

**IDENTIFICAÇÃO DE GENES ENVOLVIDOS NA
RESPOSTA AO ESTRESSE AMBIENTAL NO
MEXILHÃO *PERNA PERNA***

Dissertação apresentada ao Curso de
Pós-Graduação em Biotecnologia da
Universidade Federal de Santa Catarina
Como requisito parcial para a obtenção
do Grau de Mestre em Biotecnologia

Orientador: Dr. Hernán Terenzi.

Departamento de Bioquímica

PATRICIA CARDOSO SEVERINO

MARÇO/2002

SEVERINO, Patrícia Cardoso.

Identificação de genes envolvidos na resposta ao estresse ambiental no mexilhão *Perna perna* / Patrícia Cardoso Severino

Dissertação de Mestrado em Biotecnologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis –SC, 2002.

Palavras chaves: receptor nuclear, proteína G, metalotioneína, estresse ambiental, mexilhão, *Perna perna*, biologia molecular.

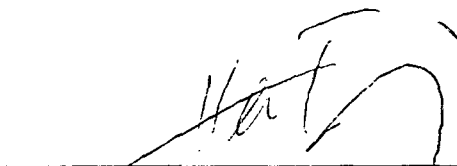
“Identificação de genes envolvidos na resposta ao estresse ambiental no mexilhão *Perna perna*”

POR

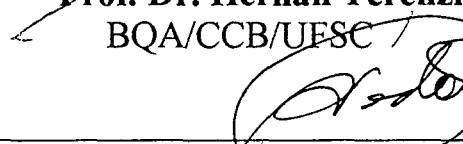
PATRÍCIA CARDOSO SEVERINO

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

Comissão Examinadora:



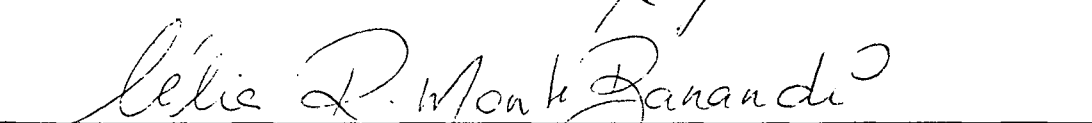
Prof. Dr. Hernán Terenzi
BQA/CCB/UFSC



Prof. Dr. Rubens O. Nodari
FIT/CCA/UFSC



Prof. Dr. Maria Risoleta Freire Marques
BQA/CCB/UFSC



Prof. Dr. Célia Regina Monte Barardi – MIP/CCB/UFSC
Coordenadora do Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia da UFSC

Florianópolis, Março de 2002.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Hernán Terenzi;

Aos professores Dr. Boris Stambuk, Dra. Maria Risoleta Marques, Dr. Afonso C. D. Bairy;

Aos colegas de laboratório Guilherme Razzera Maciel, Joseane Ganske, Deise Mazzera, Rosemary Horner;

Aos meus pais Sonia Cardoso e João Laus Severino;

Ao meu irmão e “meu anjo de luz”, Sérgio Rodrigo Severino;

Obrigada a todos por terem contribuído de alguma forma na realização deste trabalho.

A Deus, pela oportunidade maravilhosa de poder conviver e aprender com todas estas pessoas.

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	V
RESUMO.....	VII
ABSTRACT.....	VIII
1. INTRODUÇÃO.....	9
1.1. Alteração na expressão gênica causada por estresse.....	11
1.2. Receptores Nucleares.....	15
1.3. Proteína G.....	19
1.4. Metalotioneína.....	23
1.5. Modelo de estudo: o mexilhão <i>Perna perna</i>	26
2. OBJETIVOS.....	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
3.1. Preparação do material biológico.....	32
3.2. Extração de ácidos nucleicos do mexilhão <i>Perna perna</i>	34
3.3. Eletroforese para análise de ácidos nucleicos.....	35
3.4. Amplificação de genes envolvidos na resposta ao estresse ambiental.....	37
3.4.1. Amplificação de genes de receptores nucleares a partir de DNA genômico.....	37
3.4.2. Amplificação de genes de receptores nucleares a partir de RNA.....	42
3.4.3. Amplificação das extremidades 5' e 3' do cDNA (RACE) do gene do receptor nuclear.....	43
3.4.4. Amplificação de genes de proteína G.....	46
3.4.5. Amplificação de genes de Metalotioneína.....	50
3.5. Purificação de fragmentos obtidos por PCR.....	53
3.6. Clonagem.....	55
3.7. Transformação.....	57

3.8. Extração de DNA plasmidial.....	58
3.9. Confirmação dos fragmentos clonados.....	59
3.10. Sequenciamento.....	60
3.11. Análise das seqüências	63
3.12. Análise do fragmento de 1 Kb (NR1PP) do gene de receptor nuclear	65
3.13. Análise do fragmento de 120 pb (NR26PP) do gene de receptor nuclear.....	68
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	70
4.1. EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS.....	70
4.2. RECEPTOR NUCLEAR.....	75
4.2.1 Amplificação e clonagem de genes de receptores nucleares a partir do DNA genômico.....	75
4.2.1.1. Sequenciamento.....	85
4.2.1.2. Análise da seqüência do fragmento de 1 Kb (NR1PP) de receptor nuclear.....	85
4.2.2 Amplificação e clonagem de genes de receptor nuclear a partir do RNA.....	98
4.2.2.1. Sequenciamento.....	103
4.2.2.2. Análise da seqüência do fragmento de 120 pb (NR26PP) de receptor nuclear.....	105
4.2.3. RACE – Amplificação Rápida das extremidades 5’ e 3’	108
4.2.3.1. Clonagem.....	110
4.2.3.2. Sequenciamento.....	115
4.3. METALOTIONEÍNA.....	116
4.4. PROTEÍNA G.....	120
5. CONCLUSÕES.....	125
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	128

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AhR	Receptor de hidrocarbonetos aromáticos
AR	Receptor de androgênio
dATP	Deoxi adenosina nucleotídeo trifosfato
DBD	“DNA Binding Domain ” (Domínio de Ligação ao DNA)
DDT	Bis- clorofenil-tricloroetano
dNTPs	Deoxinucleotídeos trifosfato
ECR	Receptor de ecdisona
ER	Receptor de esteróide
GR	Receptor de glicocorticóide
IPTG	isopropil- β -D tiogalactosídeo
Kb	Kilo base; 1 Kb = 1000 pb
LB	Meio de crescimento para bactérias Luria-Bertani
LBD	“Ligand Binding Domain” (Domínio de Ligação ao Ligante)
MDR	“MultiDrug Resistance” (Resistência a Múltiplas Drogas)
MR	Receptor de mineralocorticóide
MRE	“Metal responsive element” (Elemento de resposta à metal)

MT	Metalotioneína
MXR	“Multixenobiotic Resistance” (Resistência a Múltiplos Xenobióticos)
PAHs	Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos
pb	Pares de base de DNA
PCR	“Polymerase Chain Reaction” (Reação em Cadeia da Polimerase)
PPAR	Receptor de ativação da proliferação do peroxissoma
RACE	“Rapid amplification of cDNA ends” (Amplificação rápida das extremidades do cDNA)
RAR	Receptor de ácido retinóico
RT	“Reverse transcription” (Transcrição reversa)
TR	Receptor de hormônio tireoideano
VDR	Receptor de vitamina D
X-Gal	5-bromo,4-cloro,3-indolil- β -D-galactosideo

RESUMO

IDENTIFICAÇÃO DE GENES ENVOLVIDOS NA RESPOSTA AO ESTRESSE AMBIENTAL NO MEXILHÃO *PERNA PERNA*

Muitos genes têm sido descritos por modificarem sua taxa de expressão em condições de estresse ambiental. Os receptores nucleares participam no controle da expressão de vários genes na resposta ao estresse. Eles atuam como fatores de transcrição, interagem com drogas hidrofóbicas ou xenobióticos e ativam a transcrição de genes que codificam transportadores ABC ou metalotioneína. A transcrição da metalotioneína por sua vez pode ser induzida por metais e vários poluentes ambientais presentes no ambiente. Outros genes que parecem responder à xenobióticos e drogas são aqueles que codificam proteínas G, que estão envolvidas nas vias de sinalização celular.

Para compreendermos o mecanismo envolvido na regulação destes genes, decidimos identificar seqüências de genes de receptores nucleares, metalotioneína e proteína G no genoma do *Perna perna* através do uso de PCR contra domínios evolutivamente conservados destas proteínas. O mexilhão *Perna perna* foi escolhido por sua capacidade de acumular grandes quantidades de compostos tóxicos presentes na água e sobreviver em ambientes poluídos.

O DNA genômico e o RNA total foram extraídos de diferentes tecidos do mexilhão e a seqüência correspondente ao domínio “zinc-finger” do receptor nuclear; o domínio de ligação ao GTP da subunidade α das proteínas G e a metalotioneína foram amplificados por PCR utilizando iniciadores degenerados. Os produtos de amplificação foram clonados. Os clones de receptor nuclear foram sequenciados e comparados com seqüências disponíveis em bancos de dados de DNA. Os resultados demonstraram que a seqüência tem grande homologia com o “zinc-finger” de receptores nucleares órfãos. Identificamos um íntron na seqüência clonada no vetor, que é a primeira seqüência intrônica descrita para o mexilhão *Perna perna*. A seqüência consenso está depositada no GenBank sob o número de acesso AF312271. Duas outras seqüências obtidas a partir do cDNA também foram identificadas como membros da superfamília de receptores nucleares.

Fragmentsos do tamanho esperado correspondendo a genes de proteínas G e da metalotioneína foram clonados, e aguardam sequenciamento.

A identificação destes genes no mexilhão *Perna perna* pode fornecer informações úteis para subseqüentes avaliação e utilização como novas ferramentas moleculares para entender os mecanismos de resposta desencadeados pelo estresse ambiental.

ABSTRACT

IDENTIFICATION OF GENES INVOLVED IN ENVIRONMENTAL STRESS RESPONSE IN THE MUSSEL *PERNA PERNA*

Environmental stress promotes differential gene expression in many tissues, cells and organisms. Nuclear receptors (NR) participate in the gene expression control of several genes involved in the stress response. They act as transcription factors by interacting with hydrophobic drugs or xenobiotics and activating the transcription of genes, i.e., coding for ABC transporters or metallothionein. Metals and many different environmental pollutants present in the environment can induce the metallothionein transcription. G protein genes are responsive to xenobiotics and drugs, thus influencing the major signaling pathways.

To understand the mechanism involved in the regulation of these genes we decided to identify gene sequences of nuclear receptors, metallothionein and G protein genes in the genome of *Perna perna* by means of PCR directed towards evolutionary conserved domains of these proteins. The mussel *Perna perna* was chosen for its ability to accumulate toxic compounds present in water and to survive in polluted environments.

Genomic DNA and total RNA were extracted from different tissues of mussel and sequences corresponding to zinc-finger domain of nuclear receptors, GTP-binding domain of the G protein α subunit and metallothionein were amplified by PCR using degenerated primers. The amplified products were cloned. The clones from putative nuclear receptors were sequenced and were compared to sequences in DNA databases. The results demonstrated that the sequence is homologue to a zinc-finger of orphan nuclear receptors. We identified an intron in this sequence, which is the first intron sequence described for the mussel *Perna perna*. The consensus sequence is deposited at GenBank accession number AF312271. Two others sequences obtained from cDNA were also identified as members of nuclear receptor superfamily.

Fragments of the expected size corresponding to the G protein and metallothionein genes were also cloned.

The identification of these genes in the mussel *P. perna* can provide useful information for subsequent evaluation and utilization as new molecular tools to understand the response mechanisms induced by environmental stress.

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas tem havido um crescente interesse no estudo do estresse causado por fatores ambientais. O estresse nos organismos pode ser causado por anoxia, hipoxia, alteração de temperatura, exposição a metais pesados e uma série de contaminantes ambientais ou xenobióticos. No entanto, muitas espécies aquáticas são capazes de sobreviver em ambientes que contém níveis elevados de poluentes ambientais, antropogênicos ou toxinas naturais (BARD, 2000). Estes poluentes ambientais, ou xenobióticos, que atingem um determinado ecossistema podem provocar uma série de distúrbios metabólicos nos organismos, como por exemplo, infertilidade, diminuição das defesas imunológicas, alterações no crescimento e finalmente a morte (STEGEMAN, 1992).

O fato de alguns organismos conseguirem viver e se reproduzir em águas contaminadas sugere que devam possuir mecanismos para resistir à presença de poluentes, ou xenobióticos, no ambiente (CORNWALL *et al.*, 1995).

Os organismos aquáticos, por exemplo, eliminam xenobióticos através de mecanismos de detoxificação envolvendo a transformação ou a conjugação de compostos. Estes mecanismos podem ser considerados como uma linha de defesa secundária, uma vez que desde que o xenobiótico entra na célula, o dano pode ocorrer antes que o mesmo seja removido.

Um mecanismo que atua como primeira linha de defesa usa uma proteína transportadora de xenobióticos relacionada ao transporte de múltiplas drogas

(MXR – “MultiXenobiotic Resistance” ou Resistência a Múltiplos Xenobióticos), que já foi bem caracterizado em células tumorais de mamíferos (MDR “MultiDrug Resistance” ou Resistência a Múltiplas Drogas). Este transporte tem pouca especificidade pelo substrato e atua contra uma variedade de produtos naturais, drogas e xenobióticos (CORNWALL *et al.*, 1995; GALGANI *et al.*, 1996; BOLHUIS *et al.*, 1997; KOLACZKOWSKI *et al.* 1998; SMITAL e KURELEC, 1998; HAHN, 1999; BARD, 2000). Recentemente, em trabalho desenvolvido em nosso laboratório, foi identificado no mexilhão *Perna perna* um fragmento de gene homólogo ao Transportador ABC, responsável pela função de MDR (GRIMM *et al.*, 2000).

Alguns pesquisadores sugerem que o custo energético para manter um contínuo estado de resistência pode reduzir a viabilidade do organismo, em um ambiente quimicamente estressante (WALKER *et al.*, 1996; BARD, 2000). O custo previsto da síntese de proteínas e a manutenção da proteção em mexilhões e peixes submetidos a condições de estresse, atinge uma faixa de 18 a 26% de perda da energia metabólica (HOFMANN e SOMERO, 1995).

Além disso, o desenvolvimento de resistência química, devido a exposição contínua a xenobióticos, às vezes, permite ao organismo acumular altas concentrações de contaminantes, os quais podem ser passados aos consumidores (Bioacumulação) que, por sua vez, podem não possuir a mesma resistência (HAHN, 1999). Testes com o molusco bivalve *Corbila fluminea*, confirmaram a capacidade de bioacumulação de metais pesados neste tipo de organismo

(BAUDRIMONT *et al.*, 1999). Além disso, em belugas e trutas, foi demonstrada a bioacumulação de organofosforados de alto peso molecular (FISK *et al.*, 2000).

A relação entre a exposição de uma população a um poluente e os subsequentes efeitos biológicos é um importante aspecto da ecotoxicologia e epidemiologia ambiental. Muitos estudos para verificar o risco de exposição a xenobióticos envolvem a detecção de resíduos químicos presentes na água, solo ou acumulados nos tecidos dos organismos. Estes métodos, no entanto, não fornecem informações sobre os efeitos físicos e moleculares da ação dos xenobióticos sobre o organismo (VANDEN HEUVEL e DAVIS, 1999).

É de crucial importância que os mecanismos celulares e moleculares pelos quais os xenobióticos atuam, sejam desvendados. Isto porque, inúmeros trabalhos demonstram que as células sofrem alterações na expressão gênica em resposta ao estresse ambiental (SHAW *et al.*, 2000; URNOV e WOLFFE, 2001). Essa resposta pode ser elicitada por uma variedade de estressores fisiológicos e químicos (VANDEN HEUVEL e DAVIS, 1999; BARD, 2000).

1.1. Alterações na expressão gênica causadas por estresse

As mudanças na expressão gênica associadas à resposta ao estresse são extremamente rápidas e resultam na síntese induzida e acumulação de proteínas de estresse que possuem função de proteção (WALKER *et al.*, 1996). Estas mudanças incluem alterações no nível ou função de enzimas, receptores e intermediários e modificações no DNA (WALKER *et al.*, 1996).

O mesmo xenobiótico pode induzir simultaneamente a expressão de genes de resistência a drogas (MXR), de metabolização de drogas, da enzima glutathione S-transferase, de proteínas de choque térmico, de metalotioneína, catalase, e de Benzo(a) pireno hidroxilase, dentre outras, que pertencem ao sistema geral de defesa, funcionando na proteção das células em ambientes adversos (GALGANI *et al.*, 1996; SMITAL e KURELEC, 1998; BAUDRIMONT *et al.*, 1999).

Em *Neurospora crassa*, por exemplo, as proteínas G estão envolvidas na regulação de várias respostas ambientais e também são essenciais para muitas respostas de células eucarióticas a estímulos ambientais (TURNER e BORKOVICH, 1993).

Os próprios xenobióticos induzem os mecanismos de defesa, servindo como ligantes, ou moléculas efetoras, que se ligam a proteínas reguladoras. Estas proteínas reguladoras englobam proteínas ativadoras que induzem a transcrição ao se ligarem em seqüências específicas do DNA na região regulatória do gene alvo (BOLHUIS *et al.*, 1997). A região regulatória contém: a seqüência promotora que é o local onde os fatores gerais de transcrição e a RNA polimerase se associam e as seqüências onde as proteínas reguladoras se ligam para controlar a taxa dos processos de associação na região do promotor (ALBERTS *et al.*, 1997; LEMON e TJIAN, 2000). Este processo também pode ter efeito repressor quando proteínas repressoras que previnem a transcrição ligam-se ao sítio consenso nos genes alvo (BOLHUIS *et al.*, 1997).

Alguns xenobióticos já são conhecidos por afetar a transcrição dos genes através da interação com proteínas intracelulares específicas ou receptores (VANDEN HEUVEL e DAVIS, 1998).

O DDT (Bis- clorofenil-tricloroetano) pode induzir uma resposta ligando-se ao receptor de proliferação do peroxissoma (PPAR), um tipo de receptor nuclear, ativando as peroxidases (HSU *et al.*, 1991).

Os metais pesados podem induzir a síntese de metalotioneína ao se ligarem em receptores nucleares que ativam a transcrição (VANDEN HEUVE E DAVIS, 1998; BAUDRIMONT *et al.*, 1999), sendo que ainda estímulos não metálicos também parecem estimular a transcrição deste gene (REMONDELLI *et al.*, 1999). Em mamíferos, por exemplo, agentes oxidantes e hormônio glucocorticoide podem estimular a expressão da metalotioneína, uma vez que já foram descritos elementos de resposta à estas substâncias na região promotora do gene (VIARENGO *et al.*, 1999).

Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) são conhecidos por serem capazes de se ligar a receptores de hidrocarbonetos aromáticos (AhR) e induzir a expressão do citocromo P450 (MEEK e FINCH, 1999; TANGUAY *et al.*, 1999). Outros hidrocarbonetos cíclicos têm demonstrado capacidade de interagir com receptores nucleares. Os PAHs genotóxicos, como benzo(a) pireno e benzo(a) antraceno, possuem habilidade de induzir a expressão gênica mediada por ER em ratos (HAHN, 1999; FIELDEN *et al.*, 2000). Além disso, os metabólitos derivados do metabolismo dos PAHs são altamente reativos e ligam-se a moléculas como proteínas e ácidos nucleicos formando adutos de DNA e

resultando em danos celulares (SANDVIK *et al.*, 1998; PADRÓS *et al.*; 2000; CORMIER *et al.*, 2000; ROTCHELL *et al.*, 2001).

Os hidrocarbonetos aromáticos também são considerados possíveis interferentes endócrinos. São agentes que causam efeitos adversos à saúde de um organismo e sua progênie em consequência das mudanças na função endócrina. Os interferentes endócrinos englobam um grupo diverso de compostos de ocorrência natural, xenobióticos, pesticidas, herbicidas e substâncias químicas industriais. Estes compostos naturais e sintéticos parecem mimetizar a atividade de esteróides sexuais endógenos e afetar o desenvolvimento e a saúde de humanos e da vida selvagem (FIELDEN *et al.*, 2000; BJARNASON *et al.*, 2001). Estudos demonstram que muitos dos efeitos dos interferentes endócrinos são mediados por receptores nucleares, mais precisamente os receptores de esteróides (ER). Outros contaminantes como dioxinas, dibenzofuranos e bifenilas coplanares, são considerados como interferentes, mas estes agiriam através do AhR para elicitar a interferência endócrina através da modulação da expressão gênica e dos mecanismos de sinalização endócrina (MEEK, 1998; MEEK e FINCH, 1999; FIELDEN *et al.*, 2000). Vários trabalhos, no entanto, demonstraram haver uma relação entre as respostas mediadas por AhR e ER (NGUYEN *et al.*, 1999; KUMAR *et al.*, 1999; LINDER *et al.*, 1999; FIELDEN *et al.*, 2000).

Para entendermos do ponto de vista molecular os mecanismos de resposta ao estresse, neste trabalho nos propusemos a identificar alguns dos genes que parecem estar envolvidos neste mecanismo. Entre estes genes estão aqueles dos:

receptores nucleares, e das metalotioneínas e proteínas G. O modelo biológico escolhido para este estudo foi o mexilhão *Perna perna*.

1.2. Receptores Nucleares

Os receptores nucleares são fatores de transcrição que existem na forma de uma apoproteína inativa tanto no citoplasma como no núcleo. Respondem a uma variedade de sinais hormonais e metabólicos que regulam a atividade das mais importantes cascatas de sinalização (ALTUCCI e GRONEMEYER, 2001)

Ao ligarem-se ao seu respectivo ligante hormonal, os receptores são ativados. A ligação de um hormônio ao seu receptor induz uma mudança alostérica que permite o complexo hormônio-receptor se ligar a sítios de alta afinidade no DNA (STUNNENBERG, 1993; TSAI e O'MALLEY, 1994; MANGELSDORF *et al.*, 1995; MANGELSDORF e EVANS, 1995; MIYAMOTO *et al.*, 2001). O complexo, pode se ligar efetivamente a um elemento de resposta a hormônio (HRE) do DNA e ativar ou inibir a transcrição de um gene (Figura 1). Além de regular a transcrição, os hormônios esteróides por exemplo, ocasionalmente, regulam a expressão gênica afetando a estabilidade do mRNA e a eficiência traducional (ZILLIACUS *et al.*, 1991; TSAI e O'MALLEY, 1994).

Além do hormônio específico, um outro agonista pode se ligar ao receptor, mimetizando a função do hormônio (TSAI e O'MALLEY, 1994; ANOLIK *et al.*, 1995). Os PAHs, como mencionado anteriormente, podem elicitar uma resposta através da indução da transcrição de genes mediados por ER. Assim como

partículas da exaustão de diesel podem se ligar a receptores de estrogênio, mimetizando a atividade do estradiol (MEEK, 1998).

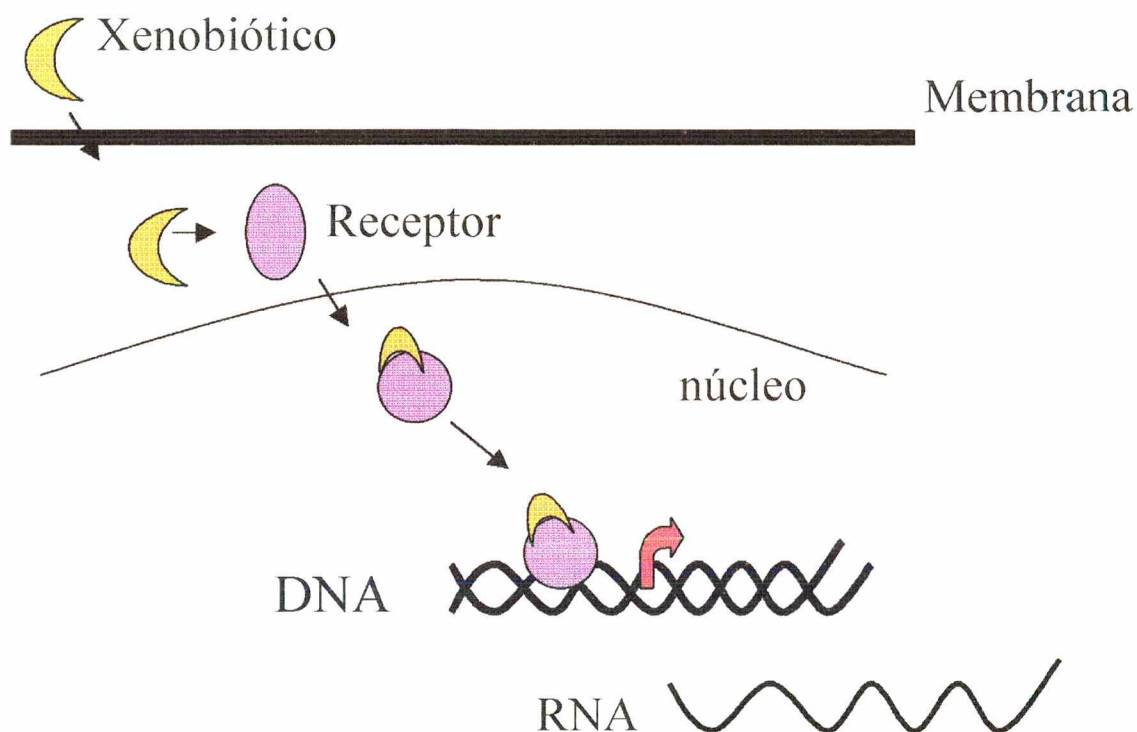


Figura 1. Esquema da atuação do xenobiótico na indução ou repressão da síntese de RNA. O xenobiótico (em laranja) ao entrar na célula, liga-se ao receptor nuclear (em lilás). O receptor sofre uma mudança conformacional, e isto permite que o complexo receptor-xenobiótico entre no núcleo e ligue-se ao DNA ativando (ou inibindo) a transcrição e consequentemente a síntese de RNA.

Os receptores esteróides pertencem à superfamília dos receptores hormonais nucleares. Esta superfamília inclui receptores de glucocorticóide (GR), mineralocorticóide (MR), androgênio (AR), hormônio tireoideano (TR), vitamina D (VDR), ácido retinóico (RAR), ecdisona (EcR) e ainda existem receptores que não possuem ligantes conhecidos e são denominados receptores órfãos (TSAI e O'MALLEY, 1994; KOSTROUCH *et al.*, 1995; KOSTROUCH *et al.*, 1998, KHORASANIZADEH e RASTINEJAD, 2001).

