p. 229-36, 2008.

LINDEN, J. Adenosine in tissue protection and tissue regeneration. **Molecular Pharmacology**, v. 67(5), p. 1385-7, 2005.

LIVAK, K. e SCHMITTGEN, T. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. **Methods**, v. 25(4), p. 402-408, 2001.

LYE, C.M. Impact of oestrogenic substances from oil production at sea. **Toxicology letters**, v. 112, p. 265-272, 2000.

MACINTOSH, C.; ANDREWS, J.; JONES, K.; WISHART, J.; MORRIS, H.; JANSEN, J.; MORLEY, J.; HOROWITZ, M.; CHAPMAN, I. Effects of age on concentrations of plasma cholecystokinin, glucagon-like peptide 1, and peptide YY and their relation to appetite and pyloric motility. **American journal of clinical nutrition**, v. 69, p. 999-1006, 1999.

MARTINOVIC, D.; VILLENEUVE, D.L.; KAHL, M.D.; BLAKE, L.S.; BRODIN, J.D.; ANKLEY, G.T. Hypoxia alters gene expression in the gonads of zebrafish (*Danio rerio*). **Aquatic toxicology**, NO PRELO, 2008.

MATTHIESSEN, P. e LAW, R.J. Contaminants and their effects on estuarine and coastal organisms in the United Kingdom in the late twentieth century. **Environmental Pollution**, v. 120(3), p. 739-757, 2002.

MCDOWELL, D.G.; BURNS, N.A.; PARKES, H.C. Localised sequence regions possessing high melting temperatures prevent the amplification of a DNA mimic in competitive PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 26, p. 3340–3347, 1998.

MEDEIROS, I.D.; SIEBERT, M.N.; TOLEDO-SILVA, G.; MORAES, M.O.; MARQUES, M.R.; BAINY, A.C.D. Differential gene expression in oyster exposed to sewage. **Marine environmental research**, v. 66(1), p. 156-7, 2008a.

MEDEIROS, I.D.; SIEBERT, M.N.; TOLEDO-SILVA, G.; RODRIGUES, T.B.; MARQUES, M.R.F.; BAINY, A.C.D. Induced gene expression in oyster *Crassostrea gigas* exposed to sewage. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 26(3), p. 362-365, 2008b.

MEDEIROS, I.D. **Expressão gênica diferencial em ostras *Crassostrea gigas* expostas a esgoto doméstico**. 93 p. Tese de doutorado (Doutorado em Biologia Celular e Molecular). Departamento de Biologia Celular, UFPR, Curitiba, 2008c.

METCALFE, C.; METCALFE, T.; KIPARISSIS, Y.; KOENIG, B.; KHAN, C.; HUGHES, R. Estrogenic potency of chemical detected in sewage treatment plant effluents as determined by *in vivo* assays with Japanese medaka (*Oryzias latipes*). **Environmental Toxicologic Chemistry**, v. 20, p. 297– 308, 2001.

MINIER, C.; LELONG, C.; DJEMEL, N.; RODET, F.; TUTUNDJIAN, R.; FAVREL, P.; MATHIEU, M.; LÉBOULENGER, F. Expression and activity of a multixenobiotic resistance system in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. **Marine Environmental Research**, v. 54, p. 455–459, 2002.

MIZUTA, T. e KUBOKAWA, K. Presence of sex steroids and cytochrome P450 genes in amphioxus. **Endocrinology**, v. 148(8), p. 3554, 2007.

MORRISON, T.B.; WEIS, J.J.; WITTEWER, C.T. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. **Biotechniques**, v. 24, p. 954–958, 1998.

MURASHITA, K.; KUROKAWA, T.; NILSEN, T.O.; RØNNESTAD, I. Ghrelin, cholecystokinin, and peptide YY in Atlantic salmon (*Salmo salar*): molecular cloning and tissue expression. **General and Comparative Endocrinology**, v. 160(3), p. 223-35, 2009.