Os receptores hormonais nucleares são caracterizados por um domínio de ligação ao DNA (DBD-“DNA Binding Domain” ou Domínio de Ligação ao DNA). O DBD é composto por dois dedos de zinco ou "zinc finger" e cada um deles consiste de uma seqüência de cerca 30 resíduos de aminoácidos altamente conservados; destes, quatro sendo Cisteína e coordenando um único átomo de zinco (MANGELSDORF *et al.*, 1995; IKEDA *et al.*, 2001; MIYAMOTO *et al.*, 2001). O DBD é uma estrutura globular que pode ser dividida em dois módulos. O primeiro módulo contém o primeiro dedo de zinco, e começa com uma folha β antiparalela e termina no segundo par de Cisteínas que coordenam o zinco. A folha β ajuda na orientação dos resíduos que contatam o esqueleto fosfato do DNA e a hélice faz contato com os nucleotídeos no sulco maior da hélice de DNA. O segundo módulo é importante para o contato com o esqueleto de fosfato e na dimerização (STUNNENBERG, 1993; TSAI e O'MALLEY, 1994; KOSTROUCH *et al.*, 1995; TERENCEZI *et al.*, 1998; KHORASANIZADEH e RASTINEJAD, 2001). A superfície do DBD encerrada ao longo do DNA,

mantém um potencial eletrostático positivo que estabiliza sua associação com o esqueleto fosfodiéster negativamente carregado do DNA (KHORASANIZADEH e RASTINEJAD, 2001) e a dimerização influencia o reconhecimento de seqüências de DNA alvo (MIYAMOTO *et al.*, 2001)

Muitos dos genes de receptores nucleares são homólogos em rato, galinha, camundongos, humanos, invertebrados de modo geral e outros organismos com grande conservação de seqüência de aminoácidos, principalmente nos domínios de ligação ao DNA (DBD) e domínio de ligação ao ligante (LBD) . Mais de 300 seqüências diferentes já foram obtidas da família de genes dos receptores nucleares em uma variedade de organismos (KOSTROUCH *et al.*, 1995; KOSTROUCH *et al.*, 1998)

Em virtude da conservação evolutiva dos genes dos receptores nucleares, a utilização de iniciadores degenerados para Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), complementares às seqüências de DNA que codificam seqüências de aminoácidos altamente conservadas, são capazes de amplificar seletivamente membros dentro de uma família multigênica.

A utilização de iniciadores degenerados foi demonstrada em diversos trabalhos, como por exemplo de Kostrouch e colaboradores, com o verme *Caenorhabditis elegans* , em 1995 e com a água-viva *Tripedalia cystophora*, em 1998, ao identificarem receptores nucleares. Para isto utilizaram iniciadores que hibridizam na porção distal do domínio de ligação com o DNA (DBD), o qual é a região mais conservada da família de receptores nucleares (KOSTROUCH *et al.*, 1995; KOSTROUCH *et al.*, 1998).

1.3. Proteína G

As proteínas G são componentes dos sistemas de transdução de sinal dos eucariotos e estão envolvidas em processos celulares críticos para viabilidade dos organismos devido à sua participação em complexas vias de sinalização (TURNER e BORKOVICH, 1993; RIOS *et al.*, 2001). Estas proteínas passam a informação a partir de um receptor ativado na membrana para efetores intracelulares. Diferentes tipos de receptores transmembranares, como receptores de hormônios, de neurotransmissores e receptores sensoriais, estão acoplados via proteínas G a uma grande variedade de efetores que incluem a adenilil ciclase, fosfolipases, fosfodiesterases e canais de sódio e potássio. (STRATHMANN *et al.*, 1989; DESSAUER, *et al.*, 1998; LICHTARGE *et al.*, 1996; SUNAHARA *et al.*, 1997).

As proteínas G são sinalizadores indispensáveis para uma serie de reações metabólicas e são heterodímeros compostos por subunidades α , β e γ , formando “uma das mais importantes nanomáquinas” da natureza (CLAPHAM, 1996).

O mecanismo de acoplamento do receptor de sinal com o efetor inicia-se quando um ligante específico ligado a um receptor de membrana induz uma mudança conformacional no receptor. Estes se ligariam, então como dímeros ou oligômeros a proteína G (MORRIS e MALBON, 1999; RIOS *et al.*, 2001). A alteração estrutural no domínio intracelular do receptor permite sua interação com a proteína G. O receptor induz a troca de GDP por GTP na subunidade α da proteína G ($G\alpha$). Este evento provoca o desacoplamento da subunidade α das

subunidades $\beta\gamma$ ($G\beta\gamma$) e o desligamento do receptor. A subunidade $G\alpha$ ligada a GTP e as subunidades $G\beta\gamma$ ligam-se ao efetor. E como possui um domínio de atividade GTPase, a subunidade $G\alpha$ restabelece sua conformação, hidrolisando GTP a GDP. Ao retomar sua conformação normal, $G\alpha$ se liga novamente com as subunidades $\beta\gamma$, podendo se associar ao receptor novamente (TAUSSIG e GILMAN, 1995; LICHTARGE *et al.*, 1996; DESSAUER, *et al.*, 1998; MORRIS e MALBON, 1999).

Este mecanismo funciona tanto para proteínas G estimuladoras ou G_s como também para proteínas G inibidoras ou G_i . A ativação da cascata ocorre quando uma proteína G_s estimula o efetor, que por sua vez, passa a ter sua forma cataliticamente ativa, que irá atuar nos processos metabólicos através da interação com um segundo mensageiro. A inibição do mecanismo ocorre quando uma proteína G_i , ao ser ativada por um antagonista, inativa o efetor, revertendo a cascata; ou ainda quando uma proteína G_s deixa de ser induzida por um receptor transmembranar (CLAPHAM, 1996; TESMER *et al.*, 1997; SUNAHARA *et al.*, 1997).

Muitos grupos tentam identificar as características funcionais dessas proteínas, bem como os genes envolvidos, seus receptores e efetores (TURNER e BORKOVICH, 1993; LICHTARGE *et al.*, 1996). Entretanto a estrutura tridimensional do heterodímero $G\alpha\beta\gamma$, só foi desvendada quando dois grupos independentes, Sigle e Hamm da Universidade de Yale e Sprang e Gilman da

Universidade do Texas, em 1997, resolveram a estrutura cristalizada da proteína (MORRIS e MALBON, 2000).

Além de trabalhos envolvendo o sequenciamento de subunidades da proteína G, vários estudos demonstram que certas toxinas e drogas podem afetar a atividade da proteína. Modificações covalentes catalisadas pela toxina pertussis parecem danificar a interação entre a subunidade α_i e seu receptor, causando uma interrupção na sinalização (TURNER e BORKOVICH, 1993).

Sassi e colaboradores (SASSI *et al.*, 1998) demonstraram, ao estudarem os efeitos do hormônio adenocortrofina (ACTH) no molusco *Mytilus galloprovincialis*, que a utilização de um inibidor que desacopla a proteína G do receptor de superfície celular inibe o efeito do ACTH. Este hormônio é responsável pela resposta imune e neuroendócrina em vertebrados e invertebrados. O ACTH atua ligando-se a um receptor específico na membrana que ativa a proteína G. Esta por sua vez, ativa a adenilil ciclase aumentando a produção do AMP cíclico e subseqüentemente ativando a proteína kinase (PKA), possibilitando a transmissão de sinal para o núcleo. Quando esta via é quebrada pela inibição da proteína G, o efeito do ACTH é completamente bloqueado (SASSI *et al.*, 1998).

A relaxina que é um hormônio que atua no sistema reprodutor, contração muscular, nível de AMP cíclico, canais de cálcio entre outros, quando inibida afeta a ativação da adenilil ciclase de uma maneira dose-dependente no molusco bivalve *Anadonta cygnea*. Quando impedida de ligar ao receptor, não ocorre a

ativação da proteína Gs que por sua vez não ativa a adenilil ciclase, inibindo a contração do músculo do pé do molusco (KUZNETSOVA *et al.*, 1999).

Isto demonstra que a atividade da proteína G pode ser inibida quando um análogo do ligante interage com o receptor de membrana, interrompendo a via de sinalização. Este efeito, eventualmente, poderia ser causado quando o organismo é exposto a xenobióticos que agiriam como análogos do ligante. A alteração na expressão dos receptores acoplados a proteína G, pode afetar a sinergia entre receptor e ligante e assim, a eficácia e potência de um determinado mecanismo de sinalização (RIOS *et al.*, 2001)

Além disso os xenobióticos, como metais pesados, podem estar afetando de alguma forma a estabilidade da membrana, e conseqüentemente, afetando a função da proteína G (BOLOGNESI *et al.*, 1999).

Neste trabalho buscamos identificar genes de proteínas G, amplificando, através da técnica de PCR, a seqüência correspondente ao domínio de ligação de GTP da subunidade α . Nesta subunidade, os aminoácidos que permitem a ligação da subunidade $G\alpha$ com nucleotídeos de guanina encontram-se em vários domínios. Estes domínios possuem uma seqüência de aminoácidos altamente conservada dentre todas as proteínas G conhecidas, desde leveduras até mamíferos. Para identificar a subunidade α da proteína G em *Perna perna* foram utilizados iniciadores degenerados contra esta região conservada.

1.4. Metalotioneína

Metalotioneínas (MTs) são proteínas caracterizadas pelo grande número de resíduos de cisteínas, baixo peso molecular e por sua expressão ser induzida por metais. São responsáveis pelos processos básicos de homeostase e detoxificação de metais pesados como zinco, cobre e cádmio (ENGELKEN e HILDEBRANDT, 1999; VIARENGO *et al.*, 1999; KHOO e PATEL, 1999). Os metais estão presentes na célula, mas seus níveis podem ser aumentados devido a mudanças nutricionais ou ambientais.

Além de metais, muitos fatores induzem a síntese de MTs, como estresse físico e fisiológico (HERNANDEZ *et al.*, 2000) e respondem a fatores de crescimento, hormônios e diferentes tipos de substâncias químicas. Grandes variações na temperatura, na concentração de oxigênio e na salinidade do meio, também podem ocasionar um aumento na expressão de MTs (ENGELKEN e HILDEBRANDT, 1999; VIARENGO *et al.*, 1999).

As MTs possuem a seqüência de aminoácidos evolutivamente conservada e têm sido identificadas em diversos organismos desde mamíferos (REMONDELLI *et al.*, 1999) a moluscos, como *Corbicula fluminea* (BAUDRIMONT *et al.*, 1999), *Mytilus galloprovincialis* (VIARENGO *et al.*, 1999) e *Dreissena polymorpha* (ENGELKEN e HILDEBRANDT, 1999).

Já foram descritas as seqüências destas proteínas em várias espécies de mamíferos, anfíbios, invertebrados e plantas. Recentemente, foi determinada a seqüência genômica de dois genes que codificam metalotioneínas em *Perna viridis* (KHOO e PATEL, 1999).

Os genes que codificam as metalotioneínas apresentam em sua região regulatória seqüências MRE (Elementos de Resposta a Metais), assim como seqüências correspondentes a receptores de glucocorticoides (KHOO e PATEL, 1999), onde ligam-se receptores que ativam a transcrição do gene (VIARENGO *et al.*, 1999; HERNANDEZ *et al.*, 2000) (Figura 2). A regulação transcricional das metalotioneínas por metais pesados envolve principalmente regiões MRE, caracterizadas por domínios altamente conservados e localizados nos primeiros 200 pb anteriores ao sítio iniciador da transcrição (REMONDELLI *et al.*, 1999).

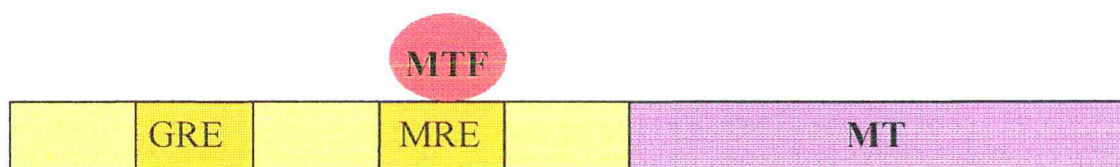


Figura 2. Esquema do gene que codifica a metalotioneína. Região regulatória (amarelo), região estrutural (lilás), Fator de transcrição (MTF).

Sabe-se que os metais podem funcionar como sinais de transdução, sendo o zinco o mais utilizado pelos organismos. Existem diversas enzimas que requerem zinco para o seu funcionamento, incluindo a RNA polimerase. O zinco, particularmente, é componente integral de proteínas que regulam a atividade da

RNA polimerase em eucariontes. Esses fatores são conhecidos com dedos de zinco e são responsáveis pela transcrição de genes utilizando íons de zinco como componentes estruturais de subdomínios de proteínas que ligam-se em seqüências regulatórias do DNA (REMONDELLI *et al.*, 1999).

Acredita-se que um fator de transcrição conhecido como MTF-1 (MRE-binding transcription factor) possua “dedos de zinco” em sua estrutura. Este fator ligado a um íon metálico, como o zinco, ligar-se-ia às MRE, sendo o responsável pelo metabolismo basal das metalotioneínas. Entretanto, outros metais, como o cádmio, poderiam ligar à estes mesmos fatores de transcrição aumentando a transcrição de metalotioneínas.

As metalotioneínas por estarem envolvidas em processos de detoxificação de metais, proteção contra estresse oxidativo dentre outras funções têm sido proposta como ferramenta para o monitoramento de poluição ambiental (VIARENGO *et al.*, 1999; REMONDELLI *et al.*, 1999). Por este motivo é importante que estes genes que codificam para MTs sejam identificados, particularmente em organismos considerados como bons bioindicadores.

Neste trabalho foram utilizados iniciadores degenerados obtidos a partir das seqüências de *Mytilus edulis* (KHOO e PATEL, 1999) para a amplificação de uma região conservada do gene da metalotioneína, possivelmente existente no mexilhão *Perna perna*.

1.5. Modelo de Estudo: o mexilhão *Perna perna*

Moluscos marinhos são comumente utilizados como organismos sentinelas para a detecção de poluição ambiental em águas costeiras devido à sua capacidade de acumular vários contaminantes orgânicos e inorgânicos (NARBONNE *et al.*, 1999). O modelo de estudo escolhido foi o mexilhão *Perna perna*, pois este invertebrado possui características que facilitam sua manipulação e, assim como outros moluscos, é um importante bioindicador de poluição ou contaminação por xenobióticos (HAHN, 1999; NARBONNE *et al.*, 1999).

O mexilhão *Perna perna* têm a seguinte classificação sistemática: Filo Molusca, Classe Bivalvia, Sub-Classe Lamellibranchia, Superordem Mytilida, Ordem Mytiloida, Família Mytilidae.

A classe Bivalvia é também denominada Pelecípode (Pelecypoda – do grego pélekys (machado) + pous, podos (pé)). O nome desta classe (pelecípodes) advém da forma do pé, em muitas espécies sempre semelhante a uma lâmina de machado. Como sua concha é formada por 2 valvas calcárias que se articulam, são também denominados bivalves. Os bivalves são principalmente marinhos e apenas alguns gêneros vivem em água doce.

Todos os representantes dessa classe efetuam trocas gasosas através de brânquias internas lamelares, de onde provém o nome lamelibrânquios. A água que penetra em seu corpo traz partículas de alimento e oxigênio para as trocas gasosas; além de banhar a cavidade do manto, onde estão situadas as brânquias. Estas são cobertas por cílios e uma camada de muco que possibilita a aderência

de partículas alimentares conduzidas à boca através do batimento ciliar. Estes organismos apresentam ainda, um sifão inalante e um exalante para entrada e saída da água, respectivamente.

Alguns bivalves, como ostras e mariscos adultos, vivem presos a um substrato. Monóicos ou dióicos, geralmente têm fecundação externa e desenvolvimento indireto.

A classe Bivalvia, à qual o mexilhão *Perna perna* pertence, engloba invertebrados sedentários e filtradores, sendo tolerantes a uma grande variedade de contaminantes ambientais, abundam ao longo do ano, além de fornecerem grandes quantidades de material biológico e apresentarem fácil manejo (BAYNE, 1989).

Os mexilhões são popularmente conhecidos como “mariscos” em Santa Catarina. São organismos encontrados na costa litorânea da América do Sul, nas regiões do Caribe e costa africana, banhadas pelo Oceano Atlântico. No Brasil, formam densos bancos naturais entre os Estados do Espírito Santo e Santa Catarina. A espécie de mexilhão *Perna perna* cultivada em Santa Catarina é encontrada de forma abundante nos costões litorâneos dos municípios, desde Laguna a Itapoá. Não possui restrições quanto ao clima e demonstra as maiores taxas de crescimento nos meses de primavera e verão. Seu desenvolvimento ocorre em áreas com salinidade superior a 25‰ e tolera valores até 15‰, com redução de crescimento (EPAGRI, 2000).

Iniciada em Santa Catarina nos anos 80, a mitilicultura, ou seja, o cultivo dos mexilhões, tem grande valor sócio-econômico para as comunidades

pesqueiras do litoral centro norte do Estado. Além de proporcionar uma renda adicional aos pescadores, a mitilicultura, dentro da maricultura, vem contribuindo para a geração de mão-de-obra e fixação das populações tradicionais, principalmente os jovens, nas suas áreas de origem. O cultivo do mexilhão tornou-se uma importante fonte de renda para diversas comunidades, o que torna o mexilhão economicamente importante (EPAGRI, 2000).

Em 1990, a produção de mexilhões *Perna perna* em Santa Catarina foi de 189.929 Kg, tendo aumentado consideravelmente em 1997 para 6.397.250 Kg. A partir da evolução experimentada pela mitilicultura nos últimos anos, o crescente interesse dos produtores e o despertar de grupos empresariais para a atividade, estima-se que a produção catarinense possa atingir 10 mil toneladas nos próximos dois anos. Com a extensão dos cultivos para áreas de maior profundidade, via cultivos de meia água, projetam-se volumes aproximados a 50 mil toneladas para os próximos anos (COSTA *et al.*, 1998; EPAGRI, 2000).

Outra razão para escolha do *Perna perna* como modelo é devido a facilidade na obtenção destes espécimes assim como dados sobre cultivo, e exposição a xenobióticos, uma vez que na Universidade Federal de Santa Catarina vários grupos de pesquisa se dedicam ao estudo desta espécie. Dentre estes grupos destacam-se: os trabalhos realizados pelo Dr. Jaime F. Ferreira e da Dra. Ayme R. M. Magalhães, do Laboratório de Cultivo de Moluscos Marinhos (FREITAS *et al.*, 1996; AQUINI *et al.*, 1996, MAGALHÃES *et al.*, 1996), o grupo de trabalho coordenado pela Dra. Maria Risoleta F. Marques e Dr. Afonso C. D. Bainy no Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e

Imunoquímica (BAINY *et al.*, 2000; BAINY e MARQUES, 2001; MULLER *et al.*, 2000) e também os trabalhos realizados pelo grupo coordenado pela Dra. Margherita A. A. M. Barracco, do Laboratório de Biologia Celular (SILVA *et al.*, 2002; BARRACCO *et al.*; 1999).

Apesar da facilidade em se trabalhar com mexilhões e sua grande importância econômica, não existe até o momento nenhum artigo publicado em revista indexada sobre expressão gênica, propriamente dita, no mexilhão *Perna perna*. Desta forma, é importante que se busque ampliar os dados sobre o genoma desta espécie, para que possam ser sugeridos modelos para avaliação dos efeitos decorrentes da exposição a xenobióticos.

2.OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é identificar, através de clonagem e sequenciamento, genes envolvidos na resposta ao estresse no mexilhão *Perna perna*. Isto permitirá não somente fornecer dados sobre o genoma desta espécie de mexilhão, mas também entender, do ponto de vista molecular o mecanismo de indução da resposta ao estresse. Além disso, estes dados poderão fornecer um modelo da interação DNA-proteína, na região regulatória de genes de resposta ao estresse. Os genes alvo escolhidos são: receptores nucleares, metalotioneínas e proteínas G.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

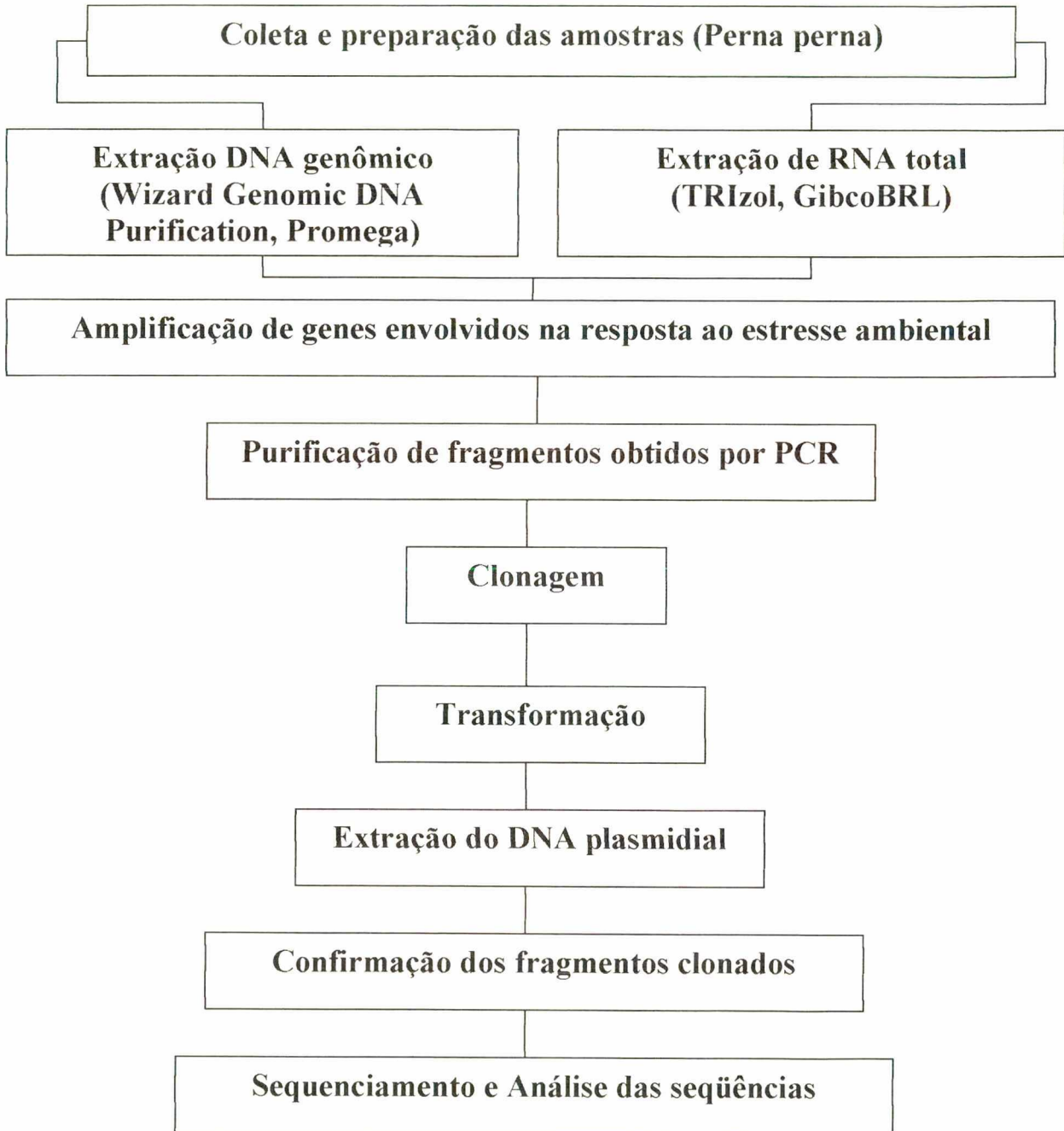


Figura 3. Esquema geral da metodologia utilizada neste trabalho

3.1. PREPARAÇÃO DO MATERIAL BIOLÓGICO

Preparação de bactérias competentes

Esta técnica de preparação de bactérias competentes foi baseada no protocolo descrito por Ausubel (AUSUBEL *et al.*, 1995). Foram utilizadas as bactérias *Escherichia coli* XL1Blue e DH5 α , fornecidas pela professora Sueli Lopes Gomes do Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Foram inoculados 4 ml de uma cultura de bactéria pré-crescidas, em meio LB líquido (10 g Peptona, 5 g Extrato de Levedura, 5 g de NaCl em 1 litro água, pH 7,5) A cultura foi incubada a 37 °C , sob agitação por 18 horas. Pequenas alíquotas da cultura foram retiradas para a determinação da densidade óptica a 590nm em espectrofotômetro. Este procedimento foi realizado até a densidade alcançar o valor de 0.4 (DO₅₉₀ = 0.4). A cultura foi então alíquotada em tubos de polipropileno e mantida no gelo por 10 minutos. Após este tempo, os tubos foram centrifugados por 7 minutos a 1600 x g a temperatura de 4 °C. O sobrenadante foi desprezado por inversão e os precipitados ressuspensos em 10 ml de solução de CaCl₂ gelado (60 mM CaCl₂, 15% Glicerol, PIPES 10 mM, pH 7,0). Os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 1600 x g a 4 °C. Em seguida o sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuspensado em 10 ml de solução CaCl₂ mantido no gelo por 30 minutos; e novamente centrifugado por 5 minutos a 1600 x g a 4 °C. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuspensado em 1,5 ml de solução CaCl₂ . A amostra foi dividida em alíquotas de 150 μ l por tubo e imediatamente colocada no freezer – 80 °C.

Coleta e preparação das amostras de mexilhão

A coleta de mexilhões *Perna perna* (Figura 4) foi realizada em cultivos nas praias de Ribeirão da Ilha, Sambaqui e no costão da praia da Joaquina. Os mexilhões coletados foram colocados em vasilhames de plástico e transportados para o laboratório. No laboratório os mexilhões foram dissecados e suas brânquias, tubo digestivo e manto foram removidos, com o auxílio de pinças e tesoura. O tecido foi pesado e separado, sendo colocado no gelo. Algumas amostras de tecido foram congeladas a $- 80\text{ }^{\circ}\text{C}$, enquanto outras foram utilizadas imediatamente para a extração de DNA genômico ou de RNA total.

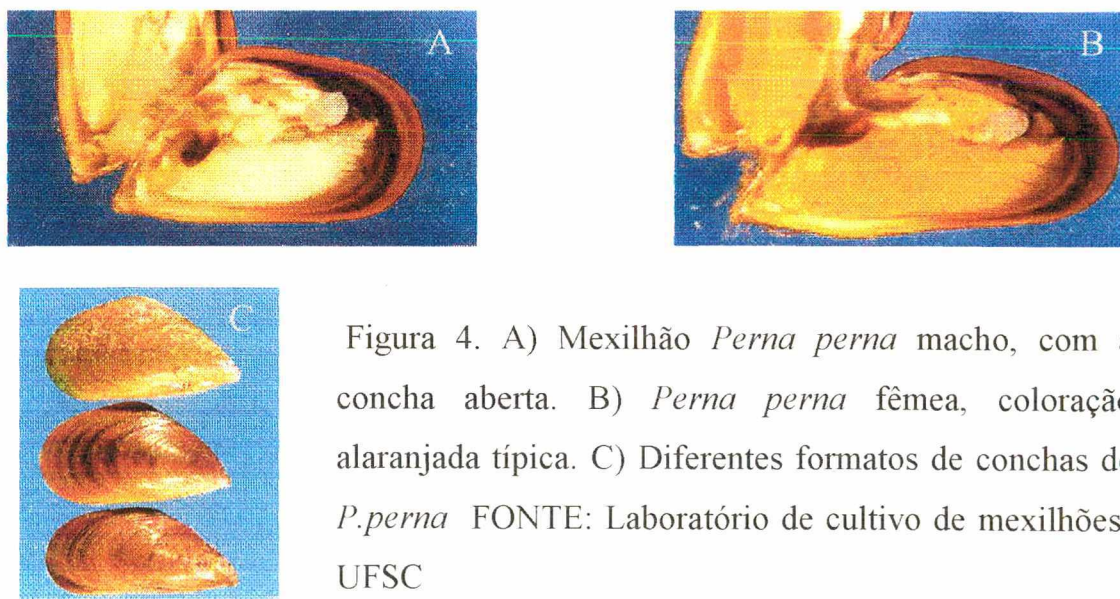


Figura 4. A) Mexilhão *Perna perna* macho, com a concha aberta. B) *Perna perna* fêmea, coloração alaranjada típica. C) Diferentes formatos de conchas de *P. perna* FONTE: Laboratório de cultivo de mexilhões-UFSC

3.2. EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Extração do DNA genômico

A extração de DNA genômico de *Perna perna* foi realizada utilizando-se o sistema Wizard Genomic DNA Purification, Promega Corporation. Este sistema foi utilizado para extração de DNA genômico de brânquia, manto ou tubo digestivo foi utilizado o mesmo procedimento para os diferentes tecidos e foi seguido o protocolo descrito pelo fabricante.

Após a extração, o DNA foi então ressuspendido em uma solução de hidratação contendo TE (Tris 10 mM, EDTA 1mM). As amostras foram armazenadas a 8 °C. As amostras foram analisadas em gel de agarose 0,8% e também quantificadas por espectrofotometria, através da absorbância 260 e 280 nm.

Extração de RNA total

A extração de RNA foi realizada de acordo com o protocolo para o reagente TRIzol, Gibco BRL, Life Technologies. Além das brânquias, foram retirados dos animais o pé, manto e sifão os quais foram pesados, transferidos para microtubos e lavados com PBS 1x gelado (Phosphate Buffered Saline tablets, Sigma – 1 tablete em 100 ml de água, concentração final: 100 mM tampão fosfato; 27 mM KCl; 137 mM NaCl). Os microtubos foram então centrifugados a 2000 x g por 2 minutos, sendo a lavagem e centrifugação repetida mais uma vez. Ao tecido foi então adicionado 300µl TRIzol e 10µl glicogênio (200µg), sendo homogeneizado com o

auxílio de um macerador. Adicionou-se mais 700 µl de TRIzol, sendo o material então centrifugado a 12000 x g por 10 minutos (4 °C). O sobrenadante foi transferido para outro tubo e incubado no gelo por 5 minutos. A estes tubos foram adicionados 200 µl de cloroformio e, em seguida, os mesmos foram agitados vigorosamente por 15 segundos e incubados no gelo por 3 minutos. Os tubos foram centrifugados a 10000 x g por 15 minutos (4 °C) e a fase aquosa foi transferida para outros tubos novos. À fase aquosa foram adicionados 500µl álcool isopropílico e após a incubação por 10 minutos no gelo, o material foi submetido a centrifugação a 12000 x g por 10 minutos (4°C). O sobrenadante foi descartado e os precipitados obtidos foram lavados com 1ml etanol 75%, agitados e centrifugados a 7500 x g por 5 minutos. Os sobrenadantes foram novamente descartados, os precipitados secos a temperatura ambiente foram, em seguida, ressuspensos em 200µl de água tratada com Dietil pirocarbonato (DEPC), que é um inibidor de RNAses , sendo guardados a -80 °C. As amostras foram analisadas em gel de agarose 1% preparado como descrito a seguir.

3.3. ELETROFORESE PARA ANÁLISE DE ÁCIDOS NUCLÉICOS

Análise de DNA

Para as eletroforeses de DNA, foram preparados géis de agarose de diferentes concentrações, dependendo do tipo de amostra a ser analisada (DNA genômico,

produto de PCR, DNA digerido), utilizando agarose NA (Amershan Pharmacia) ou Agarose Ultrapure (Promega), brometo de etídio (solução 10 mg/ml, concentração final no gel 5 µg). A cada amostra de DNA, foi adicionado tampão de amostra, concentração final 2x (solução 10x, Tris 10mM; glicerol 50%; azul de bromofenol 0,01%), para aplicação no gel. Como marcador de peso molecular, foi utilizado um dos seguintes marcadores: 1 kb DNA Ladder Plus (Gibco BRL), 100 bp Ladder (Gibco BRL), Molecular Weight Marker III (Boheringer Mannheim). As eletroforeses foram realizadas a 100V, numa cuba horizontal (Mini Gel Electrophoresis System – Mupid2, Cosmo Bio Co ou na cuba Life Technologies 11x 14 cm) , em tampão de corrida TBE 0,5x (TBE 10x, 108 g Tris; 55 g ácido bórico; 40 ml EDTA 0,5 M, pH 8 em 1 L de água destilada). Os géis foram visualizados em transiluminador UV (AUSUBEL *et al.*, 1995).

Análise de RNA

Para análise das amostras de RNA foi utilizado o mesmo método acima, no entanto todas as soluções foram tratadas com DEPC. Foi adicionado DEPC à água destilada utilizada para as soluções e diluição do tampão até a concentração final de DEPC de 0,01% (AUSUBEL *et al.*, 1995; SAMBROOK *et al.*, 1989). Em seguida, a água tratada foi colocada em estufa a 37 °C durante 18 horas e depois autoclavada.

A cuba de eletroforese e os pentes foram tratados com peróxido de hidrogênio 3% por 20 minutos e em seguida lavados com água destilada tratada com DEPC. O tampão da amostra utilizado foi o mesmo para DNA, exceto que ao mesmo, foi

adicionado DEPC na concentração final de 0,01% (AUSUBEL *et al.*, 1995; SAMBROOK *et al.*, 1989).

3.4. AMPLIFICAÇÃO DE GENES ENVOLVIDOS NA RESPOSTA AO ESTRESSE AMBIENTAL

3.4.1. AMPLIFICAÇÃO DE GENES DE RECEPTORES NUCLEARES A PARTIR DE DNA GENÔMICO

Para amplificação dos receptores nucleares foram utilizados os seguintes iniciadores degenerados (KOSTROUCH *et al.*, 1995):

H 1 iniciador 5'

Sequência de nucleotídeos: 5' TGY GAR GGY TGY AAR RG 3'

Sequência de aminoácidos: C E G C K G/R/S

H 2 iniciador 5'

Sequência de nucleotídeos: 5' TGY GAR GGY TGY AAR RYT TCT T 3'

Sequência de aminoácidos: C E G C K A/T/I/V S

H 3 iniciador 3'

Sequência de nucleotídeos: 5' CAT ICC IAC III VAD RCA 3'

Sequência de aminoácidos: C L I/M/L/F V G M

H 4 iniciador 3'

Sequência de nucleotídeos: 5' RCA YTT TCT BWR GCG RCA GKM YYS RCA 3'

Sequência de aminoácidos: C Q/R/W A/D/S/Y C R R/P/C/W/S R K C

H 5 iniciador 3'

Sequência de nucleotídeos: 5' RCA YTT TCT BWR YCT RCA GKM YYS RCA 3'

Sequência de aminoácidos: C Q/R/W A/D/S/Y C R R/P/C/W/S R K C

H 6 iniciador 3'

Sequência de nucleotídeos: 5' RCA YTT YTK GAR GCG RCA KWR YYG RCA 3'

Sequência de aminoácidos: C Q/R R/P/C/S C R L/F K/N/E/D K C

H 7 iniciador 3'

Sequência de nucleotídeos: 5' RCA YTT YTK GAR YCT RCA KWS YGG RCA

Sequência de aminoácidos: C P R/S/T/C C R F/L K/Q K C

Figura 5. Sequências dos oligonucleotídeos usados como iniciadores para amplificação do Domínio de Ligação ao DNA (DBD) de receptores nucleares. Nas sequências de nucleotídeos R representa A ou G, Y representa C ou T; K representa G ou T; S representa C ou G; M representa A ou C; W representa A ou T; D representa A ou G ou T; V representa A ou C ou G; B representa G ou C ou T. e I representa inosina (KOSTROUCH *et al.*, 1995).

A reação de amplificação continha: 4 µg da amostra de DNA genômico de *Perna perna*, 3mM MgCl₂, 1 unidade Taq DNA Polimerase (Gibco BRL), 1X Tampão de reação da enzima Taq DNA Polimerase (PCR Buffer 10X: 200mM Tris-HCl pH 8,4, 500 mM KCl), 0,2 mM de cada dNTP, e 0,4 µM do iniciador 5' (H2 ou H1) e de um dos iniciadores 3' (H3, H4, H5, H6 ou H7), sendo o volume final da reação de 25 µl. A reação foi realizada no termociclador Modelo PTC 150 Mini Cyclor, MJ Research.

O programa utilizado foi modificado de Kostrouch e colaboradores (KOSTROUCH *et al.*,1995): Programa RALL.

- 1) 40 segundos a 94 °C
- 2) 30 segundos a 65 °C
- 3) 1 minuto a 72 °C
- 4) ir para passo 1, repetindo 3 vezes
- 5) 40 segundos a 94 °C
- 6) 30 segundos a 60 °C
- 7) 1 minuto 72 °C
- 8) ir para passo 5, repetindo 15 vezes
- 9) 40 segundos a 94 °C
- 10)30 segundos a 55 °C
- 11)1 minuto a 72 °C
- 12)ir para passo 9, repetindo 20 vezes
- 13)10 minutos a 72 °C

14) 4 °C por tempo indeterminado

15) fim

O Programa EDG2 também foi utilizado para amplificação de receptores nucleares:

- 1) 5 minutos a 95 °C
- 2) 30 segundos a 93°C
- 3) 30 segundos a 65°C diminuindo 0,5°C por ciclo
- 4) 1 minuto a 72 °C
- 5) ir para passo 2, repetindo 39 vezes
- 6) 30 segundos a 95 °C
- 7) 30 segundos a 45 °C
- 8) 1 minuto a 72 °C
- 9) ir para passo 6, repetindo 19 vezes
- 10) 10 minutos a 72 °C
- 11) 4 °C por tempo indeterminado
- 12) fim

O controle utilizado foi o DNA do plasmídio pDBD 86-174 que contém o domínio de ligação ao DNA do receptor nuclear Rev-erb β . O tamanho de fragmento obtido após a amplificação com iniciadores degenerados é de 130 pb (TERENZI *et al.*, 1998).

Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 0,5X e corados com brometo de etídio. Os produtos de PCR amplificados foram armazenados a – 20 °C.

3.4.2. AMPLIFICAÇÃO DE GENES DE RECEPTORES NUCLEARES

A PARTIR DO RNA

Transcrição Reversa

Para transcrição reversa foi utilizado o sistema Thermoscript RT-PCR System, GibcoBRL de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante. As amostras de RNA total extraído de diversas tecidos do mexilhão *Perna perna* foram quantificadas e 1 µg foi utilizada para a transcrição reversa. Os iniciadores utilizados para síntese de cDNA foram: iniciador H7 (20 pmol) ou de Oligo dT (50 pmol). Foi utilizado o programa RT-PCR: 50 °C por 1 hora; 85 °C 5 minutos; 37 °C 25 minutos, sendo que nos 5 minutos iniciais o programa foi interrompido para a adição de 1 µl de Rnase H (2 U/µl). Foi dada continuidade ao programa até completar os 20 minutos restantes. O cDNA resultante foi armazenado -80 °C.

Amplificação do cDNA

Para amplificação dos receptores nucleares foram utilizados iniciadores degenerados H2 e H7 (KOSTROUCH *et al.*, 1995). Foi utilizado 1 µl da reação do cDNA e foram empregadas as mesmas condições descritas anteriormente para amplificação do receptor nuclear a partir do DNA genômico. O programa utilizado foi o EDG2. Como controle da amplificação foi utilizado o DNA genômico. As amostras foram analisadas em gel de agarose 1,5%.

3.4.3. AMPLIFICAÇÃO DAS EXTREMIDADES 5' E 3' DO cDNA (RACE) DO GENE DO RECEPTOR NUCLEAR

RACE

Para a realização da técnica de RACE (Rapid Amplification of 5' and 3' cDNA ends) foi utilizado o sistema GeneRace, versão D, Invitrogen, de acordo com o protocolo do fabricante. Este sistema possibilita a obtenção de seqüências completas das extremidades 5' e 3' de um gene a partir do cDNA. A técnica é baseada na ligação seletiva de um oligonucleotídeo de RNA à extremidade 5' do RNAm, utilizando uma ligase. Uma vez estando ligado a um oligo de seqüência conhecida na extremidade 5', o RNA é transcrito utilizando-se um iniciador Oligo dT com uma 'cauda' de seqüência conhecida para criar um sítio de ligação para um iniciador conhecido durante a amplificação do cDNA na extremidade 3'. Assim o cDNA pode ser amplificado por PCR utilizando iniciadores para as extremidades 5' e 3' do gene.

PCR-RACE

Para a realização do PCR a partir do cDNA obtido com o sistema GeneRACE foram construídos dois iniciadores para amplificação do receptor nuclear, baseados na seqüência obtida com os iniciadores H2 e H7 do fragmento de 1 Kb, clone pNR1PP. Estes iniciadores foram construídos com o objeto de amplificar especificamente o cDNA correspondente ao fragmento de 1 Kb.

Os iniciadores utilizados foram:

RACE-H2 (5' TGY GAG GGC TGY AAA AYT TCT TCA 3')

RACE-H7 (5' TCT CCG TCG TTT GTC TAC TGG GCA GTT3')

Foram utilizadas as seguintes combinações de iniciadores : RACE 5'/ RACE H7; RACE H2/ RACE 3'; RACE 5'/ RACE 3'; RACE H2/ RACE H7; H2/ RACE 3'; RACE 5'/ H7 e H2/ H7.

Foi utilizado 1 µl cDNA, 2 mM MgCl₂, 2,5 unidades Taq DNA Polimerase (Gibco BRL), 1x Tampão de reação da enzima Taq DNA Polimerase (PCR Buffer 10X: 200mM Tris-HCl pH 8,4, 500 mM KCl), 0,2 mM de cada dNTP e 0,2 µM do iniciador iniciador 5' e 0,2 µM de um dos iniciadores iniciador 3' , para o volume final da reação de 50 µl. Os tubos foram então colocados no termociclador Modelo PTC 150 Mini Cycles, MJ Research. O programa utilizado foi:

Programa GeneRACE

- 1) 94 °C, 5 minutos
- 2) 94 °C, 30 segundos
- 3) 75 °C, 1 minutos
- 4) 72 °C, 3 minutos
- 5) ir para passo 2, repetindo 5 vezes

- 6) 94 °C, 30 segundos
- 7) 75 °C 1 minuto, diminuindo 0,5 °C por ciclo
- 8) 72 °C 3 minutos
- 9) ir para passo 6, repetindo 30 vezes
- 10) 72 °C, 10 minutos
- 11) 4 °C por tempo indetrminado
- 12) fim

As amostras foram analisadas em gel de agarose 1,5%.

PCR-RACE Nested

Para identificar a presença de produtos reais (e não artefatos) obtidos na reação de PCR, foi realizado o nested PCR. Foram utilizados iniciadores fornecidos no sistema GeneRACE que amplificam mais internamente o Oligo RNA na extremidade 5' e o Oligo dT na extremidade 3'.

Foram utilizados 2 µl da reação de PCR anterior e a devida combinação de iniciadores “sense” e “antisense”. Onde antes foi utilizado o iniciador RACE 5', utilizamos iniciador RACE 5' Nested, e quando o iniciador RACE 3' utilizamos iniciador RACE 3' Nested. As concentrações de iniciadores e as condições de reação foram idênticas àquelas utilizadas para PCR. O programa utilizado foi:

Programa Nested

- 1) 94 °C, 2 minutos
- 2) 94 °C, 30 segundos

- 3) 70 °C, 30 segundos
- 4) 72 °C, 3 minutos
- 5) ir para passo 2, repetindo 25 vezes
- 6) 72 °C, 10 minutos
- 7) 4 °C por tempo indeterminado
- 8) fim

As amostras foram analisadas em gel de agarose 1,5%.

3.4.4. AMPLIFICAÇÃO DE GENES DE PROTEÍNA G

Para a análise da proteína G os testes foram iniciados com a obtenção do cDNA, conforme descrito por Strathmann e colaboradores (STRATHMANN *et al.*, 1989). Os iniciadores utilizados para Proteína G foram:

OMP 41 iniciador 5'

Seqüência de nucleotídeos 5' G TCT AGA GAY GTN GGN GGN CAR MG 3'

Seqüência de aminoácidos D V G G Q R

OMP 19 iniciador 5'

Seqüência de nucleotídeos 5' C GGA TCC AAR TGG ATH CAY TGY TT 3'

Seqüência de aminoácidos K W I H C F

OMP 20 iniciador 3'

Seqüência de nucleotídeos 5' G GAA TTC MTC YTT YTT RTT NAG RAA 3'

Seqüência de aminoácidos F L N K K D

OMP 21 “ antisense”

Seqüência de nucleotídeos 5’ G GAA TTC RTC YTT YTT RTT YAA RAA 3’

Seqüência de aminoácidos F L N K K D

Figura 7. Seqüências dos oligonucleotídeos usados como iniciadores para amplificação do gene correspondente a subunidade α da Proteína G que interage com o nucleotídeo Guanina. Nas seqüências de nucleotídeos, R representa A ou G, Y representa C ou T; M representa A ou C; N representa A ou G ou T ou C; H representa A ou C ou T (STRATHMANN *et al.*, 1989). As seqüências de nucleotídeos sublinhadas contem um sítio para uma endonuclease de restrição, nos iniciadores OMP 41 e OMP19 para Bam HI e nos iniciadores OMP 20 e OMP21 para Eco RI.

	<u>OMP41</u>	<u>OMP19</u>		<u>OMP20, 21</u>
	<u>DVGGQR</u>	<u>KWIHCF</u>		<u>FLNKKD</u>
G ₈ :	DVGGQRDERRKNIQCFNDVTALIFVVASSSYNMVIREDNQTNRLQEALNLFKSIWNNRWLRTISVILFLNKKD			(295)
G ₁₁ :	DVGGQRSERKKWIHCFEGVTALIFCVALSOYDLVLAEDEEMNRMHESMKLFDSICNNKWFDTDSIILFLNKKD			(272)
G ₁₂ :	DVGGQRSERKKWIHCFEGVTALIFCVALSAYDLVLAEDEEMNRMHESMKLFDSICNNKWFDTDSIILFLNKKD			(273)
G ₁₃ :	DVGGQRSERKKWIHCFEGVTALIFCVALSOYDLVLAEDEEMNRMHESMKLFDSICNNKWFDTDSIILFLNKKD			(272)
G ₀ :	DVGGQRSERKKWIHCFEDVTALIFCVALSGYDQVLHEDETTNRMHESLMLFDSICNNKFTDTSIILFLNKKD			(273)
G ₂ :	DVGGQRSERKKWIHCFEGVTALIFCVELSGYDLKLYEDNQTSRMAESLRFLFDSICNNKWFINTSLILFLNKKD			(273)
T _r :	DVGGQRSERKKWIHCFEGVTCTIFIAALSAYDMVLVEDEVNRMHESLHLFNSICNHRVFATTSIVLFLNKKD			(268)
T _c :	DVGGQRSERKKWIHCFEGVTCTIFCAALSAYDMVLVEDEVNRMHESLHLFNSICNHRVFAATTSIVLFLNKKD			(272)

Figura 8. Seqüência prevista de aminoácidos de oito subunidades α da Proteína G. As setas abaixo da seqüência de aminoácidos dos iniciadores indicam a direção da polimerização. As seqüências comparadas são derivadas de cDNA de cérebro e espermátide de camundongos (STRATHMANN *et al.*, 1989).

Transcrição reversa

O cDNA foi preparado a partir de RNA total extraído com TRIZol, utilizando o sistema Thermoscript RT-PCR System (Gibco). Os tecidos utilizados foram de manto e brânquia. Para a síntese da fita de cDNA foram utilizados 25 pmol/reação dos iniciadores “antisense” OMP20 e OMP21, separadamente.

Foram preparadas amostras de manto com os iniciadores OMP20 e OMP21 e de brânquia também com os mesmos iniciadores, resultando em quatro reações. A reação de transcrição foi realizada como descrito anteriormente para o receptor nuclear.

PCR de cDNA da Proteína G

A reação foi processada utilizando-se 5 µl de cada uma das amostras de cDNA de *Perna perna*, 1,5 mM MgCl₂, 1,5 unidade Taq DNA Polimerase (Gibco BRL), 1X Tampão de reação da enzima Taq DNA Polimerase (PCR Buffer 10X: 200mM Tris-HCl pH 8,4, 500 mM KCl), 0,2 mM de cada dNTP, e 1 µM do iniciador iniciador 5' (OMP41 ou OMP19) e de um dos iniciadores iniciador 3' (OMP21 ou OMP20), sendo o volume final da reação de 25 µl. Os tubos foram então colocados no termociclador Modelo PTC 150 Mini Cycles, MJ Research. O programa utilizado para a amplificação foi: Programa Gui

- 1) 95 °C, 5 minutos
- 2) 94 °C, 1 minuto
- 3) 45 °C, 30 segundos (diminuindo 1 °C/ciclo)

- 4) 72 °C, 3 minutos
- 5) ir para passo 2, repetindo 8 vezes
- 6) 94 °C, 1 minuto
- 7) 50 °C, 1 minuto
- 8) 72 °C, 3 minutos
- 9) ir para passo 6, repetindo 24 vezes
- 10) 72 °C, 10 minutos
- 11) 15 °C, por tempo indeterminado
- 12) fim

Após a amplificação, as amostras foram analisadas em gel de agarose 2% e as bandas visualizadas no transiluminador com luz UV.

3.4.5. AMPLIFICAÇÃO DE GENES DE METALOTIONEÍNA

Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para a reação de PCR foi utilizado o DNA genômico extraído de *Perna perna* com o sistema Wizard Genomic DNA, já descrito anteriormente neste trabalho. Os iniciadores degenerados utilizados para amplificação da Metalotioneína (KHOO e PATEL, 1999) foram:

MTC1 iniciador 5'

Seqüência de nucleotídeos 5' CCN TGY AAY TGY ATH GAR AC 3'

Seqüência de aminoácidos P C N C I E

MTC2 iniciador 3'

Seqüência de nucleotídeos 5' CA NCC NSW YTC RCA YTT RCA 3'

Seqüência de aminoácidos C K C E D/E/V/Q/H/L G C/W

Figura 9. Seqüências dos oligonucleotídeos usados como iniciadores para amplificação da Metalotioneína . Nas seqüências de nucleotídeos R representa A ou G, Y representa C ou T; S representa C ou G; W representa A ou T; N representa G ou C ou T ou A e H representa A ou C ou T.

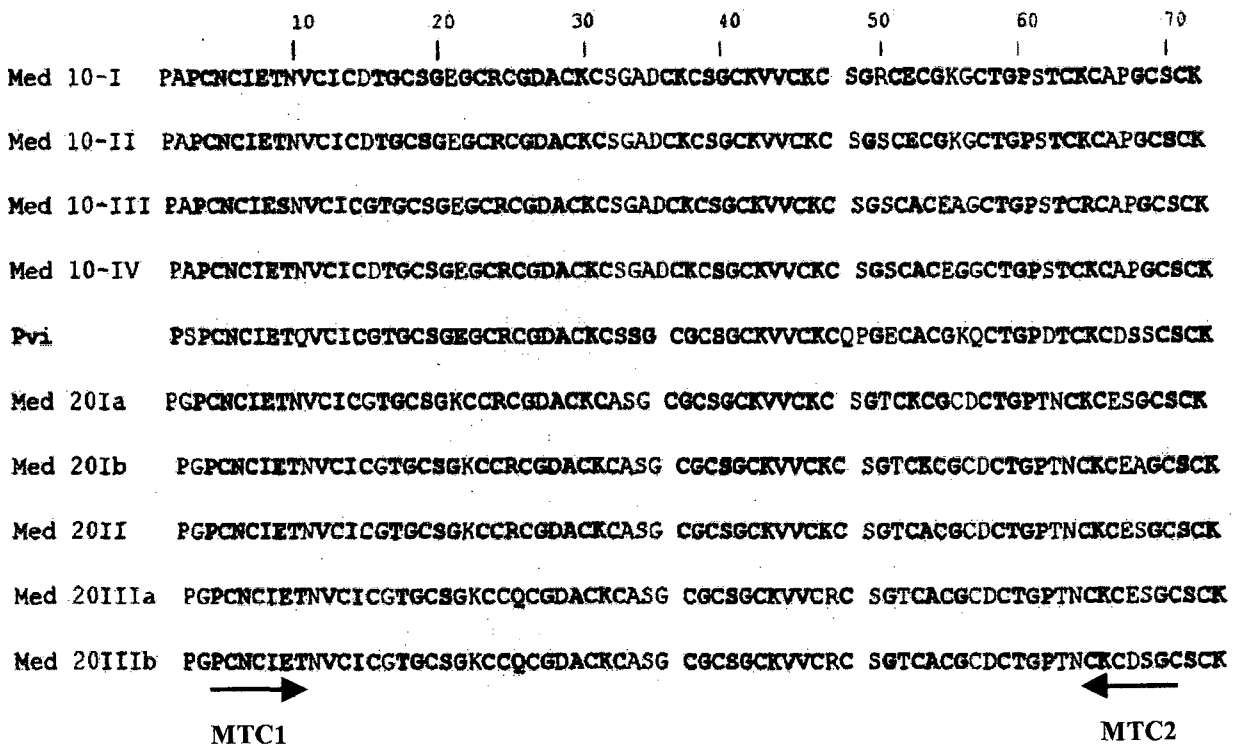


Figura 10. Comparação entre seqüências homólogas de Metalotioneína nos moluscos *Mytillus edulis* (Med) e *Perna viridis* (Pvi). As setas indicam a direção de polimerização dos iniciadores (KHOO e PATEL, 1999).

Foi utilizado o sistema Ready-To-Go PCR Beads, Amersham Pharmacia conforme o protocolo do fabricante. Foram adicionados aos tubos 3-4 μg de DNA genômico de *Perna perna* e 25 pmol dos iniciadores (iniciador 5' MTC1 e iniciador 3' MTC2) e o volume de reação completado com água destilada até 25 μl de volume final.

O programa utilizado para a amplificação foi:

Programa DEG-1

- 1) 94 °C, 1 minuto
- 2) 37 °C, 30 segundos
- 3) 72 °C, 3 minutos
- 4) ir para passo 1, repetindo 4 vezes
- 5) 94 °C, 1 minuto
- 6) 50 °C, 1 minuto
- 7) 72 °C, 3 minutos
- 8) ir para passo 5, repetindo 24 vezes
- 9) 72 °C, 7 minutos
- 10) 15 °C, por tempo indeterminado
- 11) fim

As amostras foram analisadas em gel de agarose 1,5%.

3.5. PURIFICAÇÃO DE FRAGMENTOS OBTIDOS POR PCR

Os produtos de PCR que apresentaram fragmentos detectáveis no gel de agarose foram purificados para eliminação de dNTPs e iniciadores presentes na solução. Para a purificação dos produtos de PCR foram utilizados diferentes métodos.

Isolamento e purificação com sílica a partir do gel de agarose

Foi utilizado o sistema “Concert Matrix Gel Extraction System”, Gibco BRL para o isolamento e purificação dos fragmentos amplificados e seguido o protocolo do fabricante.

Isolamento e purificação com coluna a partir do gel de agarose

Para o isolamento e purificação dos fragmentos foi utilizado o sistema “Concert Rapid Gel Extraction System”, Gibco BRL, Life Technologies e foram seguidas as recomendações do fabricante.