NAIR, R.R.; SOLWAY, J.; BOYD, D.D. Expression cloning identifies transgelin (SM22) as a novel repressor of 92-kDa type IV collagenase (MMP-9) expression. **The Journal of biological chemistry**, v. 281(36), p. 26424-36, 2006.

NEGRE, B. e SIMPSON, P. Evolution of the achaete-scute complex in insects: convergent duplication of proneural genes. **Trends in genetics**, v. 25(4), p. 147-52, 2009.

NOARA, H. e NOARA, H. Involvement of ribosomal proteins in regulating cell growth and apoptosis: translational modulation or recruitment for extraribosomal activity? **Immunol. Cell Biol.**, v. 77, p. 197–205, 1999.

NUNES, F.F. **Avaliação *in situ* da contaminação e dos efeitos de efluentes domésticos sobre biomarcadores bioquímicos em ostra do Pacífico *Crassostrea gigas* na Baía Norte da Ilha de Santa Catarina.** 73 p. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Aquicultura). Centro de Ciências Agrárias, UFSC, Florianópolis, 2008.

ORINO, K.; EGUCHI, K.; NAKAYAMA, T.; YAMAMOTO, S.; WATANABE, K. Sequencing of cDNA clones that encode bovine ferritin H and L chains. **Comp. Biochem. Physiol. B**, v. 118, p. 667–673, 1997.

OSWALD, C.; KRAUSE-BUCHHOLZ, U.; RÖDEL, G. Knockdown of human COX17 affects assembly and supramolecular organization of cytochrome c oxidase. **Journal of Molecular Biology**, v. 389(3), p. 470-9, 2009.

PAN, D.; HE, N.; YANG, Z.; LIU, H.; XU, X. Differential gene expression profile in hepatopancreas of WSSV-resistant shrimp (*Penaeus japonicus*) by suppression subtractive hybridization. **Developmental and comparative immunology**, v. 29(2), p. 103-12, 2005.

PARASHAR, U.D.; HUMMELMAN, E.G.; BRESEE, J.S.; MILLER, M.A.; GLASS, R.I. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. **Emerging infectious diseases**, v. 9(5), p. 565-72, 2003.

PARDINAS, J.R.; COMBATES, N.J.; PROUTY, S.M.; STENN, K.S.; PARIMOO, S. Differential Subtraction Display: a unified approach for isolation of cDNAs from differentially expressed genes. **Analytical Biochemistry**, v. 257, p. 161-168, 1998.

PARODI, A.M. Esgoto só chega a 5% de SC. **Jornal A Notícia**, Joinville, 01 jun. 2006. Destaque Saneamento, p. A4.

PASQUALATO, S.; RENAULT, L.; CHERFILS, J. Arf, Arl, Arp and Sar proteins: a family of GTP-binding proteins with a structural device for “front–back” communication. **EMBO Reports**, v. 3(11), p. 1035, 2002.

PEDDIBHOTLA, S.; LAM, M.H.; GONZALEZ-RIMBAU, M.; ROSEN, J.M. The DNA-damage effector checkpoint kinase 1 is essential for chromosome segregation and cytokinesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106(13), p. 5159-64, 2009.

PENG, X.; ZHANG, G.; MAI, B.; HU, J., LI, K.; WANG, Z. Tracing anthropogenic contamination in the Pearl River estuarine and marine environment of South China

Sea using sterols and other organic molecular markers. **Marine Pollution Bulletin**, v. 50, p. 856-865, 2005.

PETERSON, J.S.K. e BAIN, L.J. Differential gene expression in anthracene-exposed mummichogs (*Fundulus heteroclitus*). **Aquatic toxicology**, v. 66(4), p. 345-55, 2004.

PETROVIC, M.; GONZALEZ, S.; BARCELO, D. Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22(10), p.685-696, 2003.

PETUSHOK, N.; GABRYELAK, T.; PALECZ, D.; ZAVODNIK, L.; VARGA, I.S.; DEÉR, K.A. Comparative study of the xenobiotic metabolising system in the digestive gland of the bivalve molluscs in different aquatic ecosystems and in aquaria experiments. **Aquatic Toxicology**, v. 6, p. 65–72, 2002.