Isolamento e purificação com fenol a partir do gel de agarose

Para esta técnica os produtos de PCR foram aplicados em gel de agarose 1,5%. O fragmento amplificado foi cortado do gel de agarose, sendo a fatia de gel colocada em um eppendorf e incubada em banho a 65° C para que derretesse por completo, uma vez que a temperatura deve ser controlada para que a amostra não volte ao seu

estado insolúvel. Quando a fatia do gel de agarose derreteu-se por completo foi adicionado tampão TE (10mM Tris + 1mM EDTA) pH 8,0 para diminuir a concentração da agarose até 0,4%. Em seguida, foi adicionado 1 volume de fenol e o material foi homogeneizado por 10 minutos. Depois deste procedimento, a amostra foi centrifugada por 10 minutos a 15000 x g a temperatura ambiente. Em seguida, o sobrenadante foi retirado e colocado em outro tubo Eppendorf. Foi adicionado ao tubo 1:10 acetato de potássio e 2,5 volumes etanol 95%. As amostras foram deixadas por aproximadamente 1 hora no freezer -20° C. Depois deste tempo, outra centrifugação foi realizada por 10 minutos a 13000 x g e, em seguida, a amostra foi ressuspensa em 30 µl de tampão TE. As amostras foram analisadas em gel de agarose 1 %.

Purificação dos produtos de Nested-PCR

Foi utilizado o sistema Concert Rapid PCR Purification System, GIBCO, BRL, Life Technologies, nas condições descritas pelo fabricante.

Purificação por precipitação com etanol

A amostra contendo o produto da amplificação foi colocada em um tubo Eppendorf de 1,5 ml e adicionados acetato de potássio 4,5 M na proporção 1:2 e 2,5 volumes de etanol 100%. O tubo foi deixado a -20 °C por 1 hora e, em seguida, centrifugado a 10000 x g por 15 minutos a 4 °C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com etanol 70%. A amostra foi

deixada a temperatura ambiente para secar e, em seguida, o precipitado ressuspenso em 100 µl de água destilada. (AUSUBEL *et al.*, 1995)

3.6. CLONAGEM

Para a clonagem dos fragmentos obtidos nas ampliações de genes de receptor nuclear, proteína G e metalotioneína foram utilizados os seguintes sistemas de clonagem:

Ligação ao vetor pGEM-T

Os insertos foram preparados, antes da clonagem no Vetor pGEM-T, com a adição de dATP, nas extremidades 5' e 3'. Esta adição de dATP é necessária pois mesmo a Taq Polimerase tendo adicionado uma única deoxiadenosina às extremidades 3' dos fragmentos amplificados, esta adenosina tende a ser hidrolisada após o produto de PCR ter sido armazenado por alguns dias. Este passo é uma maneira de garantir a ligação do inserto, ao vetor tipo T, pGEM-T, Promega. Após esta incubação, foi realizada novamente uma purificação da amostra, através da precipitação com etanol (AUSUBEL *et al.*, 1995).

Ao produto de PCR purificado foram adicionados: Tampão de reação da enzima Taq DNA Polimerase 1X (PCR Buffer 10X), Taq DNA Polimerase 5 unidades, dATP 2,5 mM, MgCl₂ 3mM. Estas são as concentrações finais da reação. A reação foi incubada por 2 horas a 72 °C.

Para a ligação do inserto ao vetor foi utilizado o Sistema pGEM-T Vector System I, Promega Corporation, e seguido o protocolo do fabricante. Este vetor possui no sítio de clonagem sítios de clivagem para as enzimas Nco I e Sal I para detecção do fragmento clonado.

Este vetor é um plasmídeo pGEM-5Zf(+) que foi clivado com Eco RV e que em ambas extremidades 3' terminal foram adicionadas timidinas. Esta única timidina no sítio de inserção possibilita a ligação do vetor com produtos de PCR, prevenindo a recircularização do plasmídeo e criando uma extremidade compatível pelo produto de PCR gerados pela Taq DNA polimerase, uma vez que uma das propriedades da enzima Taq polimerase é frequentemente adicionar uma única deoxiadenosina à extremidade 3' dos fragmentos amplificados (Promega Corporation, USA, cat # A3600).

Ligação ao vetor pGEM-T Easy Vector

Foi utilizado o sistema pGEM-T Easy Vector System I, Promega. Este sistema utiliza o mesmo vetor do sistema pGEM-T descrito anteriormente para clonagem, no entanto este vetor possui no sítio de clonagem um sítio para clivagem com a enzima Eco RI para detecção do fragmento clonado.

Ligação ao vetor pUC 18/Sma I

Foi utilizado o sistema Sure Clone Ligation, Amersham Pharmacia Biotech. Este sistema elimina as adeninas na extremidade 3' do produto de PCR, utilizando a

atividade 3'-5' do fragmento Klenow da DNA Polimerase I. O fragmento de PCR é então fosforilado pela T4 polinucleotídeo kinase e o produto resultante é extraído com fenol/clorofórmio, sendo posteriormente purificado em uma coluna. O produto de PCR é ligado a um vetor pUC 18 cortado com Sma I e que possui extremidades cegas.

3.7. TRANSFORMAÇÃO

Como controle da transformação foi utilizado o plasmídeo pBEND3. Foram colocados 2µl da amostra de ligação do vetor e inserto em um tubo com 50µl de *E. coli* XL1Blue ou DH5α competente que foi mantido no gelo por 15 minutos. Em seguida, as amostras foram colocadas em banho-maria a 42 °C por 1 minuto e novamente colocadas no gelo. Para cada tubo foi adicionado 1 ml de meio LB e foram incubados a 37 °C por 2 horas. Após este tempo, os tubos foram centrifugados por 3 minutos a 2000 x g.

Foram removidos 750 µl do sobrenadante para ser desprezado, sendo o restante utilizado para ressuspender as células. A suspensão de células foi então espalhada sobre uma placa de meio LB sólido (10 g Peptona, 5 g Extrato de Levedura, 5 g de NaCl, 15 g de Ágar em 1 litro água, pH 7,5); contendo Ampicilina 50 µg/ml, IPTG (isopropil-β-D-tiogalactosídeo) 1,5 mM, X-Gal (5-bromo-4 cloro-3-indolil-β-D-

galactosídeo) 80µg/ml e a placa colocada em estufa a 37 °C por 18 horas (AUSUBEL *et al.*, 1995)

3.8. EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL

Extração do DNA plasmidial em pequena escala

Após o crescimento das colônias em placas LB/Ampicilina/IPTG/X-Gal, foram selecionadas colônias brancas e azuis . Com a ajuda de uma ponteira foi retirada uma colônia e colocada em um tubo contendo 3 ml de LB e 3 µl Ampicilina (50 mg/ml). Este procedimento foi realizado para coleta de várias colônias da mesma placa, para aumentar as chances de obtenção do clone desejado. O procedimento foi realizado de acordo com Ausubel e colaboradores (AUSUBEL *et al.*, 1995). O DNA plasmidial obtido da extração foi analisado em gel de agarose 1 %.

Extração do DNA plasmidial em grande escala

Para alguns dos clones que apresentaram o fragmento de 1 Kb depois da digestão, foi realizada uma nova extração de DNA plasmidial a partir das amostras congeladas a -80 °C para obtenção de mais DNA.

Os clones foram inoculados em 25ml de meio LB/Ampicilina, sendo colocados em agitador por 18 horas a 37° C. O procedimento foi realizado de acordo com Ausubel e colaboradores (AUSUBEL *et al.*, 1995). As amostras foram observadas em gel 1,0 %.

3.9. CONFIRMAÇÃO DOS FRAGMENTOS CLONADOS

Amplificação por PCR dos clones

Para confirmação dos clones positivos, foi realizada uma reação de PCR de todos os clones obtidos de receptores nucleares, proteína G e metalotioneína. Foram utilizados 2 µl do DNA obtido da extração do DNA plasmidial dos clones e foram seguidas as mesmas condições utilizadas para amplificação por PCR dos respectivos genes clonados. As amostras foram analisadas em gel de agarose e os clones positivos foram sequenciados.

Digestão do DNA plasmidial

Os fragmentos clonados no Vetor pGEM-T foram também confirmados por digestão com enzimas de restrição

Para os clones com vetor pGEM-T foram utilizadas duas das enzimas que clivam o DNA plasmidial pGEM-T nas extremidades do local de ligação do inserto. As duas enzimas são: Sal I (3000 unidades – 12 unidades/µl) e NcoI (300 unidades – 10 unidades/µl). Foram utilizadas para cada reação: 2 unidades de cada enzima, 2X tampão One PhorAll (OPA 10X : 100 mM Tris-acetato pH 7,5, 100 mM acetato de Magnésio, 500 mM acetato de potássio, Amershan, Pharmacia), 1 µl de cada amostra de DNA plasmidial e água deionizada para completar o volume final para

20 µl. Em seguida, as amostras foram incubadas por 2 horas a 37 °C e posteriormente analisadas em gel de agarose 1%.

Para confirmar os fragmentos clonados no Vetor pGEM-T Easy foi realizada uma clivagem com a enzima de restrição Eco RI. Foram utilizados 10 µl do DNA clone, 1 µl Eco RI (12U/µl), 2 µl Tampão H 10x (500 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 500 mM NaCl), e 7 µl de água destilada. A reação foi incubada por 3 horas 37 °C. As amostras foram analisadas em gel de agarose e os clones positivos foram sequenciados.

3.10. SEQUENCIAMENTO

Sequenciamento Automático

Os clones foram enviados inicialmente ao Dr. Gustavo Goldman, do Departamento de Tecnologia Farmacêutica, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP de Ribeirão Preto. A seqüência foi realizada em sequenciador automático.

Alguns clones, foram enviados ao Dr. Edmundo Carlos Grisard no Laboratório de Protozoologia, do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal de Santa Catarina e sequenciados por Juliano Bordignon. Foi utilizado o sequenciador automático.

Sequenciamento Manual

Para o sequenciamento manual foi utilizado o sistema SILVER SEQUENCE DNA Sequencing System, Promega e seguido o protocolo do fabricante. Este é um sistema para sequenciamento não radioativo, baseado no sistema de sequenciamento enzimático de Sanger (SANGER *et al.*, 1977), que combina sequenciamento no termociclador e coloração por prata para detecção de bandas em um gel de seqüência (BASSAN *et al.*, 1991). A coloração por prata é rápida, apresenta baixo custo em comparação com a detecção radioativa, fluorescente ou quimioluminescente.

Vários programas foram testados. Os programas utilizados foram:

Seq-2:

- 1) 95 °C, 2 minutos
- 2) 95 °C, 30 segundos
- 3) 60 °C, 30 segundos
- 4) 70 °C, 1 minuto
- 5) ir para passo 2, 60 vezes
- 6) 4 °C, por tempo indeterminado
- 7) fim

Seq-3

- 1) 95 °C, 2 minutos

- 2) 95 °C, 30 segundos
- 3) 70 °C, 1 minuto
- 4) ir para passo 2, 60 vezes
- 5) 4 °C por tempo indeterminado
- 6) fim

Seq-4:

- 1) 95 °C, 2 minutos
- 2) 95 °C, 30 segundos
- 3) 72 °C, 1 minuto
- 4) ir para passo 2, 60 vezes
- 5) 4 °C, por tempo indeterminado
- 6) fim

As amostras foram armazenadas a -20 °C.

Gel de Sequenciamento

Foi utilizado o aparelho de eletroforese SQ3 Sequencer, Hoefer e fonte PS3000, Amersham Pharmacia.. O gel de sequenciamento foi preparado na concentração de 6% Acrilamida, 7M Urea, conforme descrito por Sambrook e colaboradores (SAMBROOK *et al.*, 1989).

Coloração do gel de sequenciamento por prata

A coloração com prata foi realizada conforme descrito pelo fabricante do sistema SILVER SEQUENCE DNA Sequencing System, Promega (BASSAN *et al.*, 1991).

3.11. ANÁLISE DAS SEQÜÊNCIAS

Através de computadores PC conectados a Internet, as seqüências obtidas foram analisadas. Esta análise foi constituída de várias etapas e para cada etapa foi utilizado um programa específico. O programa BioEdit Sequence Alignment Editor, versão 5.0, (HALL, 1999) foi utilizado em várias análises. É um programa distribuído gratuitamente na rede e pode ser instalado no computador através do site www.bioexchange.com.

As etapas e os programas utilizados foram os seguintes:

1. Inicialmente as seqüências obtidas foram transferidas para o computador e foram eliminados os espaçamentos, números ou outros símbolos que pudessem atrapalhar as análises. Isto porque muitos programas não corrigem os espaçamentos e não lêem letras ou números diferentes de A, T, C, G e N (que representam os nucleotídeos adenina, timina, citosina, guanina, ou qualquer um dos nucleotídeos, respectivamente) ocorrendo erro de leitura ou não funcionamento do programa.

2. Foi realizada a identificação da seqüência do vetor dentro do sequenciamento obtido. Os programas utilizados foram o BioEdit, ou VecScreen que é uma ferramenta dentro do programa BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1997) www.ncbi.nlm.nih.gov. A seqüência correspondente ao vetor, posteriormente foi apagada, para facilitar a análise.
3. Para a localização da seqüência dos iniciadores dentro da seqüência obtida foi utilizado o programa BioEdit ou através de análise manual. Isto foi realizado para localização precisa do início do fragmento clonado e para determinação da direção em que o inserto foi ligado ao vetor.
4. Uma vez determinado o sentido de leitura, algumas seqüências foram invertidas para facilitar a análise. Isto foi realizado através do programa BioEdit.
5. Quando existiam várias leituras para um mesmo clone, estas seqüências foram empilhadas, e foi obtida uma seqüência consenso do clone. Clones diferentes também foram empilhados para verificar as semelhanças ou homologia de seqüências entre clones diferentes. Para isto foram utilizados os programas BioEdit através da ferramenta CLUSTALW, ou CLUSTAL do EBL European Bioinformatics Institute www.ebi.ac.uk.
6. As seqüências foram então, traduzidas nas 3 fases de leitura para proteína utilizando ferramentas disponíveis no site www.expasy.ch, como o

programa Translate, além do programa BLAST, localizado no site do GeneBank www.ncbi.nlm.nih.gov e do programa BioEdit.

7. Em seguida estas seqüências de aminoácidos foram comparadas com outras seqüências armazenadas no banco de dados do SWISSPROT no site <http://dove.embl-heidelberg.de> e do GeneBank www.ncbi.nlm.nih.gov. As seqüências que apresentaram homologia com algum gene foram analisadas mais detalhadamente

Outros programas auxiliares foram utilizados para análise das seqüências e serão apresentados na discussão deste trabalho.

3.12. ANÁLISE DO FRAGMENTO 1 KB (NR1PP) DO GENE DE RECEPTOR NUCLEAR

Após o sequenciamento, tendo sido confirmado que o fragmento de 1 Kb (NR1PP) apresentava homologia com a seqüência do Domínio de Ligação ao DNA do receptor nuclear e foram iniciados uma série de testes para caracterizar melhor o gene.

Teste de clivagem

O teste de restrição foi realizado virtualmente, através do programa BioEdit Sequence Alignment Editor, versão 5.0 (HALL, 1999).

Foi inserida a seqüência obtida no programa. Este programa contém um banco de dados com diversas enzimas de restrição e automaticamente, localiza os sítios de clivagem destas enzimas dentro de uma seqüência e indica também as enzimas que não clivam esta seqüência.

Após a análise, algumas enzimas foram escolhidas para o teste de restrição *in vitro* do fragmento de 1Kb. Para cada reação foi utilizado 15 µl do fragmento de 1 Kb purificado (0,5 µg/µl), 2 µl tampão OPA 10x, 2 µl de água destilada e 1 µl de enzima. As enzimas utilizadas foram: Eco RI (12 u/µl), Eco RV(15 u/µl), Bam HI (12 u/µl), Hind III (18 u/µl), Sau3AI (10 u/µl), Bgl II (15 u/µl), Alu I (3 u/µl) e Mbo I (10 u/µl). A reação foi incubada a 37 °C por 1 hora. Após este período as amostras foram analisadas em gel de agarose 1,5%.

Marcação do Fragmento de 1 Kb

Para a construção de uma sonda molecular com o fragmento de 1Kb foi utilizado o sistema Gene Images AlkPhos Direct labelling and detection system, Amersham Life Science. O sistema foi utilizado para marcação e detecção de DNA e RNA e é baseado no sistema de quimioluminescência do dioxietano, envolvendo a marcação direta da sonda com uma enzima fosfatase alcalina termo-estável especial. Durante a adição do “cross-linker” a fosfatase se liga covalentemente ao ácido nucléico. O protocolo foi seguido conforme recomendações do fabricante.

Digestão do DNA genômico de *Perna perna*

Para a digestão do DNA genômico foram utilizadas as seguintes enzimas e seus respectivos tampões : Eco RI (12 u/μl) e Eco RV(15 u/μl) com tampão H 10x (500 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 500 mM NaCl); Bam HI (12 u/μl) e Mbo I (10 u/μl) com tampão K 10x (200 mM Tris-HCl pH 8,5, 100 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 M KCl) ; Hind III (18 u/μl) e Bgl II (15 u/μl) com tampão OPA 10x; Alu I (3 u/μl) com tampão L (100 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM MgCl₂, 10 mM DTT).

Para a reação com cada enzima foram utilizados 3 μl de tampão, 4,5 μl de água, 15 μl DNA genômico (1,98μg/μl) e 7,5 μl da enzima. Os tubos foram incubados a 37 °C por 2 horas.

Southern Blot

Após a digestão do DNA genômico, as amostras foram aplicadas em gel de agarose 0,8%, e a eletroforese foi corrida a 5V/cm, até o tampão de corrida chegar ao fim do gel. Foram aplicadas, além das amostras digeridas, o DNA genômico de mexilhão, o fragmento de 1 Kb purificado, o DNA plasmidial contendo o inserto de 1 Kb e os padrões de 1Kb ladder, Lambda DNA/ Hind III digested. A transferência foi realizada conforme descrito por Sambrook e colaboradores (SAMBROOK *et al.*, 1989)

Hibridização e Detecção

Para a hibridização foi utilizado o mesmo sistema utilizado para marcação da sonda “Gene Images AlkPhos Direct, Amersham Life Science labelling and detection system” e seguido o protocolo do fabricante.

3.13. ANÁLISE DO FRAGMENTO DE 120 pb (NR26PP) DO GENE DO RECEPTOR NUCLEAR

Após o sequenciamento, tendo sido confirmado que o fragmento de 120 pb correspondia à seqüência do Domínio de Ligação ao DNA do receptor nuclear. Foi iniciada uma série de testes para caracterizar o gene e verificar a expressão deste gene em mexilhões.

Marcação do fragmento de 120 pb

Para a construção de uma sonda molecular com o fragmento de 120 pb (NR26PP) foi utilizado o sistema Gene Images AlkPhos Direct labelling and detection system, Amersham Life Science. O protocolo seguido foi aquele descrito pelo fabricante..

Northern Blot

A amostras foram aplicadas em gel de foramaldeído e a transferência para realização “Northern Blot” foram preparados segundo Ausubel e colaboradores (AUSUBEL *et al.*, 1995).

A eletroforese foi corrida a 5 V/cm. Além das amostras de RNA, foram aplicados um padrão de peso molecular e o fragmento de 120 pb purificado.

Hibridização

A hibridização foi realizada conforme protocolo descrito anteriormente para DNA, utilizando os reagentes de hibridização do “Sistema Images AlkPhos Direct, Amersham Life Science labelling and detection system” e seguido o protocolo do fabricante. As soluções foram tratadas com DEPC.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Diversos métodos de extração foram testados para os diferentes tecidos do mexilhão, por exemplo, fenol, proteinase K, entre outros. O sistema comercial “Wizard Genomic DNA Purification” utilizado para a extração de DNA mostrou-se bastante eficiente. Este sistema pôde ser utilizado para o isolamento de DNA de uma série de tecidos como brânquia, manto e aparelho digestivo. É um sistema baseado em processo de 4 etapas e não envolve a utilização de solventes orgânicos como o fenol, que é extremamente tóxico.

Nas primeiras extrações o DNA genômico apresentava um rastro no gel típico de degradação, como mostra a figura 11. Nesta extração não foi adicionado o EDTA, que como agente quelante evitaria a degradação do DNA inibindo a ação das nucleases. A adição de EDTA na primeira etapa do processo de extração antes do tecido ser macerado incrementou qualitativamente e quantitativamente a obtenção de DNA genômico, como podemos observar na figura 12.

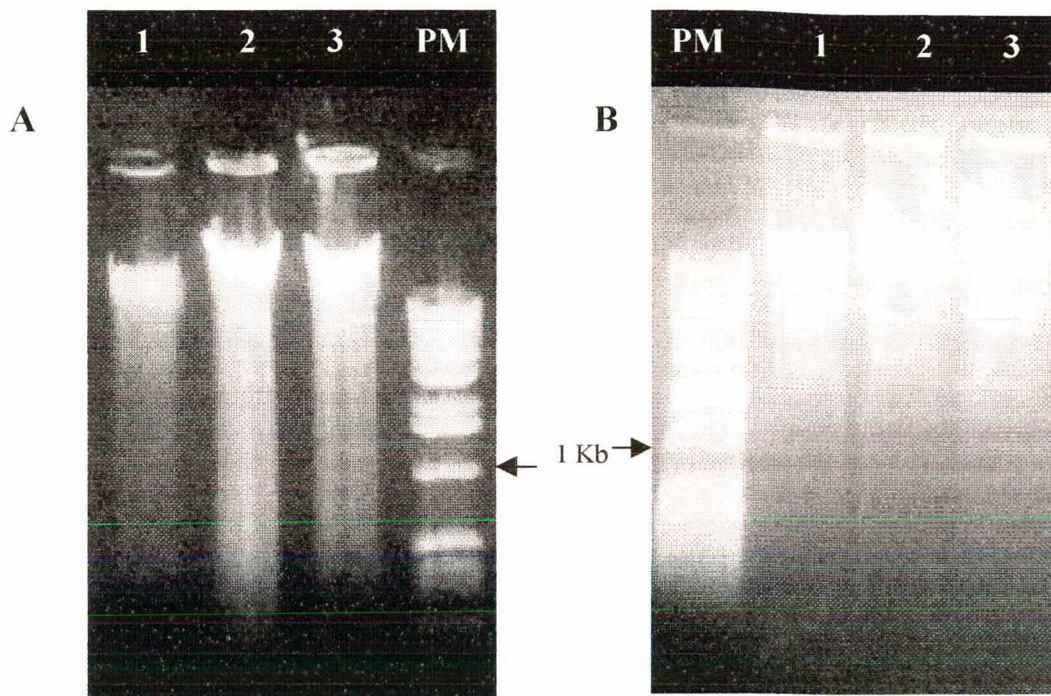


Figura 11. Gel de agarose 0,8% mostrando o DNA genômico extraído de mexilhão. Extração de DNA genômico do mexilhão *Perna perna*, realizada a partir de: A) tecido de manto (amostra 1) e tubo digestivo (amostras 2 e 3); B) tecido de brânquia (amostras 1 a 3). O DNA apresenta um rastro característico de degradação. O padrão de peso molecular utilizado foi o 1 Kb Ladder Plus , GIBCO BRL(amostra PM).

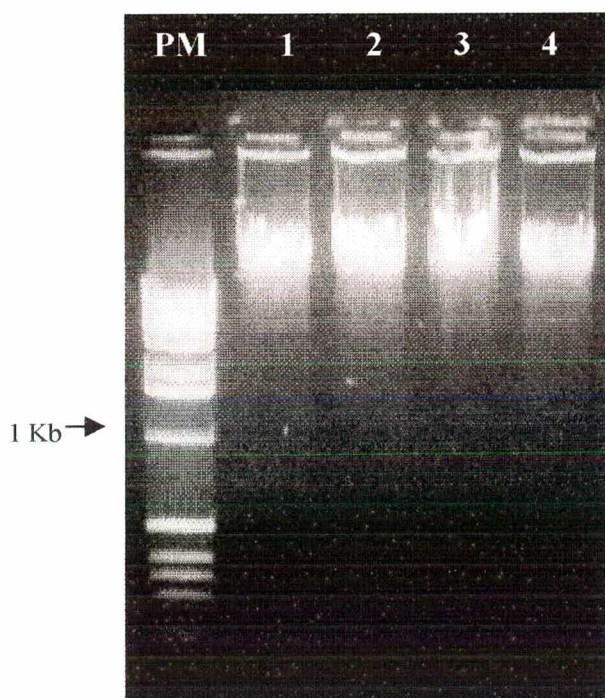


Figura 12. Gel de agarose 0,8% de DNA genômico. Extração de DNA genômico de *Perna perna*, utilizando o “Kit Wizard Genomic DNA extraction”. Com a adição de EDTA antes da homogeneização o DNA obtido não apresenta sinais de degradação. Amostras extraídas de manto (1 e 2) e brânquia (3 e 4); PM é o padrão de peso molecular de 1 Kb Ladder Plus, GIBCO BRL.

Para a extração de RNA total foi utilizado o TRIzol, Gibco, que contém fenol em sua composição, o que exige um cuidado especial na manipulação devido a toxicidade do fenol. As amostras que apresentaram melhores resultados, ou maior quantidade de RNA, foram aqueles em que foi adicionado glicogênio juntamente com o TRIzol (Figura 13). Com o glicogênio, que auxilia a precipitação do RNA, foram observadas bandas menores, além das bandas de RNA ribossomal. Estas bandas menores seriam correspondentes a RNAs mensageiros (SAMBROOK *et al.*, 1989).

Uma modificação, importante para obter RNA de boa qualidade, foi a lavagem do tecido com o tampão fosfato PBS 1x (Phosphate Buffered Saline – 100 mM tampão fosfato; 27 mM KCl; 137 mM NaCl) antes da adição de fenol. O PBS parece eliminar parte do muco que reveste os tecidos no mexilhão, tornando mais fácil a homogeneização e posterior recuperação do sobrenadante.

Foi utilizado um gel de agarose sem formaldeído para a análise qualitativa e quantitativa do RNA total. Este tipo de gel permitiu a visualização do RNA, evitando a manipulação de substâncias tóxicas como o formaldeído e a formamida, que tradicionalmente são utilizados para visualização do RNA.

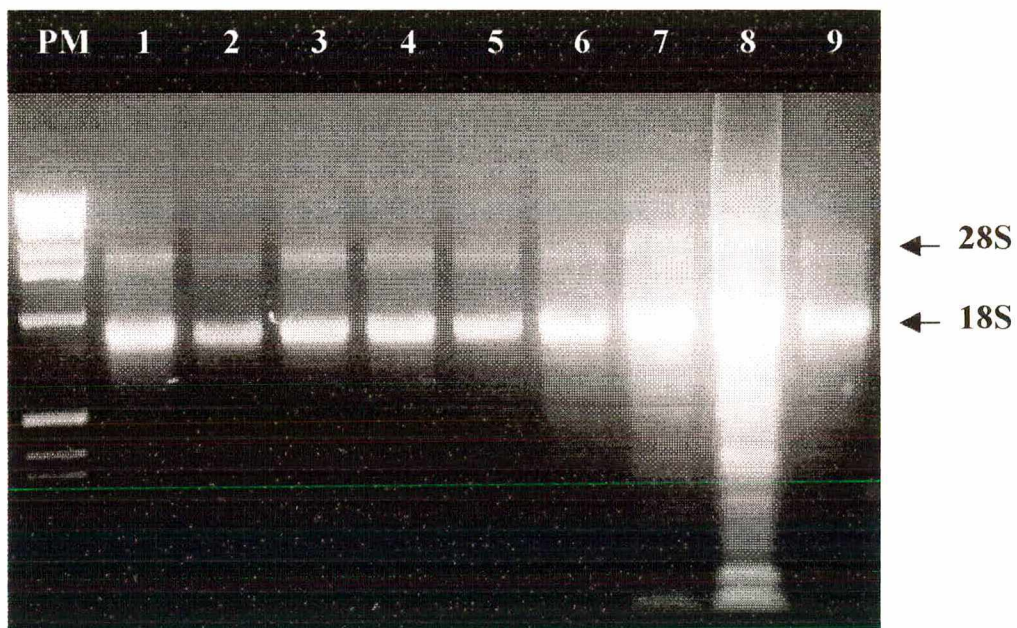


Figura 13. Gel de agarose 1% mostrando o RNA total obtido de diferentes tecidos de *Perna perna*. RNA total extraído de brânquia (1 a 5). RNA total extraído com glicogênio a partir de tecido de brânquia (6 e 9), pé (7) e manto (8). Em todas as amostras observam-se as bandas referentes ao RNA ribossomal 28S e 18S. PM = padrão de peso molecular 1Kb Ladder Plus, Gibco BRL.

4.2. RECEPTOR NUCLEAR

4.2.1. Amplificação e Clonagem de genes de Receptores Nucleares a Partir de DNA Genômico

PCR

Inicialmente as amostras foram amplificadas para detecção do receptor nuclear com os iniciadores H2 e H7 e foram utilizados 1,5 mM MgCl₂ e o programa RALL para a reação de PCR, segundo descrito por Koustrouch e colaboradores (KOUSTROCH *et al*, 1995). Após várias tentativas onde não foi possível visualizar o produto da amplificação, foram realizados testes com diferentes concentrações de Cloreto de Magnésio, de 2 mM e 3 mM (dados não mostrados). A utilização de magnésio é importante como cofator da enzima Taq polimerase. Com a concentração de MgCl₂ 3 mM, foi possível visualizar um fragmento de 1Kb.

Foi utilizado então o programa EDG2, que anteriormente já havia sido utilizado para amplificação do gene do Transportador ABC, com iniciadores degenerados (GRIMM *et al.*, 2000). Utilizando este programa foi amplificado novamente o fragmento de 1 Kb e o controle pDBD 86-174 (Figura 14). O controle da amplificação, pDBD 86-174, contém a sequência do “zinc finger” de um receptor nuclear órfão NOR-1 e a amplificação desta sequência gera um fragmento de 130 pb. A amplificação do fragmento de 1Kb foi possível em vários tecidos, uma vez padronizada as condições ótimas de PCR (Figura 15).

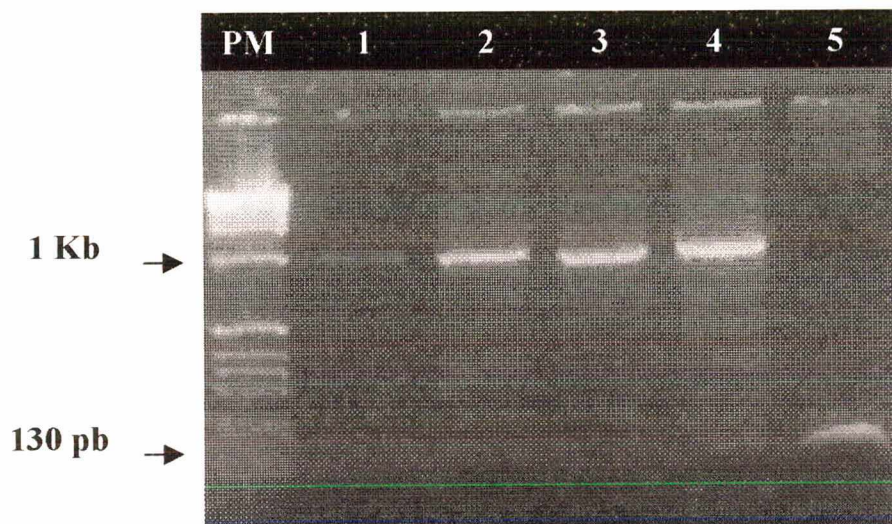


Figura 14. Gel de agarose 1,5%. DNA genômico de *Perna perna* extraído de brânquia amplificado por PCR, mostrando a presença do fragmento de 1 Kb (1,2,3,4). O pDBD 86-174, controle de amplificação, é uma seqüência de “zinc finger”(5). PM= padrão de

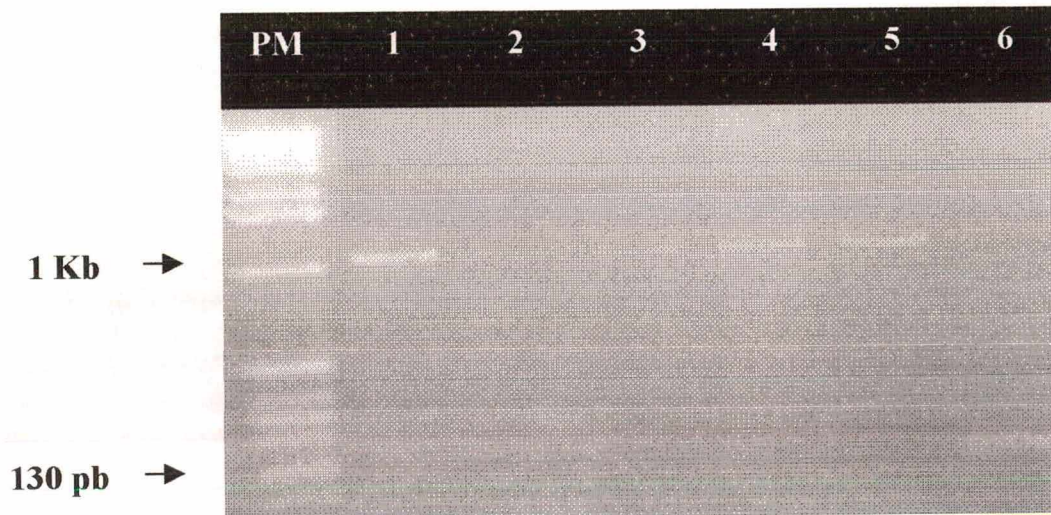


Figura 15. Gel de agarose 1,5%. DNA genômico de *Perna perna* extraído de brânquia (1 e 5), manto (2, 3 e 4) amplificado por PCR, mostrando o fragmento de 1 Kb, utilizando os iniciadores H2 e H7. O pDBD 86-174, controle de amplificação, é uma seqüência de “zinc finger”(6).

Tendo amplificado um fragmento com a combinação de iniciadores H2/H7, foi realizada uma reação de PCR com outras combinações de iniciadores, utilizando-se as mesmas condições de reação (Figura 16). As combinações H1/H3, H1/H7, H2/H3 e H2/H5 amplificaram fragmentos de diversos tamanhos. Além de conterem pequenas diferenças na seqüência de nucleotídeos, que aumenta as chances de hibridizar com uma seqüência de um receptor nuclear, o iniciador H1, por exemplo, hibridiza com uma região menor do receptor nuclear, quanto comparado com o iniciador H2(ver figura 6).



Figura 16. Gel de agarose 1,5%, mostrando o resultado da amplificação utilizando diferentes combinações de iniciadores: H1/H3 (1), H1/H4 (2), H1/H5 (3), H1/H6 (4), H1/H7 (5), H2/H3 (6), H2/H4 (7), H2/H5 (8), H2/H6 (9) e H2/H7 (10). PM é o padrão de peso molecular 1 Kb ladder.

Com o uso de iniciadores degenerados e baseados nos resultados obtidos em outros sistemas biológicos (KOSTROUCH *et al.*, 1995), nossos ensaios de PCR foram dirigidos para a detecção de um fragmento de aproximadamente 130 pb, que corresponde ao domínio “zinc finger” de receptores nucleares, como descrito para *Tripedalia cystophora* (KOSTROUCH *et al.*, 1998) e *Caenorhabditis elegans* (KOSTROUCH *et al.*, 1995). No entanto, como já foram descritos receptores nucleares contendo íntrons na região do Domínio de Ligação do DNA, de tamanhos variando entre 800 a 1000 pb aproximadamente, isto poderia justificar o fragmento de 1 Kb obtido com os iniciadores H2/H7 e com outras combinações de iniciadores (Figura 16) na amplificação do DNA genômico de *Perna perna* (OHKURA *et al.*, 1996; TORII *et al.*, 1999).

Fragmentos maiores e menores que 1 Kb também foram obtidos (Figura 16) e posteriormente purificados e clonados.

Purificação do produto de PCR

Foi utilizada a precipitação do produto de PCR com etanol (Figura 17). Este procedimento foi então utilizado para a purificação dos fragmentos obtidos com as combinações de iniciadores H1/H3, H1/H7, H2/H3 e H2/H5.

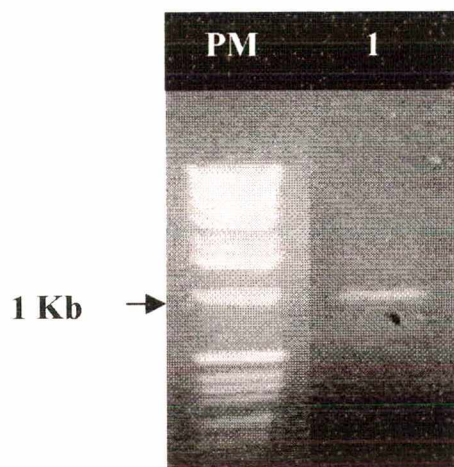


Figura 17. Visualização do fragmento de 1 Kb após a precipitação do produto de PCR com etanol. A quantidade de DNA recuperado após a precipitação é de aproximadamente 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. PM é o padrão de peso molecular 1 Kb Ladder Plus, Gibco BRL.

Clonagem

Após a purificação os fragmentos foram clonados no vetor pGEM-T, como descrito em Materiais e Métodos, e foi feita a extração do DNA plasmidial em pequena escala.

Digestão dos clones

Para confirmar o tamanho dos fragmentos clonados foi realizada a digestão com enzimas de restrição Sal I e Nco I. Estas enzimas clivam o DNA no sítio de clonagem do Vetor PGEM-T, “liberando” o fragmento clonado. Somente os clones que, teoricamente, possuem o fragmento de 1 Kb obtido com os iniciadores H2/H7 foram analisadas por digestão com enzima de restrição (Figura 18). Os clones obtidos a partir de outras combinações de iniciadores não foram digeridos.

Dos 16 clones derivados da amplificação com H2/H7 analisados, somente 6 apresentaram o fragmento de 1Kb.

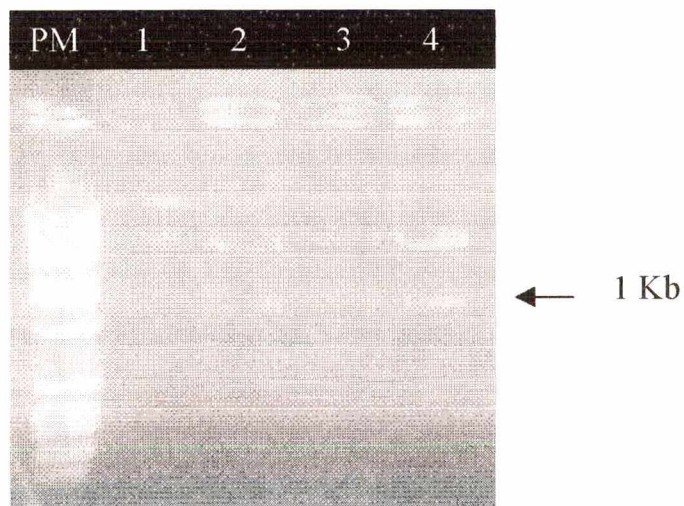


Figura 18. Digestão dos clones com Sal I e NcoI. Controle dos clones sem enzima (1 e 3), clones digeridos (2 e 4). Observa-se o fragmento de 1 Kb nas linhas 2 e 4. PM= padrão de peso molecular.

Amplificação do fragmento clonado

Foi realizado o PCR dos clones, para detecção dos fragmentos clonados e foram utilizados os iniciadores correspondentes aos utilizados na amplificação do receptor nuclear do DNA genômico (Figura 19 e 20).

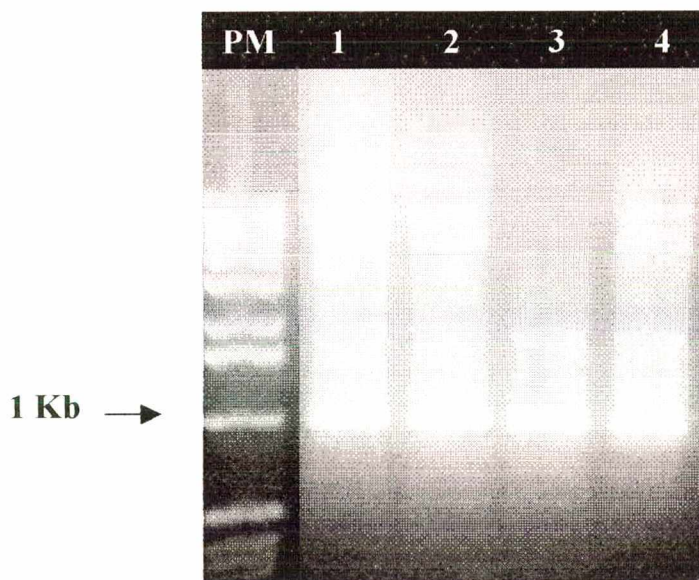


Figura 15. Gel de agarose 1,5% mostrando a amplificação dos clones derivados dos iniciadores H2/H7. Observa-se o fragmento de 1 Kb (1, 2, 3 e 4). O padrão de peso molecular (PM) é o 1Kb Ladder Plus, Gibco BRL.

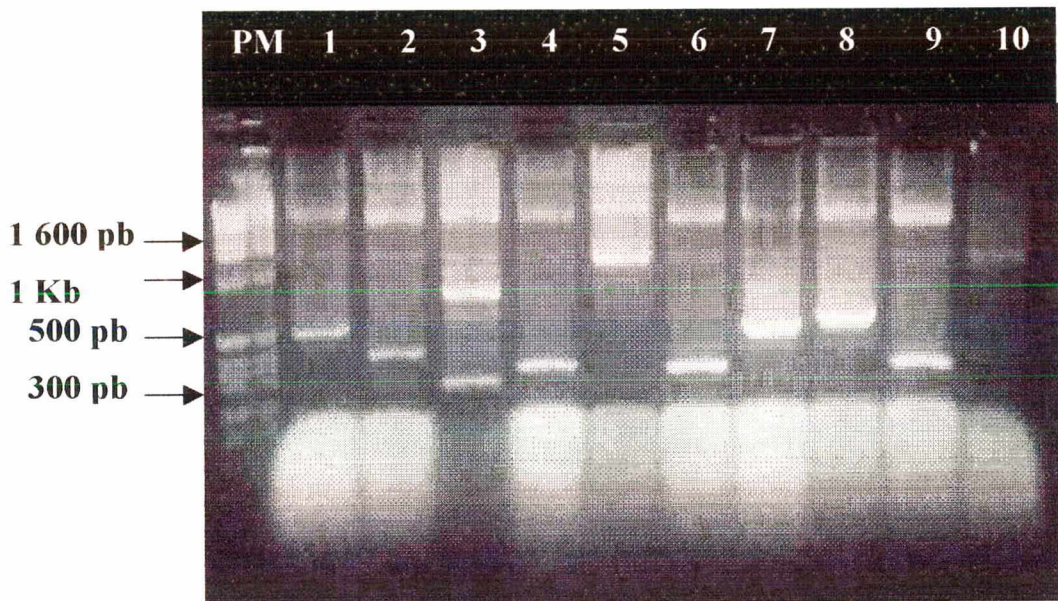


Figura 20. Amplificação dos clones derivados das combinações de iniciadores H1/H3 (1, 2, 3 e 4); H1/H7 (5); H2/H3 (6, 7, 8 e 9); H2/H5 (10).

Após a confirmação da presença do inserto nos clones, estes foram nomeados como mostra a tabela 1. Os seis clones derivados de H2/H7, por terem mostrado o mesmo tamanho de fragmento receberam a mesma designação, pNR1PP. Posteriormente, após o sequenciamento seria comprovado que se trata da mesma seqüência clonada.

CLONE	FRAGMENTO CLONADO	ORIGEM
pNR1PP	1 Kb	H2/H7
pNR2PP	550 pb	H1/H3
pNR3PP	400 pb	H1/H3
pNR4PP	290 pb	H1/H3
pNR5PP	300 pb	H1/H3
pNR6PP	1 Kb	H1/H7
pNR7PP	400 pb	H2/H3
pNR8PP	600 pb	H2/H3
pNR9PP	600 pb	H2/H3
pNR10PP	400 pb	H2/H3
pNR11PP	1100 pb	H2/H5

Tabela 1. Clones obtidos após amplificação do dedo de zinco de receptor nuclear a partir do DNA genômico de *Perna perna*. A denominação dos clones significa NR= Nuclear receptor; PP = *Perna perna*. A origem significa os iniciadores utilizados para amplificação do DNA genômico que amplificaram o fragmento clonado.

A amplificação com iniciadores degenerados permite a amplificação de vários genes da mesma família (KOSTROUCH *et al.*, 1995), isto poderia explicar a

variedade de fragmentos obtidos. Além disso, já foram descritos genes de uma mesma família contendo íntrons de tamanhos diferentes (KHOO e PATEL, 1999), o que possibilitaria a amplificação de genes de receptores nucleares que possuam tamanhos de íntrons diferentes. Por estas razões, os clones obtidos, mesmo os de fragmentos menores, são candidatos ao sequenciamento.

4.2.1.1. Sequenciamento

Os seis clones de 1 Kb obtidos da amplificação com os iniciadores H2/H7, que foram os primeiros a serem enviados para sequenciamento automático no laboratório de Dr. Gustavo Goldmam- USP de Ribeirão Preto, foram sequenciados e todos os 6 clones mostraram ter a mesma seqüência.

4.2.1.2. Análise da seqüência do fragmento de 1 kb (NR1PP)

A partir da análise do clone pNR1PP, que continha o fragmento de 1 Kb (NR1PP) foram obtidas 12 seqüências, sendo 6 com o iniciador SP6 (reverso) e 6 com o iniciador T7. Quando as seqüências foram empilhadas com a utilização do programa BioEdit, verificou-se que se tratavam de uma mesma seqüência.

O programa BioEdit, produziu uma seqüência consenso, ao comparar todas as leituras. Na seqüência obtida, mostrada na figura 21, após a utilização do programa Translate que traduz as seqüências de aminoácidos para proteínas, foi identificada

uma seqüência homóloga ao receptor nuclear (Figura 21). Ao ser analisada a tradução, foi observado que a fase de leitura estava truncada, interrompida por um íntron. Para receptores nucleares já foram descritos íntrons, em outros organismos, na mesma posição, após o P-Box, em que foi encontrado na seqüência do NR1PP (GUO *et al.*, 1996; CASTILLO *et al.*, 1997; TARRI *et al.*, 1999). A estrutura exon-íntron do gene NR1PP obedece a regra de processamento GT.....AG (KHOO e PATEL, 1999).

Para identificar este receptor nuclear foi realizada uma comparação com o banco de dados do GenBank, através do programa BLAST. Inicialmente quando foi colocada toda a seqüência de 1 Kb no programa, não encontramos homologia com nenhuma seqüência do gene de receptor nuclear. Devido presença do intron na seqüência do receptor nuclear clonado, o programa BLAST, não reconhece a “interrupção” do exon, e não encontra homologia. Então, após a remoção da seqüência do íntron e os resultados do BLAST mostraram uma grande homologia da seqüência do clone NR1PP com uma grande variedade de seqüências de receptores nucleares órfãos. A figura 22, mostra a comparação do gene NR1PP com receptores nucleares de outros organismos (Figura 22).

tgtgagggctgtaaaaacttcttcaaggtaattatataagtcacatctgcttcaattacgatg
C E G C K T S S R
Ccaccattctcaaacacccatggttttctgcggtgaaatgtgaacgtatatggggaaaacgta
aatctacgtgaacacacagtagtaataaaactcaaaaatggtgaagtattcagaagtacat
gtactttattgaaatagttttactggttttactaattgatgggttagaaaacttgatacatgt
acacgtaagcccatattttagagctagacaatatcatctaataacttcgctcactataaagat
cttttttaacgtaaatacatccagagtttagaattgaaagagaaataattacagcacacaca
caagacagattgggtcaattggtttgtacattaatctctatttttaactttatgacaac
ggtgcaacggcacaaaagaagtctaattgtgagaatcataacgtgacgatctaaggagccc
atacaacaatcaaatacatagacctctgagaaaatcaaacacaatatagggttaggtcactg
acaagtacatttgcatgtaggtattacggttacggatacgggtggatagtgcaaataacatag
cgcatactatttgcgcaatcatccggctagtttaaaaagatctggtggcagaacctgagta
ataagattagaatctaacacagcgcgaatgtttcgctaataagaacatttgccccacctgat
gagtacatttgtagacatatttctttttgtattttttaatttcttttaagactgaacattat
ctaacaacaagacaaaattccaactgaaatataaatatagtttttaataaaaatatggttt
ttatttttcagag**aacagtacagaaaaatgcccaagtacgtatgtttggccgagaagaac**
T V Q K N A K Y V C L A E K N
tgcccagtagacaaacgacggagaaataggtgncaactctgcaggctc
C P V D K R R R N R C Q L C R L

Figura 21. Sequência do provável receptor nuclear NR1PP. O exon contém a sequência do “dedo de zinco” de receptor nuclear (vermelho) e está separado por um íntron de 840 pb (preto). A sequência de aminoácidos (azul) está representada sob os respectivos códons.

H. Sapiens	CQHYGVRTCEGCKGFFKRTVQKNAKYVCLANKNCPVDKRRRNRCQYCRFQ
R. norvegicus	CQHYGVRTCEGCKGFFKRTVQKNAKYVCLANKNCPVDKRRRNRCQYCRFQ
X. laevis	CQHYGVRTCEGCKGFFKRTVQKNAKYICLANKDCPVDKRRRNRCQYCRFQ
P. perna	-----CEGCKT-SSRTVQKNAKYVCLAEKNCPVDKRRRNRCQLCRL-
D. melanogaster	CQHYGVRTCEGCKGFFKRTVQKGSKYVCLADKNCPVDKRRRNRCQFCRFQ
C. elegans	CLHYGARTCEGCKGFFKRTVQKNSKYTCAGNKTCPIDKRYRSRCQYCRYQ

*****_ *****_ **_* *:*_*_*** *_*** **

Figura 22. Comparação entre a seqüência do fragmento do gene do receptor nuclear de *Perna perna* (NR1PP) com seqüências de *Homo sapiens* (receptor nuclear órfão NR42), *Rattus norvegicus* (receptor nuclear NOR-2), *Xenopus laevis* (receptor órfão NURR1), *Drosophila melanogaster* (receptor nuclear HR38), *Caenorhabditis elegans* (NHR6- receptor nuclear hormonal CNR 8), utilizando o programa ClustalW EMBL. (*) aminoácidos iguais, (.) aminoácidos diferentes mas com mesmas características, (:) aminoácidos diferentes com características diferentes.

Após a identificação da seqüência obtida do fragmento NR1PP homóloga ao “zinc-finger” de receptores nucleares órfãos, esta seqüência foi depositada no banco de dados do GeneBank sob o número de acesso AF 312271. Esta é a primeira descrição de um íntron no mexilhão *Perna perna*.

Digestão do fragmento NR1PP

Foi realizado inicialmente um teste de digestão enzimática (mapa de restrição) do fragmento NR1PP através da utilização do Programa BioEdit. Este programa localiza dentro de uma seqüência possíveis sítios de restrição para uma série de enzimas, indicando os prováveis locais de clivagem da seqüência (Figura 23).

Com os dados obtidos foi realizada a digestão enzimática do fragmento NR1PP, com a escolha de enzimas sendo baseada no mapa gerado pelo programa. Foram escolhidas enzimas que teoricamente não cortavam o fragmento e enzimas que cortariam. O padrão de digestão observado em gel de agarose correspondeu aos sítios previstos com as respectivas enzimas (Figura 24).

Restriction table:

Enzyme	Recognition	frequency	Positions
AccI	GT'mk_AC	1	920
AflIII	A'CryG_T	3	179, 238, 244
AlwNI	CAG_nnn'CTG	1	663
ApoI	r'AATT_y	1	807
BanII	G_rGCy'C	1	486
BceFI	ACGGCnnnnnnnnnn'n_n	1	449
BciVI	GTATCCnnnnn_n'	1	573
BglII	A'GATC_T	2	301, 647
BmrI	ACTGGG	1	916
BsaAI	yAC'GTr	3	129, 247, 891
BsaBI	GATnn'nnATC	1	679
BseMII	CTCAGnnnnnnnn_nn'	2	501, 652
BspI286I	G_dGCh'C	1	486
BspLU11I	A'CATG_T	2	179, 238
BsrI	ACTG_Gn'	1	913
BsrDI	GCAATG_nn'	1	701
BsrGI	T'GTAC_A	3	241, 389, 741
BstYI	r'GATC_y	2	301, 647
Cac8I	GCn'nGC	1	955
CjePI	GAnnnnnnnnTGnnnnnnnn_nnnnnn'	1	124
CjePI	CCAnnnnnnnTCnnnnnnnn_nnnnnn'	1	84
DraI	TTT'AAA	2	642, 837
DrdI	GACnn_nn'nnGTC	1	375
EaeI	y'GGCC_r	1	899
FokI	GGATGnnnnnnnnn'nnnn_	2	310, 618
FspI	TGC'GCA	1	623
GdiIII	C'GGCC_r	1	902
HpyI78III	TCnnGA	1	325
MboII	GAAGAnnnnnnnn_n'	2	10, 918
MmeI	TCCrACnnnnnnnnnnnnnnnnnn_nn'	1	836
MnlI	CCTCnnnnnn_n'	1	520
MslI	CAYnn'nnrTG	1	560
MunI	C'AATT_G	1	380
NgoGV	GGnnCC	1	483
NlaIV	GGn'nCC	1	483
NspI	r_CATG'y	3	183, 242, 565
PstI	C_TGCA'G	1	955
SfaNI	GCATCnnnnn'nnnn_	1	51
SfcI	C'TryA_G	1	951
SnaBI	TAC'GTA	1	891
TatI	w'GTAC_w	8	176, 182, 241, 389, 552, 733, 741
			870
TspRI	_nnCAsTGnn'	1	550
Tth111III	CAArCAnnnnnnnnn_nn'	4	88, 507, 539, 882
VspI	AT'TA_AT	1	395

Enzymes that cut five or fewer times

Enzyme	Recognition	frequency	Positions
AccI	GT'mk_AC	1	920
AflIII	A'CryG_T	3	179, 238, 244
AlwNI	CAG_nnn'CTG	1	663
ApoI	r'AATT_y	1	807
BanII	G_rGCy'C	1	486
BceFI	ACGGCnnnnnnnnnn'n_n	1	449
BciVI	GTATCCnnnnn_n'	1	573

BglIII	A'GATC_T	2	301, 647
BmrI	ACTGGG	1	916
BsaAI	yAC'GTr	3	129, 247, 891
BsaBI	GATnn'nnATC	1	679
BseMII	CTCAGnnnnnnn_nn'	2	501, 652
BspI286I	G_dGCh'C	1	486
BspLU11I	A'CATG_T	2	179, 238
BsrI	ACTG_Gn'	1	913
BsrDI	GCAATG_nn'	1	701
BsrGI	T'GTAC_A	3	241, 389, 741
BstYI	r'GATC_y	2	301, 647
Cac8I	GCn'nGC	1	955
CjePI	GAnnnnnnnnTGGnnnnnnn_nnnnnn'	1	124
CjePI	CCAnnnnnnnnTCnnnnnnnnn_nnnnnn'	1	84
DraI	TTT'AAA	2	642, 837
DrdI	GACnn_nn'nnGTC	1	375
EaeI	y'GGCC_r	1	899
FokI	GGATGnnnnnnnnn'nnnn_	2	310, 618
FspI	TGC'GCA	1	623
GdiIII	C'GGCC_r	1	902
Hpy178III	TCnnGA	1	325
MboII	GAAGAnnnnnnnn_n'	2	10, 918
MmeI	TCCrACnnnnnnnnnnnnnnnnnnn_nn'	1	836
MnlI	CCTCnnnnnn_n'	1	520
MslI	CAynn'nnrTG	1	560
MunI	C'AATT_G	1	380
NgoGV	GGnnCC	1	483
NlaIV	GGn'nCC	1	483
NspI	r_CATG'y	3	183, 242, 565
PstI	C_TGCA'G	1	955
SfaNI	GCATCnnnnn'nnnn_	1	51
SfcI	C'TryA_G	1	951
SnaBI	TAC'GTA	1	891
TspRI	_nnCAsTGnn'	1	550
Tth111III	CAArCAnnnnnnnnnn_nn'	4	88, 507, 539, 882
VspI	AT'TA_AT	1	395

Enzymes that do not cut:

AarI, AatIII, AceIII, AclI, AflIII, AhdI, AloI, AlwI, ApaI, ApaLI, AscI, AvaI, AvrII, BaeI, BamHI, BanI, BbsI, BbvI, BbvCI, Bce83I, BcgI, BcgI, BclI, BglI, BmgIBpI, BplI, BpmI, Bpu10I, Bpu1102I, BsaI, BsaHI, BsaJI, BsaWI, BsaXI, BsbI, BseRI, BseSI, BsgI, BsiEI, BsiHKAI, BslI, BsmI, BsmAI, BsmBI, BsmFI, Bsp24I, Bsp24I, BspEI, BspGI, BspMI, BsrBI, BsrFI, BssHII, BssSI, BstAPI, BstDSI, BstEII, BstXI, BstZ17I, Bsu36I, BtrI, BtsI, CjeI, CjeI, ClaI, DraIII, DrdII, EagI, EarI, EciI, Eco47III, Eco57I, EcoNI, EcoO109I, EcoRI, EcoRV, FauI, FseI, HaeI, HaeII, HaeIV, HgaI, HgiEII, Hin4I, HincII, HindIII, HpaI, HphI, KpnI, MluI, MscI, MspAI, MwoI, NarI, NcoI, NdeI, NgoAIV, NheI, NotI, NruI, NsiI, NspV, PacI, Pfl1108I, PflMI, PinAI, PleI, PmeI, PmlI, PpiI, PshAI, PsiI, Psp5II, PvuI, PvuII, RcaI, RleAI, RsrII, SacI, SacII, SalI, SanDI, SapI, SbfI, ScaI, SexAI, SfiI, SgfI, SgrAI, SmaI, SmlI, SpeI, SphI, SrfI, Sse8647I, SspI, Sth132I, StuI, StyI, SunI, SwaI, TaqII, TaqII, Tth111I, XbaI, XcmI, XhoI, XmnI

Figura 23 . Mapa de restrição previsto do fragmento NR1PP, analisado no Programa BioEdit.