PLANT, N. Interaction networks: coordinating responses to xenobiotic exposure. **Toxicology**, v. 202(1-2), p. 21-32, 2004.

POLI, A.; LUCCHI, R.; NOTARI, S.; ZAMPACAVALLLO, G.; GANDOLFI, O.; TRAVERSA, U. Pharmacological characterization of adenosine A1 receptors and its functional role in brown trout (*Salmo trutta*) brain. **Brain research**, v. 837(1-2), p. 46-54, 1999.

QUINN, B.; GAGNÉ, F.; COSTELLO, M.; MCKENZIE, C.; WILSON, J.; MOTHERSILL, C. The endocrine disrupting effect of municipal effluent on the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). **Aquatic Toxicology**, v. 66(3), p. 279-292, 2004.

RAMKUMAR, V.; HALLAM, D.M.; NIE, Z. Adenosine, oxidative stress and cytoprotection. **Japanese journal of pharmacology**, v. 86(3), p. 265-74, 2001.

RAND, G.M. **Effects, environmental fate, and risk assessment**. Washington: Taylor & Francis, p. 1125, 1995.

RAYBOULD, H. Mechanisms of CCK signaling from gut to brain. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 7(6), p. 570-574, 2007.

REBRIKOV, D.; BRITANOVA, O.; GURSKAYA, N.; LUKYANOV, K.; TARABYKIN, V.; LUKYANOV, S. Mirror orientation selection (MOS): a method for eliminating false positive clones from libraries generated by suppression subtractive hybridization. **Nucleic Acids Research**, v. 28(20), p. 90, 2000.

REWITZ, K.; STYRISHAVE, B.; LØBNER-OLESEN, A.; ANDERSEN, O. Marine invertebrate cytochrome P450: emerging insights from vertebrate and insect analogies. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 143(4), p. 363-381, 2006.

RHEE, J.S.; LEE, Y.M.; HWANG, D.S.; LEE, K.W.; KIM, I.C.; SHIN, K.H.; RAISUDDIN, S.; LEE, J.S. Molecular cloning and characterization of omega class glutathione S-transferase (GST-O) from the polychaete *Neanthes succinea*:

biochemical comparison with theta class glutathione S-transferase (GST-T). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 146(4), p. 471-7, 2007.

RIBEIRO, L. Grande Florianópolis tem as melhores redes. **Jornal Diário Catarinense**, Florianópolis, 10 jun. 2008. Geral, p. 29.

RICCIARDI, F.; BINELLI, A.; PROVINI, A. Use of two biomarkers (CYP450 and acetylcholinesterase) in the zebra mussel for the biomonitoring of the Lake Maggiore (Northern Italy). **Ecotoxicological and Environmental Safety**, v. 63, p. 406-412, 2006.

RICHARDSON, K.L.; GOLD BOUCHOT, G.; SCHLENK, D. The characterization of cytosolic glutathione transferase from four species of sea turtles - loggerhead (*Caretta caretta*), green (*Chelonia mydas*), olive ridley (*Lepidochelys olivacea*), and hawksbill (*Eretmochelys imbricata*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, NO PRELO, 2009.

ROZEN, S. e SKALETSKY, H.J. **Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers**. In: Krawetz S, Misener S (eds) Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, NJ, p. 365-386, 2000.

RONZITTI, G.; MILANDRI, A.; SCORTICHINI, G.; POLETTI, R.; ROSSINI, G.P. Protein markers of algal toxin contamination in shellfish. **Toxicon**, v. 52(6), p. 705-13, 2008.

ROSEMBERG, D.B.; RICO, E.P.; SENGER, M.R.; DIAS, R.D.; BOGO, M.R.; BONAN, C.D.; SOUZA, D.O. Kinetic characterization of adenosine deaminase activity in zebrafish (*Danio rerio*) brain. **Comparative biochemistry and physiology Part B**, v. 151(1), p. 96-101, 2008.