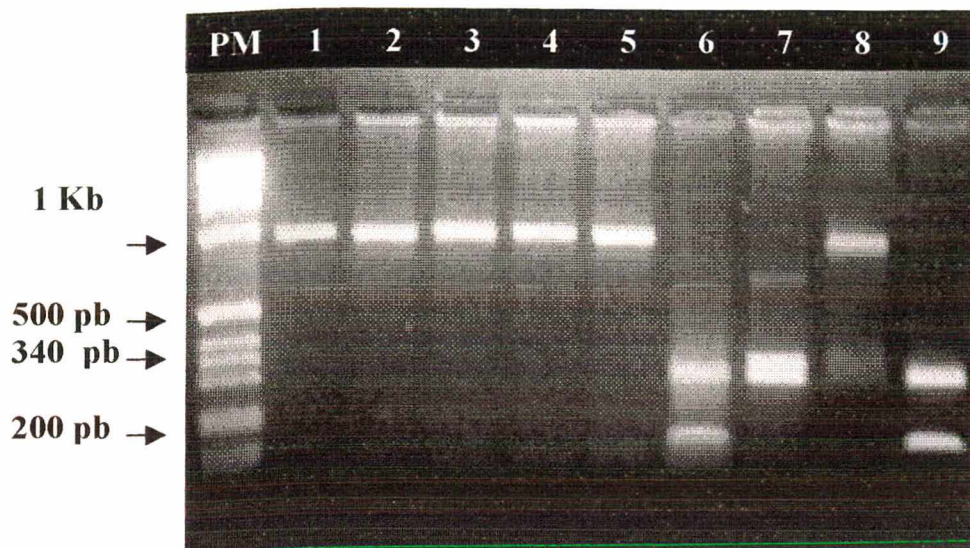


Figura 24. Análise em gel de agarose 1,5%, mostrando a digestão com enzimas de restrição do fragmento NR1PP. Gel de agarose mostrando as enzimas que não clivaram o fragmento EcoRI (2), EcoRV (3), BamHI (4), HindIII (5) e as enzimas que clivaram o DNA Sau3AI (6), BglIII (7), AluI (8) e MboI (9). Controle sem enzima (1) e PM padrão de peso molecular 1 Kb Ladder, Gibco, BRL.

Após as duas digestões foi observado que o padrão de restrição visualizado no gel era compatível com o mapa de restrição previsto pelo programa. A utilização do programa para prever possíveis sítios de restrição é uma ferramenta de fácil utilização que além da criação de um mapa de restrição da sequência, fornece dados para a utilização de enzimas de restrição no estudo de uma determinada sequência. Este procedimento da digestão foi importante para a escolha das enzimas que seriam utilizadas para realização do Southern Blot, mais precisamente para digestão do DNA genômico de *Perna perna*.

Southern Blot

Após a identificação do fragmento NR1PP como uma sequência homologa ao dedo de zinco de receptor nuclear órfão, o fragmento de 1 Kb correspondente ao NR1PP foi marcado com fosfatase alcalina para ser utilizado como sonda para detecção de genes homólogos à receptores nucleares no mexilhão *Perna perna*.

O DNA genômico foi digerido com enzimas de restrição (Figura 25), este DNA foi então transferido para uma membrana de nylon e foi realizada a hibridização com a Sonda NR1PP (Figura 26). Foram produzidas várias membranas com diferentes amostras de DNA, onde foi possível observar o mesmo padrão de hibridização em diferentes membranas. Pelo fato de não conhecermos a sequência inteira do gene do receptor nuclear NR1PP, para analisar o padrão de hibridização em nossos testes nos baseamos nos teste anteriores de clivagem do gene NR1PP.

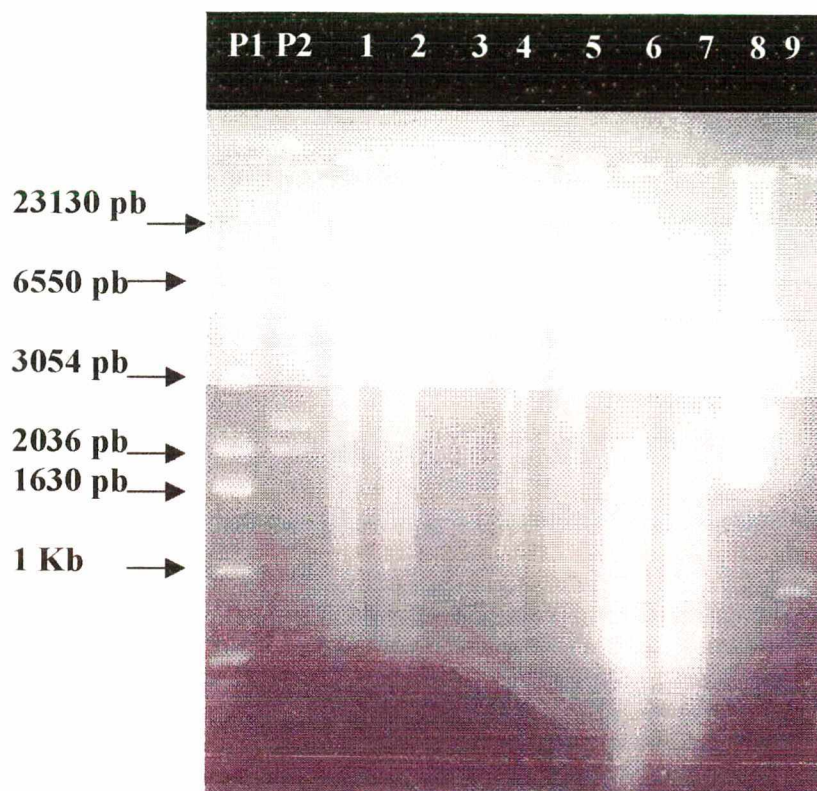


Figura 25. Digestão do DNA genômico de *Perna perna*. Foram utilizadas para digestão as enzimas EcoRI (1), HindIII (2), BamHI (3), EcoRV (4), BglII (5), AluI (6), MboI (7). Para servirem como controles positivos da reação foram aplicados no gel o clone pNR1PP (8) e o fragmento NR1PP (9). Os padrões de peso molecular 1 Kb Ladder (P1) e Lambda DNA Eco/Hind (P2), além de servirem marcadores, foram usados como controle negativo da hibridização.

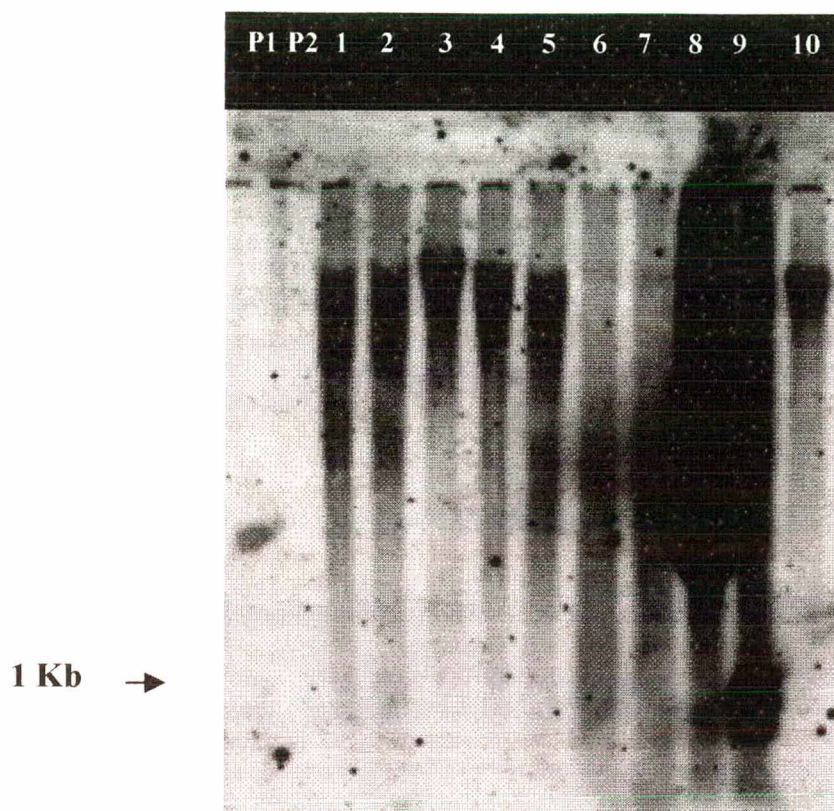


Figura 26. Hibridização com a Sonda NR1PP. Revelação do filme de Raio X mostrou que a Sonda foi capaz de hibridizar com os controles do clone pNR1PP(8) e do fragmento NR1PP (9) e com o DNA genômico não digerido (10). As amostras digeridas com as enzimas que cortavam o fragmento de 1Kb do receptor nuclear: EcoRI (1), HindIII (2), BamHI (3), EcoRV (4) ; e que não cortam o fragmento, BglII (5), AluI (6), MboI (7) são correspondentes as amostras visualizadas na figura 25. Observa-se que a sonda não encontrou homologia com os DNA de peso molecular usados como controle.

Através da hibridização foi verificado que a sonda NR1PP construída reconhece regiões complementares no DNA do mexilhão *Perna perna*. Nas amostras digeridas existe um rastro que pode ser devido a digestão parcial do DNA ou a estringência utilizada na reação de hibridização.

Mesmo com o rastro observado, foi possível a visualização de algumas bandas, em determinados tratamentos com enzimas, que tiveram seu tamanho estimado (Tabela 2). Para melhorar a visualização de tais bandas serão necessários outros testes em diferentes condições de hibridização como: variação da temperatura de hibridização e de lavagem da membrana, otimização da concentração de sonda, tempo de exposição ao filme de raio-X, concentração de sal nas soluções.

ENZIMA	TAMANHO ESTIMADO BANDAS
HindIII	5900 pb; 3850 pb
EcoRI	5900 pb; 3850 pb
BglII	14000 pb; 3340 pb; 2830
AluI	3340 pb; 2800 pb
MboI	3340 pb; 2800 pb

Tabela 2. Tamanho dos fragmentos estimados com base na hibridização, hibridizados com sonda NR1PP.

4.2.2 Amplificação e Clonagem de Genes de Receptores Nucleares a Partir do RNA

Transcrição Reversa – Síntese do cDNA

Com o intuito de confirmar o sítio de processamento do provável receptor nuclear NR1PP, foi realizada a síntese de cDNA, a partir do RNA total extraído do mexilhão *Perna perna*.

A síntese do cDNA foi realizada utilizando-se como iniciador da síntese o iniciador H7, que já havia sido utilizado para amplificação do DNA genômico, e também foi utilizado um Oligo dT que inicia a síntese de cDNA a partir da cauda poli A do RNA mensageiro. Após a síntese do cDNA este, foi amplificado utilizando-se os iniciadores H2/H7 e seguindo as mesmas condições descrita para a amplificação do DNA genômico (Figura 27).

O resultado da amplificação mostrou, além do tamanho esperado de aproximadamente 120 pb, fragmentos de 220 pb. O tamanho de 120 era o esperado pois já foram descritas seqüências de dedos de zinco em receptores nucleares, com o mesmo tamanho de pares de bases, como por exemplo, em *C. elegans*, *T. cystophora* (KOUSTROCH *et al.* 1995; KOSTROUCH *et al.*, 1998).

Além disso, quando analisamos a seqüência do fragmento NR1PP, que foi obtido a partir do DNA genômico, ao ser removida a seqüência correspondente ao íntron, a leitura da seqüência correspondente ao exon têm 120 pb.

O fato dos fragmentos de PCR terem sido visualizados com uma única

amplificação foi uma surpresa, visto que em trabalhos descritos anteriormente os fragmentos são visualizados após uma reamplificação (KOUSTROCH *et al.* 1995; KOSTROUCH *et al.*, 1998). O cDNA sintetizado com oligo dT não apresentou sinal de amplificação.

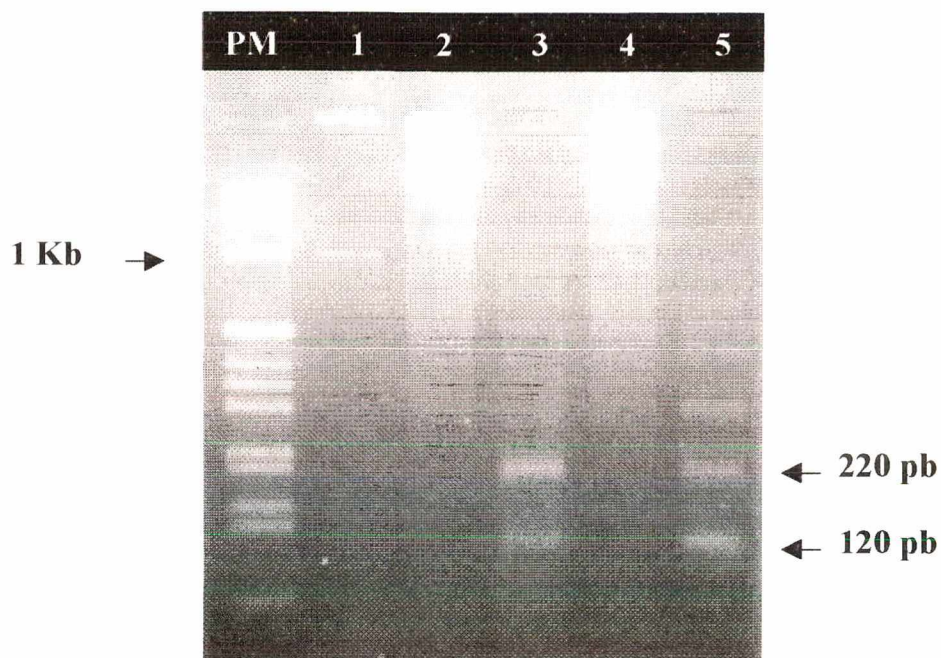


Figura 27. Gel de agarose 2% mostrando a amplificação do cDNA utilizando iniciadores H2 e H7 para amplificação do receptor nuclear. Observa-se um fragmento do tamanho esperado de 120 pb (3 e 4). As amostras em que foi utilizado Oligo dT para a síntese de cDNA não obtivemos um fragmento do tamanho esperado (2 e 4). O controle da amplificação foi o DNA genômico de *Perna perna*, que mostrou o fragmento e 1 Kb. PM corresponde padrão de peso molecular.

Purificação do produto de PCR e isolamento do fragmento de 120 pb

Os fragmentos foram purificados inicialmente por precipitação com etanol, entretanto, somente foram obtidos clones com o fragmento de 220 pb. Por este motivo foi realizado o isolamento e purificação do fragmento de 120 pb a partir do gel de agarose com a utilização de resina de sílica (dados não mostrados). Apesar da concentração do fragmentado de 120 pb obtida através deste método ser pequena, a amostra foi utilizada para a clonagem.

Clonagem

Os fragmentos obtidos foram clonados em vetores pUC18 SmaI. As colônias positivas foram selecionadas e foi realizada a extração do DNA plasmidial em pequena e grande escala.

Amplificação dos fragmentos clonados

Foi realizada uma reação de PCR com os clones obtidos para verificar a presença dos fragmentos, confirmando a clonagem. Tanto para os clones do fragmento de 120 pb quanto para os de 220 pb foi realizada uma PCR com os iniciadores H2 e H7, conforme descrito anteriormente. Os resultados obtidos nesta reação estão mostrado a seguir. (Figura 28 e 29).

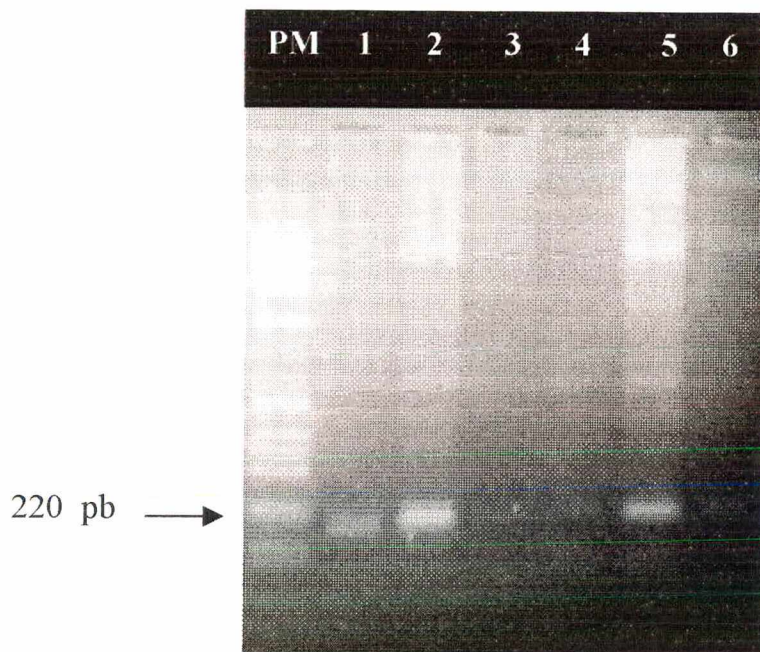


Figura 28. Gel de agarose 2 %. Amplificação dos clones obtidos com o fragmento de 220 pb (1 a 6). O padrão de peso molecular 1 Kb Ladder Plus, Gibco BRL, está indicado por PM.

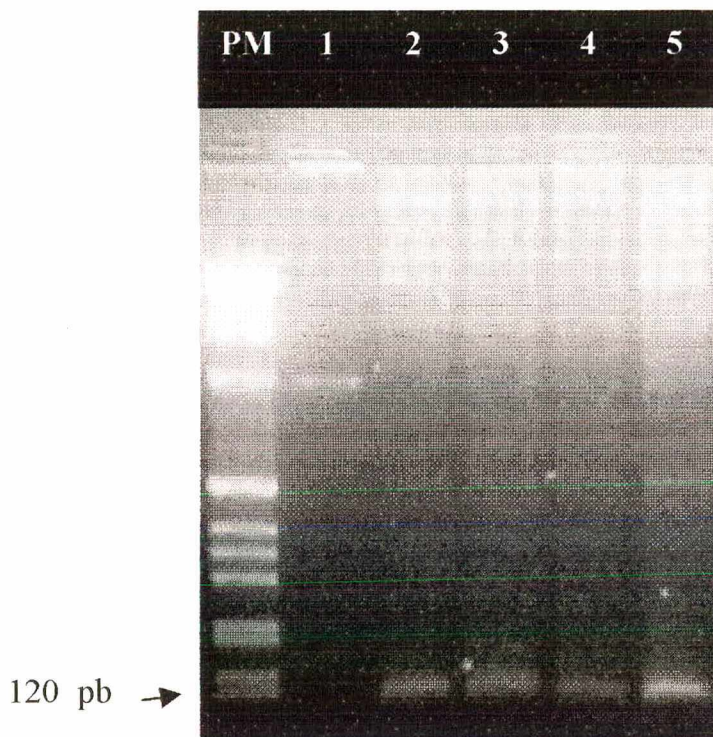


Figura 29. Gel de agarose 2%. Amplificação dos clones contendo o fragmento de 120 pb (2 a 5). Como controle da amplificação utilizamos o DNA genômico de *Perna perna* (1) que amplificou um fragmento de 1Kb. PM é o padrão de peso molecular 1 Kb Ladder Plus

Com a realização da reação de amplificação dos clones foram identificados os clones positivos. No entanto, não podemos afirmar que os fragmentos de 120 e de 200 pb correspondam a um único gene, pois podem estar sendo amplificados diferentes genes de receptores nucleares com o mesmo tamanho de bases. Isto devido a utilização de iniciadores degenerados possibilita a amplificação de vários genes de uma família gênica, neste caso, de receptores nucleares, cada clone obtido foi nomeado individualmente.

Foram obtidos 11 clones contendo o fragmento de 220 pb e foram denominados a partir de pNR12PP até pNR22PP. Os 10 clones obtidos contendo o fragmento de 120 pb foram denominados pNR23PP até pNR32PP.

4.2.2.1. Sequenciamento

Alguns clones de 120 pb foram sequenciados manualmente utilizando-se o sistema SILVER SEQUENCE DNA Sequencing System, Promega em nosso laboratório, através da detecção por coloração com prata. Vários programas para a reação de sequenciamento foram testados em diferentes amostras. Inicialmente foi utilizado o programa Seq-2, mas foram detectadas regiões de compressão e bandas nas quatro canaletas migrando na mesma altura, tornando impossível a leitura.

Foi utilizado o programa Seq-3 que apresentou melhores resultados, mas somente duas seqüências foram lidas com clareza, aquelas dos clones pNR26PP (dados não mostrados) e pNR30PP (Figura 30). Foram feitas várias tentativas para

sequenciar outros clones, no entanto não foi possível repetir o sequenciamento dos clones pNR30PP e pNR26.

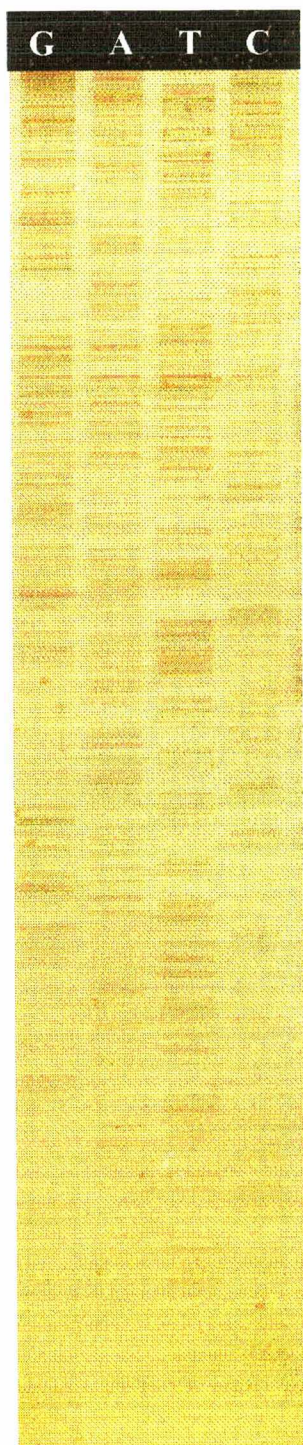


Figura 30. Gel de sequenciamento corado com nitrato de prata. Sequência do clone pNR30PP.

4.2.2.2. ANÁLISE DAS SEQÜÊNCIAS DO FRAGMENTO DE 120 pb (NR26PP)

As seqüências obtidas do clone pNR26 pelo sequenciamento manual e pelo sequenciamento automático foram analisadas conjuntamente. Inicialmente foram removidas as partes das seqüências que faziam parte do Vetor de clonagem utilizando-se o programa VecScreen (www.ncbi.nlm.nih.gov). A seqüência correspondente ao fragmento de 120 pb clonado foi então, empilhada no programa BioEdit (HALL, 1999).

Após a obtenção de uma seqüência consenso criada através do programa BioEdit, foi realizada a tradução desta seqüência pelo programa Translate (www.expasy.ch) (Figura 31). A seqüência do fragmento NR26PP quando comparada com o banco de dados do GenBank através do programa BLAST, mostrou homologia com receptores nucleares alfa de hormônio tireoideano de humanos, rato, camundongo entre outros (dados não mostrados). Mesmo não tendo a seqüência completa do fragmento NR26PP, a análise da seqüência mostrou se tratar de um provável receptor nuclear e assim este fragmento de 120 pb foi purificado para construção de uma sonda.

Para a análise da seqüência do fragmento NR30PP foram realizados os mesmos procedimentos que os utilizados para o fragmento NR26PP. Estamos aguardando a chegada do sequenciador automático do projeto GENOPAR, ao qual estamos vinculados, para confirmar todas as seqüências deste trabalho.

```

tgcgaggggttgcaaaaacttcttcggaacatcaaataatttgacagtttgatattt
  C E G C K T S S E H Q I F D S L Y F
tgatcactgtctatctctataagacatattaagtacatgccgactatgacaggc
  D H C L S L * D I L S T C R L C R
tccagaaatgt
L Q K C

```

Figura 31. Seqüência provável do “zinc finger” do receptor nuclear NR26PP (vermelho) obtida a partir do cDNA de mexilhão *Perna perna*. A seqüência de aminoácidos (azul) está representada sob os respectivos códons. Um stop códon (*) pode ser observado na seqüência, que pode ser devido a uma falha do sequenciamento.