SAAVEDRA, C. e BACHÈRE, E. Bivalve genomics. **Aquaculture**, v. 256, p. 1–14, 2006.

SAMPAYO-REYES, A. e ZAKHARYAN, R.A. Inhibition of human glutathione S-transferase omega by tocopherol succinate. **Biomedicine & pharmacotherapy**, v. 60(5), p. 238-44, 2006.

SCANES, P. 'Oyster watch': monitoring trace metal and organochlorine concentrations in Sydney's coastal waters. **Marine Pollution Bulletin**, v. 33(7–12), p. 226 – 238, 1996.

SCHMITTGEN, T. e LIVAK, K.. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. **Nature Protocols**, v. 3(6), p. 1101-1108, 2008.

SCHMITTGEN, T. e ZAKRAJSEK, B. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. **Journal of biochemical and biophysical methods**, v. 46(1-2), p. 69-81, 2000.

SCHMUCK, E.M.; BOARD, P.G.; WHITBREAD, A.K.; TETLOW, N.; CAVANAUGH, J.A.; BLACKBURN, A.C.; MASOUMI, A. Characterization of the monomethylarsonate reductase and dehydroascorbate reductase activities of Omega class glutathione transferase variants: implications for arsenic metabolism and the age-at-onset of Alzheimer's and Parkinson's diseases. **Pharmacogenet Genomics**, v. 15, p. 493–501, 2005.

SCHNURSTEIN, A. e BRAUNBECK, T. Tail moment versus tail length. Application of an *in vitro* version of the comet assay in biomonitoring for genotoxicity in native surface waters using primary hepatocytes and gill cells from zebrafish (*Danio rerio*). **Ecotoxicological and Environmental Safety**, v. 49, p. 187–196, 2001.

SCHULZE, J.O.; SCHUBERT, W.D.; MOSER, J.; JAHN, D.; HEINZ, D.W. Evolutionary relationship between initial enzymes of tetrapyrrole biosynthesis. **Journal of Molecular Biology**, v. 358(5), p. 1212-20, 2006.

SCHWITZGEBEL, V.M.; SCHEEL, D.W.; CONNERS, J.R.; KALAMARAS, J.; LEE, J.E.; ANDERSON, D.J.; SUSSEL, L.; JOHNSON, J.D.; GERMAN, M.S. Expression of neurogenin3 reveals an islet cell precursor population in the pancreas. **Development**, v. 127(16), p. 3533-42, 2000.

SCOTTI, P.D.; DEARING, S.C.; GREENWOOD, D.R.; NEWCOMB, R.D. Pernin: a novel, self-aggregating haemolymph protein from the New Zealand green-lipped mussel, *Perna canaliculus* (Bivalvia: Mytilidae). **Comparative biochemistry and physiology Part B**, v. 128(4), p. 767-79, 2001.

SEBALD, E.; KRUEGER, R.; KING, L.; COHN, D.; KRAKOW, D. Isolation of a new member of the ADP-ribosylation like factor gene family, ARL8, from a cartilage cDNA library. **Gene**, v. 311, p. 147-151, 2003.

SEO, J.; LEE, Y.; PARK, H.; LEE, J. The intertidal copepod *Tigriopus japonicus* small heat shock protein 20 gene (Hsp20) enhances thermotolerance of transformed *Escherichia coli*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 340(3), p. 901-908, 2006a.

SEO, J.; PARK, T.J.; LEE, Y.M.; PARK, H.G.; YOON, Y.D.; LEE, J.S. Small heat shock protein 20 gene (Hsp20) of the intertidal copepod *Tigriopus japonicus* as a possible biomarker for exposure to endocrine disruptors. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 76(4), p. 566-72, 2006b.

SERICANO, J.L.; WADE, T.L.; JACKSON, T.J.; BROOKS, J.M.; TRIPP, B.W.; FARRINGTON, J.W.; MEE, L.D.; READMANN, J.W.; VILLENEUVE, J.P.; GOLDBERG, E.D. Trace organic contamination in the Americas: An overview of the US National Status & Trends and the International 'Mussel Watch' programmes. **Marine Pollution Bulletin**, v. 31(4-12), p. 214-225, 1995.