Northern Blot

A partir do clone pNR26PP foi purificado o fragmento de 120 pb (NR26PP), homólogo ao receptor nuclear alfa de hormônio tireoideano, que foi marcado com fosfatase alcalina. A sonda molecular NR26PP foi construída para identificar o RNA mensageiro que codifica para o gene NR26PP. Amostras de RNA foram aplicadas em um gel de formaldeído e transferidas para uma membrana de nylon. Após a hibridização com a sonda NR26PP a membrana foi exposta a uma filme de Raio-x, mas não foi detectado sinal da sonda.

Alguns fatores poderiam estar impossibilitando a visualização do sinal da sonda. Como a expressão diferencial de receptores nucleares em diferentes tecidos já foi descrita em vários trabalhos (STUNNENBERG, 1993), este gene poderia não estar sendo expresso nos tecidos de brânquia de onde foi extraído o RNA (SCEARCE *et al.*, 1993). Além disso, também já foi descrito que a expressão do gene pode variar em diferentes fases do ciclo de vida como descrito por Nakajima e colaboradores (NAKAJIMA *et al.*, 2000) e em *C. elegans* por Kostrouch e colaboradores (KOSTROUCH *et al.*, 1995).

No entanto como o fragmento de 120 pb foi amplificado a partir do cDNA, originado da transcrição reversa do RNA, significa que este gene está sendo expresso no tecido de brânquia. E como através da técnica de PCR ocorre uma amplificação exponencial do número de cópias da seqüência alvo, o gene correspondente a seqüência NR26PP pôde ser detectado no gel de agarose mesmo

estando, supostamente, sendo expresso em níveis não detectados por Northern Blot.

4.2.3. RACE – Amplificação Rápida das Extremidades 5' e 3' do cDNA

Com o objetivo de obter o gene completo do receptor nuclear, foi realizada a técnica de RACE (Kit GeneRACE, Promega). Para isso além dos iniciadores degenerados, foram construídos iniciadores RACE H2 e RACE H7, menos degenerados, baseados na sequência do fragmento NR1PP.

Após a síntese do cDNA, as amostras foram amplificadas utilizando-se o programa GeneRace no termociclador. Foram utilizados iniciadores para a amplificação tanto no sentido 5' quanto 3' do gene. Quando as amostras foram aplicadas no gel de agarose os produtos visualizados apresentaram bandas fracas de tamanhos variáveis entre 800 e 1600 pb (Figura 32). As amostras amplificadas com as combinações de iniciadores Race H2/ Race H7 e H2 /H7, não amplificaram, talvez por causa do programa de amplificação utilizado que difere do programa EDG2 utilizado normalmente para amplificação do receptor nuclear.

Foram utilizados iniciadores mais internos dos adaptadores ligados às extremidades do cDNA, para o “nested PCR” e as amostras aplicadas em gel de agarose onde foram visualizadas bandas de tamanhos variando entre 300 a 1600 pb (dados não mostrados). As amostras com as combinações de iniciadores Race H2/ Race H7 e H2 /H7, não apresentaram bandas novamente.

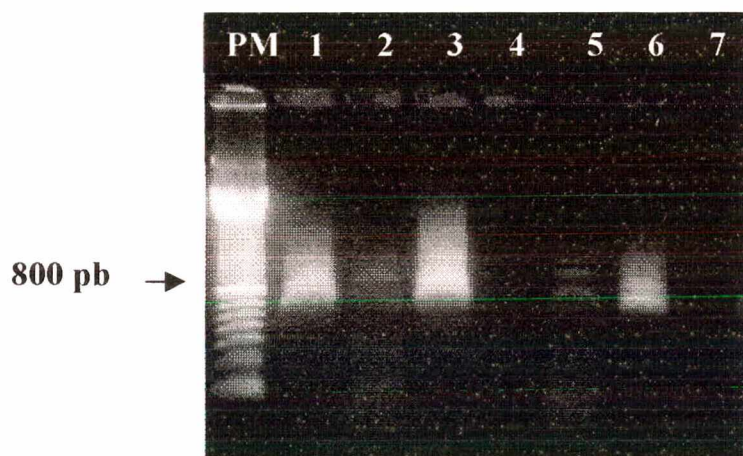


Figura 32. Gel de agarose 1,5%. Amplificação do cDNA sintetizado com o kit Gene RACE, Promega. Foram utilizadas as combinações de iniciadores Race 5/Race H7 (1); Race H2/ Race 3' (2); Race 5'/Race 3' (3); Race H2/Race H7 (4); H2/Race 3' (5); Race 5'/H7 (6) e H2/H7. Foi utilizado o padrão de peso molecular 100 pb, Gibco.

Purificação dos produtos de amplificados por “Nested PCR”

Os produtos de PCR das amostras que apresentaram bandas no gel, foram purificados com o um kit utilizando uma membrana de sílica Concert Rapid PCR Purification System, GIBCO, BRL, Life Technologies.

4.2.3.1. Clonagem

As amostras purificadas da amplificação com os iniciadores Race H2/ Race 3'; H2/Race 3'; Race 5'/Race 3'; Race 5'/H7 foram clonadas no Vetor pGEM-T Easy. Após a transformação, as colônias positivas foram selecionadas e foi realizada a extração do DNA plasmidial em pequena e em grande escala.

Digestão dos clones

Os clones foram digeridos com enzima de restrição EcoRI. Esta enzima cliva o DNA plasmidial do Vetor pGEM-T Easy em dois locais no sítio de clonagem, liberando o inserto clonado. As amostras foram analisadas no gel de agarose 1 %. A figura 33 mostra a digestão de somente alguns dos clones (Figura 33).

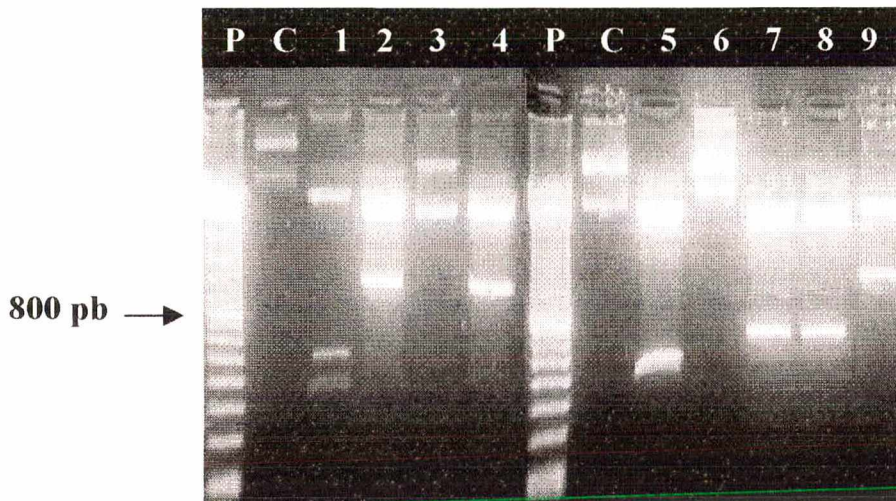


Figura 33. Gel de agarose 1 %. Digestão dos clones amplificados a partir do cDNA sintetizado pelo kit GeneRace . P é o padrão de peso molecular 100 pb, Gibco e C é o controle do DNA plasmidial não digerido. As amostras digeridas com EcoRI (1 a 9) apresentaram bandas de tamanhos variáveis de 300 pb a 1100 pb.

Amplificação dos fragmentos clonados

Foi realizada a reação de PCR com o DNA plasmidial dos clones e foram utilizados os iniciadores que inicialmente deram origem ao fragmento clonado. As amostras foram analisadas em gel de agarose 1,5% (Figura 34 e 35).

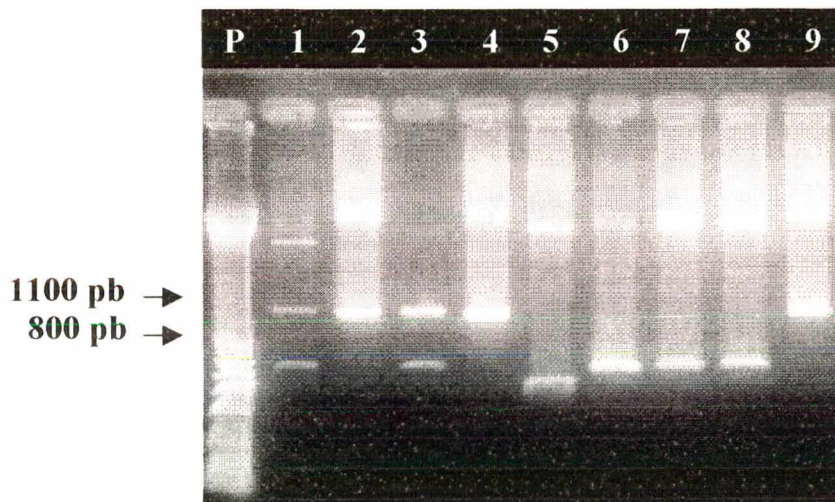


Figura 34. Gel de agarose 1,5%. Reação de PCR dos clones obtidos pela técnica de RACE, amplificados com os iniciadores Race H2/Race 3'Nested (1 a 9). Padrão de peso molecular 100 pb, Gibco (P).

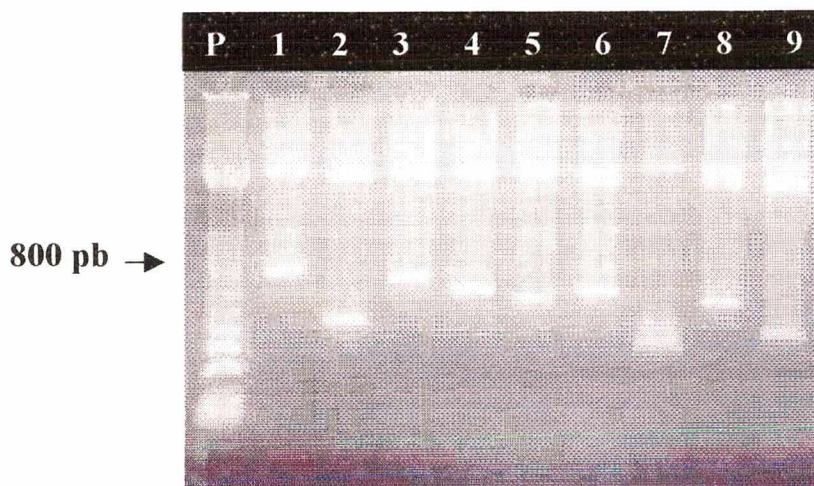


Figura 35. Gel de agarose 1,5%. Reação de PCR dos clones obtidos pela técnica de RACE, amplificados com os iniciadores Race 5'Nested/Race 3'Nested (1 a 5) e Race 5'Nested/H7. Padrão de peso molecular 100 pb, Gibco (P).

Após a confirmação da presença dos fragmentos clonados, os clones foram denominados como mostra a tabela 3.

CLONES	FRAGMENTO CLONADO (pb)	ORIGEM
pNR33PP	500	Race 3'/H2
pNR34PP	1100	Race 3'/H2
pNR35PP	1100	Race 3'/H2
pNR36PP	1100	Race 3'/H2
pNR37PP	450	Race 3'/H2
pNR38PP	500	Race 3'/H2
pNR39PP	650	Race 3'/H2
pNR40PP	1300	Race 3'/H2
pNR41PP	1300	Race 3'/H2
pNR42PP	1300	Race 3'/H2
pNR43PP	1300	Race 3'/H2
pNR44PP	1300	Race 3'/H2
pNR45PP	1300	Race 3'/H2
pNR46PP	1300	Race 3'/H2
pNR47PP	800	Race 5'/ Race 3'
pNR48PP	450	Race 5'/ Race 3'
pNR49PP	700	Race 5'/ Race 3'
pNR50PP	600	Race 5'/ Race 3'
pNR51PP	500	Race 5'/ Race 3'
pNR52PP	600	Race 5'/ Race 3'
pNR53PP	300	Race 5'/H7
pNR54PP	600	Race 5'/H7
pNR55PP	450	Race 5'/H7
pNR56PP	600	Race 5'/H7
pNR57PP	400	Race 5'/H7
pNR58PP	450	Race 5'/H7

Tabela 3. Clones derivados da amplificação do cDNA sintetizado com o kit Gene RACE. Origem significa a combinação de iniciadores que foram utilizados para produzir o fragmento.

4.2.3.2. SEQUENCIAMENTO

O sequenciamento automático foi realizado somente em algumas amostras, e as leituras não apresentaram uma boa qualidade, sendo necessária a repetição do sequenciamento futuramente.

Somente as seqüências dos clones pNR39PP e pNR54PP foram lidas e mostraram homologia com fator de transcrição da RNA Polimerase II de vários organismos (dados não apresentados). Estas seqüências foram amplificadas pois o iniciador Race 5' apresenta grande complementaridade com a seqüência deste gene, servindo tanto de iniciador "sense" como "antisense".

O sequenciamento manual foi realizado com os clones obtidos da amplificação com Race 5'/H7.

Os dados são preliminares e aguardamos a chegada do sequenciador automático do Projeto GENOPAR, ao qual nosso laboratório está vinculado.

4.3. METALOTIONEÍNA

O estudo de identificação de genes da metalotioneína no mexilhão *Perna perna*, foram realizadas em colaboração com o estudante de iniciação científica Guilherme Razzera Maciel.

Foram utilizadas amostras de DNA genômico de diferentes tecidos para a reação de amplificação. A partir de reações de PCR feitas com iniciadores MTC1 e MTC2, foram amplificados fragmentos de diversos tamanhos (Figura 36).

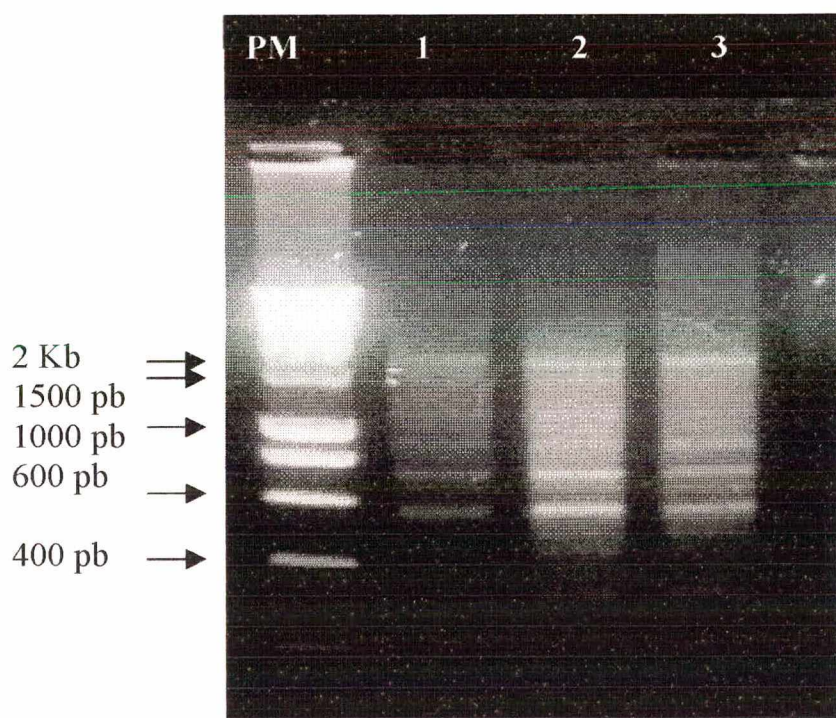


Figura 36. Gel de agarose 1,5%, mostrando o resultado da amplificação a partir do DNA genômico extraído de manto (1) e brânquia (2 e 3) de diferentes espécimes de *Perna perna*, onde observa-se a amplificação de vários fragmentos. PM= Smart Ladder, Amersham Pharmacia.

O tamanho do gene que codifica para metalotioneína é de aproximadamente 216 pb (ENGELKEN e HILDEBRANDT, 1999). No entanto, como a amplificação foi realizada a partir de DNA genômico é de se esperar que sejam obtidos fragmentos maiores, como ocorreu em nosso experimento. Isto porque, podem existir íntrons no gene da metalotioneína em moluscos como já descritos por Khoo e Patel (KHOO e PATEL, 1999) o que explicaria a visualização de fragmentos de até 2 kb no gel. Além disso, pode existir mais de um gene que codifica para metalotioneína em *Perna perna*, e a amplificação pode corresponder a amplificação simultânea de mais de um gene. Khoo e Patel descreveram duas isoformas do gene da metalotioneína em *Perna viridis*, que diferem entre si por apresentarem regiões promotoras diferentes e ambas possuem dois íntrons que diferem em tamanho e esta característica poderia estar presente em *Perna perna*.

Além dos fragmentos de 1500 pb e 2 Kb, foram visualizados fragmentos de tamanhos menores. Ao comparar os locais de hibridização do iniciador “antisense” MCT2 com outros organismos, principalmente o mexilhão *Perna viridis*, vimos que este iniciador poderia amplificar fragmentos de 2Kb, 1500 pb, 650bp e 450bp aproximadamente (KHOO e PATEL, 1999), pois a seqüência que corresponde aos aminoácidos CKC do iniciador, se repete ao longo do gene. Assim todos esses fragmentos menores seriam derivados da amplificação de regiões internas da seqüência do fragmento maior de 2 Kb o qual seria correspondente a toda seqüência que codifica o gene da metalotioneína em *Perna perna*.

O fragmento maior, de 2 Kb, foi então, isolado do gel de agarose e purificado para a realização uma reamplificação onde esperávamos que fosse obtido um padrão de amplificação semelhante ao mostrado na figura 36. Os fragmentos menores que 2 Kb iriam aparecer como derivados da amplificação de regiões mais internas do fragmento de 2 Kb que é o tamanho esperado da amplificação do gene de metalotioneína. O padrão visualizado no gel após a reamplificação foi igual ao padrão visualizado na amplificação do DNA genômico, como mostra a figura 37.

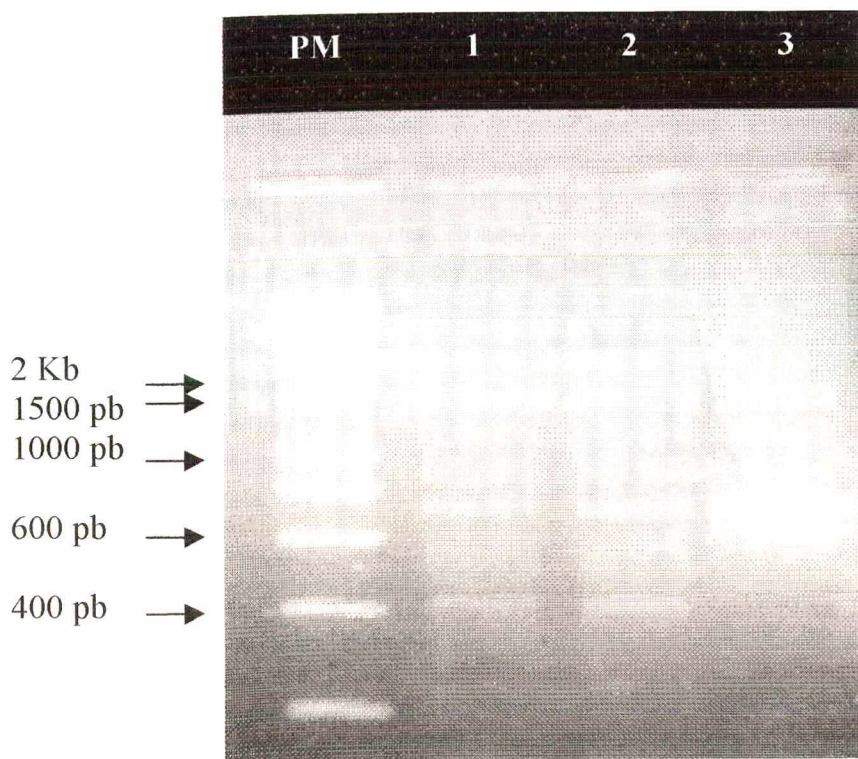


Figura 37. Gel de agarose 1,5% mostrando a reamplificação do fragmento de 2 Kb (1 e 2). O padrão de bandas observadas é semelhante ao da amplificação do DNA genômico. PM é o padrão de peso molecular e (3) controle da amplificação.

Os produtos da reamplificação foram então clonados em um vetor pUC 18/SmaI. Foram obtidos 6 clones e para a confirmação da clonagem, foi realizada uma PCR com o DNA dos clones com os iniciadores MTC1 e MTC2. Ao serem analisados em gel de agarose (dados não mostrados) somente 2 clones foram positivos. Estes clones apresentaram fragmentos de 1500 pb e 2 Kb em um dos clones e no outro clone um fragmentos de aproximadamente 1 Kb. Além destes fragmentos também puderam ser observados fragmentos menores, como esperado, uma vez que a partir de fragmentos maiores é possível a amplificação de regiões internas da seqüência de metalotioneína.

Os clones foram nomeados pMT1 e pMT2 (MT- metalotioneína). Os resultados obtidos levam a crer que realmente se trata de um provável gene de metalotioneína, pelos motivos descritos anteriormente. O sequenciamento destes clones será realizado quando da chegada do sequenciador MegaBACE do Projeto GENOPAR (Dr. Fábio Pedrosa - UFPR).

4.4. PROTEÍNA G

A identificação de RNAm codificando subunidades α da proteína G foi realizada através da transcrição reversa do RNA. Foram utilizados iniciadores degenerados OMP20 e OMP21 descritos por Strathmann e colaboradores (STRATHMANN *et al.*, 1989) referentes a extremidade 3' do domínio de ligação a GTP, da subunidade α da proteína G, para obtenção do cDNA. Após a transcrição foi realizada uma reação de PCR onde foram utilizados além dos iniciadores OMP 20 e OMP 21, os iniciadores “sense” OMP 41 e OMP 19. Os tamanhos de fragmentos esperados, segundo Strathmann e colaboradores (STRATHMANN *et al.*, 1989) seriam de aproximadamente 215 pb com a combinação de iniciadores OMP41 e OMP20 ou OMP21 e de 190 pb com OMP19 e OMP20 ou OMP21.

A análise em gel de agarose dos produtos de PCR mostrou fragmentos de tamanho aproximado aos esperados (Figura 38). As amostras 1, 3 (cDNA de brânquia) e 5 (cDNA de manto) mostram o mesmo tamanho de fragmento apesar do iniciador “antisense” ser diferente, pois estes iniciadores apesar de degenerados são complementares à mesma seqüência na mesma posição. O iniciador “sense” OMP19, produz fragmentos de 190 pb, por ser complementar a uma seqüência mais “interna” do gene, em relação ao iniciador “sense” OMP41 que produz fragmentos de 215 pb (cDNA de manto).

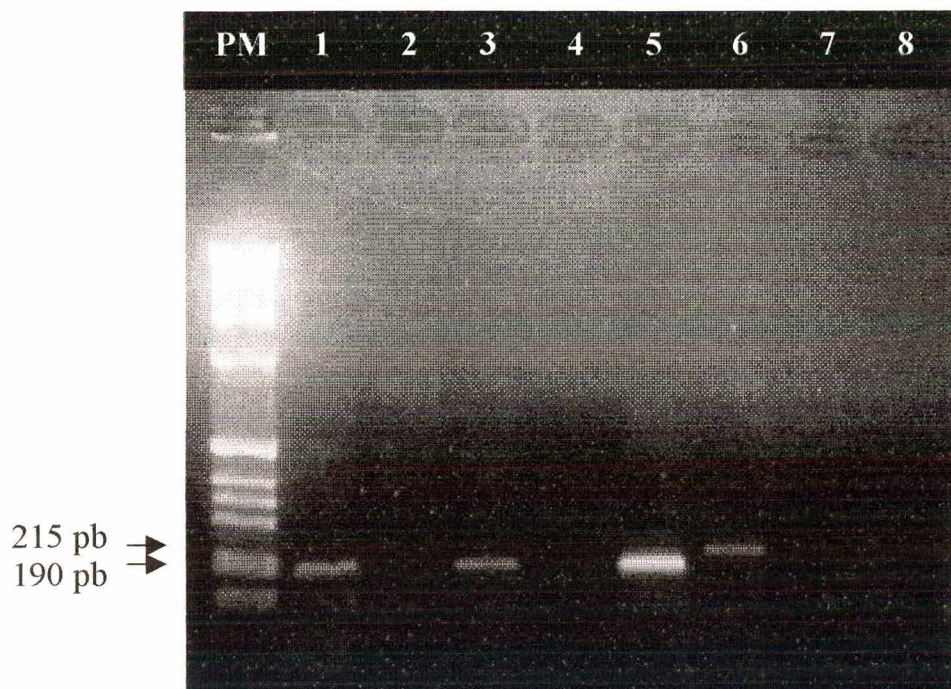


Figura 38. Gel de agarose 2 % mostrando a amplificação obtida a partir do cDNA, da subunidade α da proteína G. Fragmento de 190 pb utilizando os iniciadores OMP19 e OMP20 (1 e 5) e OMP19 e OMP21 (3). Fragmento 215 pb obtido com os iniciadores OMP41 e OMP20 (6). PM= 1 Kb Ladder Plus, Gibco BRL.

As amostras de cDNA que não amplificaram, 2 e 4, são amostras de brânquia de indivíduos diferentes e foram utilizados para amplificação com os iniciadores OMP41/OMP20 e OMP41/OMP21, respectivamente. Como o iniciador “sense” é o fator comum nestas duas amostras, podemos levantar duas hipóteses. Primeiramente, que este iniciador não tenha encontrado complementaridade no tecido analisado, uma vez que a seqüência deste iniciador apresenta pequenas diferenças quando comparado com o iniciador OMP 19. No entanto como o iniciador OMP41 amplificou o cDNA de manto, podemos sugerir a não expressão ou a expressão em níveis muito baixos deste gene na brânquia de mexilhões. Esta diferença de expressão entre tecidos diferentes já foi demonstrada em camundongos (STRATHMANN *et al.*, 1989) e em diferentes estágios de vida de *Neurospora grassa* (TURNER e BORKOVICH, 1993).

Os fragmentos obtidos nas amostras 5 e 6 (Figura 38) foram precipitados com etanol e clonados. Após a clonagem, foi realizada a extração de DNA plasmidial e este DNA amplificado foi clivado com enzimas de restrição (dados não mostrados) para confirmar a presença do inserto. Os clones da amostra 5 apresentam, além do fragmento esperado de 190 pb um fragmento de 380 pb, coincidentemente o dobro do tamanho esperado (Figura 39).