SHIELDS, J.M.; ROGERS-GRAHAM, K.; DER, C.J. Loss of transgelin in breast and colon tumors and in RIE-1 cells by Ras deregulation of gene expression through Raf-

independent pathways. **The Journal of biological chemistry**, v. 277(12), p. 9790-9, 2002.

SNYDER, M. Cytochrome P450 enzymes belonging to the CYP4 family from marine invertebrates. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 249(1), p. 187-190, 1998.

STEGEMAN, J.J.; BROUWER, M.; DIGIULIO, R.T.; FORLIN, L.; FOWLER, B.M.; SANDERS BM, VAN VELD, P. **Molecular responses to Environmental Contamination: Enzyme and Protein Systems as Indicators of Chemical Exposure and Effect**. In: Biom., Bioch., Physiol., and Histol., Mark. of Anthrop. Stress, Eds. Huggett, R.J., Kimerle, R.A., Mehrle Jr., P.P. & Bergman, H.L. Lewis Publishers. p. 235-335, 1992.

STORCH, J. e THUMSER, A.E. The fatty acid transport function of fatty acid-binding proteins. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1486(1) p. 28-44, 2000.

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

TALAPATRA, S.; WAGNER, J.; THOMPSON, C. Elongation factor-1 alpha is a selective regulator of growth factor withdrawal and ER stress-induced apoptosis. **Cell Death and Differentiation**, v. 9(8), p. 856, 2002.

TANGUY, A.; BIERNE, N.; SAAVEDRA, C.; PINA, B.; BACHÈRE, E.; KUBE, M.; BAZIN, E.; BONHOMME, F.; BOUDRY, P.; BOULO, V. Increasing genomic information in bivalves through new EST collections in four species: development of new genetic markers for environmental studies and genome evolution. **Gene**, v. 408(1-2), p. 27-36, 2008.

TANGUY, A.; BOUTET, I.; MORAGA, D. Molecular characterization of the glutamine synthetase gene in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: expression study in response to xenobiotic exposure and developmental stage. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1681(2-3), p. 116-25, 2005.

TANGUY, A.; GUO, X.; FORD, S. Discovery of genes expressed in response to *Perkinsus marinus* challenge in Eastern (*Crassostrea virginica*) and Pacific (*C. gigas*) oysters. **Gene**, v. 338(1), p. 121-131, 2004.

TOLEDO-SILVA, G.; SIEBERT, M.N.; MEDEIROS, I.D.; SINCERO, T.C.; MORAES, M.O.; GOLDSTONE, J.V.; BAINY, A.C.D. Cloning a new cytochrome P450 isoform (CYP356A1) from oyster *Crassostrea gigas*. **Marine environmental research**, v. 66(1), p. 15-8, 2008.

TORTI, F.M. e TORTI, S.V. Regulation of ferritin genes and protein. **Blood**, v. 99(10), p. 3505-16, 2002.

TSIFTSOGLU, A.S.; TSAMADOU, A.I.; PAPADOPOULOU, L.C. Heme as key regulator of major mammalian cellular functions: molecular, cellular, and

pharmacological aspects. **Pharmacology & therapeutics**, v. 111(2), p. 327-45, 2006.

VAALBURG, W.; HENDRIKSE, N.; ELSINGA, P.; BART, J.; VAN WAARDE, A. P-glycoprotein activity and biological response. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 207(2S), p. 257-260, 2005.

VELKOV, T.; CHUANG, S.; PRANKERD, R.; SAKELLARIS, H.; PORTER, C.J.; SCANLON, M.J. An improved method for the purification of rat liver-type fatty acid binding protein from *Escherichia coli*. **Protein expression and purification**, v. 44(1), p. 23-31, 2005.

VOET, D. e VOET, J.G. **Biochemistry**, 3rd Edition, John Wiley and Sons, 2004.