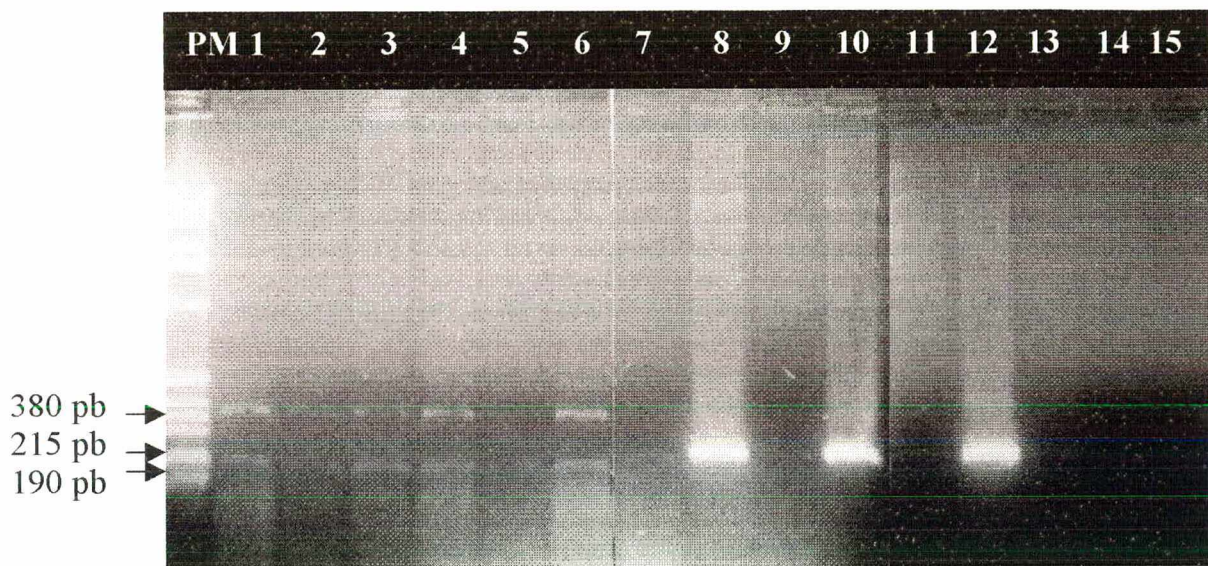


Figura 39. Gel de agarose 2 % mostrando a amplificação dos clones com OMP19/OMP20 (1 a 7) e OMP41/OMP20 (8 a 15). O iniciador “antisense” foi o mesmo utilizado para preparação do cDNA inicialmente. PM é o padrão de peso molecular.

O fragmento de 380 pb pôde ter sido gerado, se durante o processo de clonagem dois fragmentos de 190 pb foram ligados entre si e este fragmento contendo duas seqüências clonado no vetor. Isto possibilitou que na amplificação do clone fossem amplificados fragmentos dos dois tamanhos: 190 pb correspondente a uma seqüência e de 380 pb correspondente a amplificação de duas seqüências ligadas uma a outra e clonadas. Nos clones originados da amostra 6 somente o fragmento de 215 pb foi visualizado, e alguns clones foram negativos, isto é, não continham o inserto (Figura 39, linhas 9, 11, 14 e 15).

No total foram obtidos 8 clones do fragmento de 190 pb (pPG1 a pPG8) 4 clones do fragmento de 215 (pPG8, pPG10, pPG12 e pPG13). Os clones foram nomeados como pPG (PG= Proteína G) e em seguida o número referente a posição no gel da Figura 39.

Os clones obtidos correspondem ao tamanho de fragmento esperado da subunidade α da proteína G. No entanto é necessário que seja realizado o sequenciamento para confirmar as seqüências dos fragmentos clonados. Além disso, como foram utilizados iniciadores degenerados existe a possibilidade de que diferentes seqüências de mesmo tamanho correspondentes a diferentes subunidades α da proteína tenham sido clonadas. Isto porque existem várias subunidades α em um mesmo indivíduo, que podem estar sendo expressas simultaneamente. Em mamíferos, por exemplo, já foram descritas 17 seqüências para a subunidade α da Proteína G (TURNER e BORKOVICH, 1993).

5. CONCLUSÕES

Nossos resultados demonstraram que a seqüência NR1PP clonada a partir do DNA genômico do mexilhão *Perna perna* possui grande homologia ao domínio “zinc finger” de receptores nucleares órfãos. Esta seqüência está depositada no GenBank sob o número de acesso AF312271. Também foi identificado nesta seqüência genômica um íntron, que é a primeira seqüência de um íntron descrita para o mexilhão *Perna perna*. A localização deste íntron dentro do domínio do “zinc finger” é corroborada por seqüências de receptores nucleares órfãos já descritas (GUO *et al.*, 1996; CASTILLO *et al.*, 1997; TARRI *et al.*, 1999) que possuem o íntron na mesma posição, após o P-Box do primeiro dedo de zinco. A partir da identificação do fragmento NR1PP como sendo um fragmento de um receptor nuclear órfão, sintetizamos uma sonda molecular para detecção do gene do receptor nuclear.

Foi identificada através do sequenciamento do fragmento NR26PP, uma seqüência homóloga a receptores nucleares alfa de hormônio tireoideano. O fragmento NR26PP foi marcado com fosfatase alcalina para construção de uma sonda para identificação do RNA mensageiro que codificaria o gene do receptor nuclear alfa de hormônio tireoideano. A sonda construída, denominada sonda NR26PP, não produziu sinal para detecção do RNAm. Em trabalhos para identificar receptores nucleares através do Northern Blot, os pesquisadores têm utilizado sondas marcadas radiativamente e com exposição prolongada (KOSTROUCH *et al.*, 1995)

ou realizando Southern Blot após a amplificação do cDNA (NAKAJIMA *et al.*, 2000).

Através da amplificação do DNA genômico do mexilhão *Perna perna* utilizando os iniciadores degenerados MTC1 e MTC2, foram obtidos fragmentos de tamanho correspondente ao esperado para o gene da metalotioneína. Sendo que o fragmento de 2 Kb deve corresponder à amplificação do gene inteiro da metalotioneína (KHOO e PATEL, 1999). Os fragmentos clonados estão aguardando para serem sequenciados.

Com a utilização de iniciadores degenerados foi amplificada a região de ligação de GTP de uma subunidade α de Proteína G do mexilhão *Perna perna*. Os fragmentos clonados, de 190 pb e 215 pb, correspondem ao tamanho de fragmento resultante da amplificação da seqüência da subunidade α obtido em outros organismos (STRATHMANN *et al.*, 1989). Os fragmentos clonados estão aguardando para serem sequenciados quando da chegada do sequenciador do projeto GENOPAR, ao qual nosso laboratório está vinculado.

Os dados obtidos neste trabalho poderão servir, futuramente, de base para realização de projetos de desenvolvimento de técnicas de biologia molecular para detecção de efeitos de exposição ao estresse. Assim como já foram desenvolvidos, modelos de detecção por técnicas de biologia molecular para detecção de alterações de expressão, risco de exposição a xenobióticos, como o PCR quantitativo e teste do gene reporter (MEEK, 1998; VANDEN HEUVEL e DAVIS, 1999).

Além disso, esperamos estimular outros grupos de trabalho a desenvolver pesquisas a nível molecular referentes ao mexilhão *Perna perna* não somente pela importância científica de ampliar os dados referentes à espécie mas pela importância econômica e social em nosso estado que representa.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K. e WATSON, J.D. 1997. *Biologia Molecular da Célula*. 3^a edição. Editora Artes Médicas Sul, Porto Alegre, RS.
- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHÄFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W. e LIPMAN, D.J.. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research** **25**: 3389-3402, 1997.
- ALTUCCI, L. e GRONEMEYER, H. Nuclear receptors in cell life and death. **Trends in Endocrinology & Metabolism** **12**: 460-468, 2001.
- ANOLIK, J.H.; KLINGE, C.M.; HILF, R. e BANBARA, R.R. Cooperative binding of estrogen receptor to DNA depends on spacing of binding sites, flanking sequence and ligand. **Biochemistry** **34**:2511-2520, 1995.
- AQUINI, E. N., FERREIRA, J. F., MAGALHÃES, A. R. M. Density Of *Perna perna* Mussels (Bivalvia: Mytilidae) At Santa Catarina Island, Brazil.. **Journal Of Medical & Applied Malacology** **8**: 155-155, 1996.
- AUSUBEL, F.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D.D.; SEIDMAN, J.G., SMITH, J.A. e STRUHI, K. *Short Protocols in Molecular Biology*. 3^a Edição. Editora Wiley, 1995.
- BAINY, A.C.D. e MARQUES, M.R.F. Expressão do complexo citocromo P4501A e de metalotioneína na avaliação da contaminação aquática. In: **Efeito de poluentes em organismos marinhos**. 1^a ed. São Paulo: Arte Ciência Villipress, 2001.
- BAINY, A.C.D.; ALMEIDA, E.A.; MULLER, I.C.; VENTURA, E.A. e MEDEIROS, I.D. Biochemical responses in farmed mussel *Perna perna* transplanted to contaminated sites on Santa Catarina Island, SC, Brazil. **Marine Environment Research** **50**: 441-416, 2000.

- BARD, S.M. Multixenobiotic resistance as a cellular defense mechanism in aquatic organisms. **Aquatic Toxicology** **48**: 357-389, 2000.
- BARRACO, M.A.A.M., MEDEIROS, I.D. e MOREIRA, F.M. Some hemato-immunological parameters in the mussel *P. perna*. **Fish and Shellfish Immunology** **9**: 387-404, 1999
- BASSAM, B.J.; CAETANO-ANOLLES, G. e GRESSHOFF, P.M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. **Anal. Biochem.** **196**: 80- 83, 1991.
- BAUDRIMONT, M.; ANDRÉS, S.; METIVAUD, J.; LAPAQUELLERIE, Y.; RIBEYRE, F.; MAILLET, N.; LATOUCHE, C. e BOUDOU, A . Field transplantation of the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* along a polymetallic contamination gradient (River Lot, France): II. Metallothionein response to metal exposure. **Environmental Toxicology and Chemistry** **18**: 2472-2477, 1999.
- BAYNE, B.L. Measuring the biological effects of pollution: the mussel watch approaches. **Water Science Technology** **21**: 1089-1100, 1989.
- BJARNASON, B.; CHIMUKA, L.; ÖNNERFJORD, P.; EREMIN, S.; JÖNSSON, J.A.; JOHANSSON, G. e EMNÉUS, J. Enzyme flow immunoassay using a protein G column for the screening of triazine herbicides in surface and waste water. **Analytica Chimica Acta** **426**: 197-207, 2001.
- BOLHUIS, H.; VAN VEEN, H.W.; POOLMAN, B.; DRIENSSSEN, A.J.M. e KONINGS, W.N. Mechanisms of multidrug transporters. **FEMS Microbiology Reviews** **21**:55-84, 1997.
- BOLOGNESI, C.; LANDINI, E.; ROGGIERI, P; FABBRI, R. e VIARENGO, A Genotoxicity biomarkers in the assessment of heavy metal effects in mussels: experimental studies. **Environ. Mol. Mutagen.** **33**: 287-292, 1999.
- CASTILLO, S.O; XIAO, Q.; LYU, M.S.; KOZAK, C.A. e NIKODEM, V.M. Chromosomal localization and promoter identification of the mouse orphan nuclear receptor Nurr1 gene. **Genomics** **41**: 250-257, 1997.

- CLAPHAM, D.E. The G-protein nanomachine. **Nature** **379**: 297-299, 1996.
- CORMIER, S.M.; LIN, E.L.C.; MILLWARD, M.R.; SHUBAUER, M.K., WILLIAMS, D.E.; SUBRAMANIAN, B.; SANDERS, R.; COUNTS, B. e ALTFATER, D. Using regional exposure criteria and upstream reference data to characterize spatial and temporal exposures to chemical contaminants. **Environ. Toxicol. and Chem.** **19**: 1127-1135, 2000.
- CORNWALL, R.; TOOMEY, B.H.; BARD, S.; BACON, C.; JARMAN, W.M. e EPEL, D. Characterization of multixenobiotic/multidrug transport in the gills of the mussel *Mytilus californianus* and identification of environmental substrates. **Aquatic Toxicology** **31**:277-296, 1995.
- COSTA, S. W; GRUMANN, A.; OLIVEIRA NETO, F. M. de O. e ROCKZANSKI, M. **Cadeias Produtivas do Estado de Santa Catarina: aquicultura e pesca. Florianópolis: EPAGRI**, 62p. (EPAGRI. Boletim Técnico, 97), 1998.
- DESSAUER, C.W.; TESMER, J.J.G; SPRANG, S.R. e GILMAN, A .G. Identification of a G α binding site on type V Adenylyl Cyclase. **Journal of Biological Chemistry.** **273**: 25831-25839, 1998.
- ENGELKEN, J. AND HILDEBRANDT, A. cDNA cloning and cadmium-induced expression of metallothionein mRNA in the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. **Biochem. Cell Biol.** **77**: 237-241, 1999.
- EPAGRI. (Online) Disponível na Internet via: www.epagri.rct-sc.br/polomar. Arquivo capturado em 12/10/2000.
- FIELDEN, M.R.; WU, Z.F.; SINAL, C.J.; JURY, H.H.; BEND, J.R.; HAMMOND, G.L. e ZACHAREWSKI, T.R. Estrogen receptor- and aryl hydrocarbon-mediated activities of a coal-tar creosote. **Environ. Toxicol. and Chem.** **19**:1262-1271, 2000.
- FISK, A.T.; TOMY, G.T.; CYMBALISTY, C.D. e MUIR, D.C.G. Dietary accumulation and quantitative structure-activity relationships for depuration and biotransformation of short, medium and long carbon-chain polychlorinated

- alkanes by juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Environm. Toxicol. And Chem.** **19**: 1508-1516, 2000.
- FREITAS, M., FERREIRA, J. F., MAGALHÃES, A. R. M. Cultivated Marine Mussel Growth In Southern Brazil.. **Journal Of Medical & Applied Malacology** **8**: 156 - 156, 1996.
- GALGANI, F.; CORNWALL, R.; TOOMEY, B.H. AND EPEL, D. Interaction of environmental xenobiotics with a multixenobiotic defense mechanism in the bay mussel *Mytilus galloprovincialis* from the coast of California. **Environ. Toxicol. and Chem.** **5**: 325-331, 1996.
- GRIMM, E.D.; TERENCE, M.F.; GOLDMAN, G.H.; BAINY, A.C.D. e TERENCE, H. Identification of homologs of the mammalian P-glycoprotein in the mussel *Perna perna*. **Marine Environmental Research** **50**: 331-335, 2000.
- GUO, W.; BURRIS, T.P.; ZHANG, Y.H.; HUANG, B.L.; MASON, J.; COPELAND, K.C.; KUPFER, S.R.; PAGON, R.A. e MCCABE, E.R. Genome sequence of the DAX-1 gene: an orphan nuclear receptor responsible for X-linked adrenal hypoplasia congenita and hypogonadotropic hypogonadism. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** **81**: 2481-2486, 1996.
- HAHN, M.E. The Aryl hydrocarbon receptor: A comparative perspective. **Comparative Biochemistry and Physiology**, **121**: 23-53, 1998.
- HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Acids Symp.** **41**: 95-98, 1999.
- HERNÁNDEZ, J.; CARRASCO, J.; BELLOSO, E.; GIRALT, M.; BLUETHMANN, H.; LEE, D.K.; ANDREWS, G.K. e HIDALGO, J. Metallothionein induction by restraint stress: Role of glucocorticoids and IL-6. **Cytokine** **12**: 791-796, 2000.
- HOFMANN, G. AND SOMERO, G.N. Evidence for protein damage at environmental temperatures: seasonal changes in levels of ubiquitin conjugates and Hsp70 in the intertidal mussel *Mytilus trossulus*. **Journal of Experimental Biology** **198**: 1509-1518, 1995.

- HSU, M.H., PALMER, C.N.A.; SONG, W., GRIFFIN, K.J. e JOHNSON, E.F.. A carboxyl-terminal extension of the zinc finger domain contributes to the specificity and polarity of peroxisome proliferator-activated receptor DNA binding. **Journal of Biological Chemistry** **273**: 27988-27997, 1998.
- IKEDA, M.; HIROKAWA, M.; SATANI, N.; KINOSHITA, T.; WATANABE, Y.; INOUE, H.; TONE, S.; ISHIKAWA, T. e MINATOGAWA, Y. Molecular cloning and characterization of a steroid receptor-binding regulator of G-protein signaling protein cDNA. **Gene** **273**: 207-214, 2001.
- KHOO, H.W. e PATEL, K.H. Metallothionein cDNA, promoter, and genomic sequences of the tropical green mussel *Perna viridis*. **Journal of Experimental Zoology** **284**: 445-453. 1999.
- KHORASANIZADEH, S. e RASTINEJAD, F. Nuclear-receptor interactions on DNA-response elements. **Trends in Biochemical Sciences** **26**: 384-390, 2001.
- KOLACZKOWSKI, M.; KOLACZKOWSKA, A.; LUCZYNSKI, J. e WITEK, S. In vivo characterization of the drug resistance profile of the major ABC transporters and other components of the yeast pleiotropic drug resistance network. **Microbial Drug Resistance** **4**: 143-158, 1998.
- KOSTROUCH, Z.; KOSTROUCHOVA, M. e RALL, J.E. Steroid/thyroid hormone receptor genes in *Caenorhabditis elegans*. **Proc. Natl. Acad. Sci.** **92**:156-159, 1995.
- KOSTROUCH, Z.; KOSTROUCHOVA, M.; LOVE, W.; JANNINI, E. e RALL, J.E. Retinoic acid X receptor in the diploblast, *Tripedalia cystophora*. **Proc. Natl. Acad. Sci.** **95**:13442-13447, 1998.
- KUMAR, M.B.; TARPEY, R.W. e PERDUO, G.H. Differential recruitment of coactivator RIP 140 by Ah and estrogen receptors. **Journal of Biological Chemistry** **274**:22155-22164, 1999.
- KUZNETSOVA, L.; PLESNEVA, S.; DERJABINA, N.; OMELJANIUK, E. e PERTSEVA, M. On the mechanism of relaxin action: the involvement of adenylyl cyclase signaling system. **Regulatory Peptides** **80**: 33-39, 1999.

- LEMON, B. e TJIAN, R. Orchestrated response: a symphony of transcription factor for gene control. **Genes & Development** 14: 2551-2569, 2000.
- LICHTARGE, O; BOURNE, H.R. e COHEN, F.E. Evolutionarily conserved G $\alpha\beta\gamma$ binding surfaces support a model of the G protein-receptor complex. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 93: 7507-7511, 1996.
- LINDER, M.W.; FALKNER, K.C.; SRINIVASAN, G.; HINES, R.N. e PROUGH, R.A. Role of canonical glucocorticoid responsive elements in modulating expression of genes regulated by the aryl hydrocarbon receptor. **Drug Metabolism Review** 31:241-247, 1999.
- MAGALHÃES, A. R. M., SILVA, P. M., FERREIRA, J. F. Infestation Of *Perna perna* Mussels (Bivalvia: Mytilidae) By Digenetic Trematodes Of The Family Bucephalidae, Bucephalus Genus In Brazil. **Journal Of Medical & Applied Malacology** 8: 25 - 25, 1996.
- MANGELSDORF, D.J. e EVANS, R.M.. The RXR heterodimers and orphan receptors. **Cell** 83: 841-850, 1995.
- MANGELSDORF, D.J.; THUMMEL, C.; BEATO, M.; HERRLICH, P.; SCHUTZ, G.; UMESONO, K.; BLUMBERG, B.; KASTNER, P.; MARK, M.; CHAMBON, P. e EVANS, R.M. The nuclear receptor superfamily: the second decade. **Cell** 83:835-839, 1995.
- MEEK, M.D. Ah receptor and estrogen receptor-dependent modulation of gene expression by extracts of diesel exhaust particles. **Environmental Research** 79: 114-121, 1998.
- MEEK, M.D. AND FINCH, G.L. Diluted mainstream cigarette smoke condensates activate estrogen receptor and aryl hydrocarbon receptor-mediated gene transcription. **Environmental Research** 80: 9-17, 1999.
- MIYAMOTO, T.; KAKIZAWA, T.; ICHIKAWA, K.; NISHIO, S.; TAKEDA, T.; SUZUKI, S.; KANEKO, A.; KUMAGAI, M.; MORI, J.; YAMASHITA, K.; SAKUMA, T. e HASHIZUME, K. The role of hinge domain in

- heterodimerization and specific DNA recognition by nuclear receptors. **Molecular and Cellular Endocrinology** 181:229-238, 2001.
- MORRIS, A.J. e MALBON, C.C. Physiological regulation of G protein-linked signaling. **Physiological Review** 79: 1373-1440, 1999.
- MULLER, I.C.; GABILAN, N.H.; MARQUES, M.R.F. e BAINY, A.C.D. Identification of metal binding proteins in the mussel *Perna perna* exposed to cadmium. In: **XXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular**. Caxambu, 2000.
- NAKAJIMA, T.; TAKASE, M.; MIURA, I. e NAKAMURA, M. Two isoforms of FTZ-F1 messenger RNA: molecular cloning and their expression in the frog testis. **Gene** 248: 203-212, 2000.
- NARBONNE, J.F.; DAUBEZE, M. e CLERANDEAU, C. Scale of classification based on biochemical markers in mussels: application to pollution monitoring in European coasts. **Biomarkers** 4: 415-424, 1999.
- NGUYEN, T.T.; HOIVIK, D.; LEE, J.E. e SAFE, S. Interactions of nuclear receptor coactivator/corepressor proteins with the aryl hydrocarbon receptor complex. **Archives of Biochemistry and Biophysics** 367:250-257, 1999.
- OHKURA, N.; ITO, M.; TSUKADA, T.; SASAKI, K.; YAMAGUCHI, K. e MIKI, K. Structure, mapping and expression of a human NOR-1 gene, the third member of the Nur77/NGFI-B family. **Biochim. Biophys. Acta** 11: 205-214, 1996.
- PADRÓS, J.; PELLETIER, E.; READER, S e DENIZEAU, F. 2000. Mutual in vivo interactions between benzo[a]pyrene and tributyltin in brook trout (*Salvelinus fontinalis*). **Environ. Toxicol. and Chem.** 19:1019-1027.
- REMONDELLI, P.; MOLTEDO, O.; PASCALE, M.C. e LEONE, A. Metal regulation of metallothionein gene transcription in mammals. In: **Copper transport and its disorders**. Leone & Mercer Editors. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, USA. Pp. 223-236, 1999.

- RHODES, L.D. e VAN BENEDEN, R.J. Gene expression analysis in aquatic animals using differential display polymerase chain reaction. **In: Techniques in aquatic toxicology**. Lewis Publishers. CRC Press. pp. 686, 1996.
- RIOS, C.B.; JORDAN, B.A.; GOMES, I. e DEVI, L.A. G-protein-coupled receptor dimerization: Modulation of receptor function. **Pharmacology & Therapeutics 91**: 1-17, 2001.
- ROTCHHELL, J.M.; LEE, J.O.; CHIPMAN, J.K. e OSTRANDER, G.K. Structure, expression and activation of fish ras genes. **Aquatic Toxicology 55**: 1-21, 2001.
- SAMBROOK, J.; FRITSH, E.F. e MANIATIS, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2^a edição. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1986.
- SANDVIK, M.; HORSBERG, T.E.; SKAARE, J.U. e INGEBRIGTSEN, G. Comparison of dietary and waterborne exposure to benzo[a]pyrene: bioavailability, tissue disposition and CYP1A1 induction in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Biomarkers 3**: 399-410, 1998.
- SASSI, D.; KLETSAS, D. e OTTAVIANI, E. Interactions of signaling pathways in ACTH (1-24)-induced cell shape changes in invertebrate immunocytes. **Peptides 19**: 1105-1110, 1998.
- SCEARCE, L.M.; LAZ, T.M.; HAZEL, T.G.; LAU, L.F. e TAUB, R. RNR-1, a nuclear receptor in the NGFI-B/Nurr77 family that is rapidly induced in regenerating liver. **Journal of Biological Chemistry 25**: 8855-8861, 1993.
- SHAW, J.P.; LARGE, A.T.; CHIPMAN, J.K.; LIVINGSTONE, D.R. e PETERS, L.D. Seasonal variation in mussel *Mytilus edulis* digestive gland cytochrome P4501A- and 2E-immunoidentified protein levels and DNA strand breaks (Comet Assay). **Marine Environmental Research 50**: 405-409, 2000.
- SILVA, P.M.; MAGALHÃES, A.R.M. e BARRACCO, M.A.A.M. Effects of *Bucephalus* sp. (Trematoda:Bucephalidae) on the reproductive tissue and immune system of *Perna perna* mussels, from a culture station in Ratonas Grande Island. **J. Invert. Pathol.** 2002. (in press)

- SMITAL, T. e KURELEC, B. The chemosensitizers of multixenobiotic resistance mechanism in aquatic invertebrates: a new class of pollutants. **Mutation Research** **399**:43-53, 1998.
- STEGEMAN, J.J. Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. **In: Biomarkers: biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress.** Hugget, RJ; Kimerle, RA; Mehrle Jr, PP & Bergman, HL. Eds. Lewis Publishers. Pp 235-335, 1992.
- STRATHMANN, M.; WILKIE, T.M. e SIMON, M.I. Diversity of the G-protein family: Sequences from five additional α subunits in the mouse. **Proc. Natl. Acad. Sci.** **86**:7407-7409, 1989.
- STUNNENBERG, H.G. Mechanisms of transactivation by retinoic acid receptors. **BioEssays** **15**: 309-315, 1993.
- SUNAHARA, R.W.; TESMER, J.J.G.; GILMAN, A.G. e SPRANG, S.R. Crystal Structure of the Adenylyl Cyclase Activator Gs alpha. **Science**, **278**: 1943, 1997.
- TANGUAY, R.L.; ABNET, C.C.; HEIDEMAN, W. e PETERSON, R.E. Cloning and characterization of the zebrafish (*Danio rerio*) aryl hydrocarbon receptor. **Biochimica et Biophysica Acta** **1444**: 35-48, 1999.
- TARRI, T.; KAWARAI, T.; NAKAMURA, S. e KAWAKAMI, H. Organization of the human orphan nuclear receptor Nurr1 gene. **Gene** **230**: 225-232, 1999.
- TAUSSIG, R e GILMAN, A. G. Mammalian Membrane-bound Adenylyl Cyclases. **Journal of Biological Chemistry** **270**: 1-4, 1995.
- TERENZI, H.; ALZARI, P. e ZAKIN, M.M.. Structural features involved in the formation of a complex between the monomeric or the dimeric form of Rev-erb beta DNA-binding domain and its DNA reactive sites. **Biochemistry** **37**: 11488-11495, 1998.

- TESMER, J.J.G.; SUHARA, R.W.; GILMAN, A.G. e SPRANG, S.R. Crystal Structure of the Catalytic Domains of Adenylyl Cyclase in a Complex with Gs alpha GTP-gamma S. **Science**, **278**: 1907-1916, 1997.
- TSAI, M.J. e O'MALLEY, B.W. Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. **Annual Review of Biochemistry** **63**:451-486, 1994.
- TURNER, G.E. e BORKOVICH, K.A. Identification of a G Protein α subunit from *Neurospora crassa* that is a member of the Gi Family. **Journal of Biological Chemistry** **268**: 14805-14811, 1993.
- URNOV, F.D. e WOLFFE, A.P. A Necessary Good: Nuclear hormone receptors and their chromatin templates. **Molecular Endocrinology** **15**: 1-16, 2001.
- VANDEN HEUVEL, J.P. e DAVIS, J.W. Molecular approaches to identify exposure and risk to specific environmental pollutants. **Biomarkers** **4**:93-103, 1999.
- VIARENGO, A.; BURLANDO, B.; CVALETTI, M.; MARCHI, B.; PONZANO, E. e BLASCO, J. Role of metallothionein against oxidative stress in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. **Am. J. Physiol.** **277**: 1612-1619, 1999.
- WALKER, C.H.; HOPKIN, S.P.; SIBLY, R.M. e PEAKALL, D.B. **Principles of Ecotoxicology**. Taylor & Francis Publishers. 321 pp. , 1996.
- ZILLIACUS, J.; DAHLMAN, K.; WRIGHT, A.; GUSTAFSSON, J. e CARLSTEDT-DUKE, J. DNA binding specificity of mutant glucocorticoid receptor DNA-binding domains. **Journal of Biological Chemistry** **266**: 3101-3106, 1991.