VOYNOVA, N.; RIOS, S.; MIZIORKO, H. *Staphylococcus aureus* mevalonate kinase: isolation and characterization of an enzyme of the isoprenoid biosynthetic pathway. **Journal of bacteriology**, v. 186(1), p. 61-67, 2004.

WAGNER, B.; DEMARIA, C.; SUN, Y.; WILSON, G.; BREWER, G. Structure and genomic organization of the human AUF1 gene: alternative pre-mRNA splicing generates four protein isoforms. **Genomics**, v. 48(2), p. 195-202, 1998.

WALKER, C.H.; HOPKIN, S.P.; SIBLY, R.M.; PEAKALL, D.B. **Principles of Ecotoxicology**. Taylor & Francis, 2a ed, Londres, p.309, 2001.

WATRIN, E. e PETERS, J.M. Cohesin and DNA damage repair. **Experimental cell research**, v. 312(14), p. 2687-93, 2006.

WELSH, M.J. e GAESTEL, M. Small heat-shock protein family: function in health and disease. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 851, p. 28-35, 1998.

WEN, Y.; SHAO, J.Z.; PAN, X.X.; XIANG, L.X. Molecular cloning, characterization and expression analysis of QM gene from grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) homologous to Wilms' tumor suppressor. **Comparative biochemistry and physiology Part B**, v. 141(3), p. 356-65, 2005.

WINSTANLEY, C. **Molecular Biomethods Handbook**. Humana Press: Springer, 2008.

WONG, T.; YU, H.; KONG, S.; FUNG, K.; KWOK, T. The decrease of mitochondrial NADH dehydrogenase and drug induced apoptosis in doxorubicin resistant A431 cells. **Life Sciences**, v. 67(9), p. 1111-1118, 2000.

XU, J.; WU, S.; ZHANG, X. Novel function of QM protein of shrimp (*Penaeus japonicus*) in regulation of phenol oxidase activity by interaction with hemocyanin. **Cell Physiol Biochem**, v. 21(5-6), p. 473-480, 2008.

ZAPATA, M.; TANGUY, A.; DAVID, E.; MORAGA, D.; RIQUELME, C. Transcriptomic response of *Argopecten purpuratus* post-larvae to copper exposure under experimental conditions. **Gene**, v. 442(1-2), p. 37-46, 2009.

ZENG, Y. e LU, C.P. Identification of differentially expressed genes in haemocytes of the crayfish (*Procambarus clarkii*) infected with white spot syndrome virus by suppression subtractive hybridization and cDNA microarrays. **Fish & shellfish immunology**, v. 26(4), p. 646-50, 2009.

ZHANG, W.; WAGNER, B.J.; EHRENMAN, K.; SCHAEFER, A.W.; DEMARIA, C.T.; CRATER, D.; DEHAVEN, K.; LONG, L.; BREWER, G. Purification, characterization, and cDNA cloning of an AU-rich element RNA-binding protein, AUF1. **Molecular and cellular biology**, v. 13(12), p. 7652-65, 1993.

ZHANG, Y.; MENG, Q.; JIANG, T.; WANG, H.; XIE, L.; ZHANG, R. A novel ferritin subunit involved in shell formation from the pearl oyster (*Pinctada fucata*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v. 135(1), p. 43-54, 2003.

ZHAOBIN, Z. e JIANYING, H. Effects of p,p'-DDE exposure on gonadal development and gene expression in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). **Journal of Environmental Sciences**, v. 20, p. 347–352, 2008.

ZHOU, J.; WANG, W.; MA, G.; WANG, A.; HE, W.; WANG, P.; LIU, Y.; LIU, J.; SUN, R. Gene expression of ferritin in tissue of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* after exposure to pH stress. **Aquaculture**, v. 275(1-4), p. 356-360, 2008.

ZHOU, Q.; ZHANG, T.; XU, W.; YU, L.; YI, Y.; ZHANG, Z. Analysis of four achaete-scute homologs in *Bombyx mori* reveals new viewpoints of the evolution and functions of this gene family. **BMC Genetics**, v. 9, p. 24, 2008.