

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA**

Thiago Bruce Rodrigues

**EXPRESSÃO DO GENE DA AMINOLEVULINATO SINTASE
(*ALAS*) NA OSTRÁ *Crassostrea gigas* EXPOSTA À ESGOTO
DOMÉSTICO**

Florianópolis
2007

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA**

Thiago Bruce Rodrigues

**EXPRESSÃO DO GENE DA AMINOLEVULINATO SINTASE
(*ALAS*) NA OSTRÁ *Crassostrea gigas* EXPOSTA À ESGOTO
DOMÉSTICO**

Orientadora: Profa. Dra. Maria Risoleta Freire Marques

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

Florianópolis
2007

Sumário

Resumo	III
Abstract	VI
1. Introdução	1
1.1. A contaminação ambiental	1
1.2. Esgoto doméstico	4
1.3. A importância dos recursos marinhos	9
1.4. Biomonitoramento	10
1.5. Genes diferencialmente expressos: a busca por biomarcadores moleculares	13
1.6. A enzima 5- aminolevulinato sintase	15
2. Objetivos	22
3. Materiais e métodos	23
3.1- Coleta e manutenção dos animais	23
3.2 - Exposição ao esgoto doméstico	24
3.3- Obtenção dos tecidos	24
3.4- Clonagem dos fragmentos de cDNA diferencialmente expressos	24
3.5- Purificação do plasmídeo para seleção dos clones	26
3.6- Seqüenciamento e análise das seqüências	26
3.7- Iniciadores	26
3.8- Extração do RNA total	27
3.9- Síntese do cDNA	28
3.10- Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	28
3.11- Reações de PCR semiquantitativo	30
3.12- Análise dos resultados	30
4. Resultados	31

4.1. Identificação do gene da 5-aminolevulinato sintase	31
4.2. Iniciadores	32
4.3. Padronização das condições de PCR	33
4.4. RT-PCR semiquantitativo	35
5. Discussão	38
6. Considerações finais	46
7. Referências bibliográficas	47

Resumo

Os organismos necessitam de tetrapirróis, primariamente na forma de grupo heme e/ou clorofila. O heme está presente como grupo prostético em um grande número de proteínas, entre elas a hemoglobina, mioglobina e citocromos, enquanto a clorofila é o principal pigmento utilizado nos processos fotossintéticos. A formação de tetrapirróis nos organismos tem início na síntese do ácido aminolevulínico (ALA). A enzima 5-aminolevulinato sintase (ALAS), EC 2.3.1.37, catalisa a condensação de succinil-CoA e glicina para a formação do ALA na mitocôndria. No presente trabalho, ostras *Crassostrea gigas* foram expostas à esgoto doméstico bruto diluído a 33% por 48 horas, sob condições controladas de laboratório. Após a exposição, a expressão do gene da ALAS foi analisada nas brânquias e na glândula digestiva, através de RT-PCR (*Reverse Transcriptase- Polymerase Chain Reaction*) semiquantitativo, utilizando-se iniciadores específicos. A exposição ao esgoto doméstico não promoveu um aumento significativo na expressão do gene *ALAS* na glândula digestiva. Por outro lado, as brânquias apresentaram um aumento significativo na expressão deste gene. Nossos resultados mostram um aumento de 68% na expressão do gene *ALAS* nas brânquias dos indivíduos do grupo tratado em relação ao grupo controle (não-tratado). Esses dados sugerem que o gene *ALAS* pode ser considerado como um potencial candidato a biomarcador molecular de exposição à esgoto doméstico na ostra *C. gigas*.

Palavras-chave: 5-aminolevulinato sintase, ALAS, heme, esgoto doméstico, biomarcador molecular, *C. gigas*.

Abstract

Living organisms require tetrapyrroles, primarily in the form of heme and/or chlorophyll. Heme serves as the prosthetic group in a number of important proteins, including hemoglobin, myoglobin, and cytochromes, whereas chlorophyll is the main pigment used in photosynthesis. Formation of tetrapyrroles in all organisms begins with the synthesis of the 5-aminolevulinic acid (ALA). The enzyme 5-aminolevulinic acid synthase (ALAS), EC 2.3.1.37, catalyzes the condensation of succinyl-CoA and glycine to yield ALA in mitochondria. In the present study, oysters *Crassostrea gigas* were exposed to crude domestic sewage diluted at 33% for 48 hours, under controlled laboratory conditions. RNA extract was obtained from gills and digestive gland samples. The expression of the ALAS gene was analyzed by semi-quantitative RT-PCR (*Reverse Transcriptase- Polymerase Chain Reaction*) with specific primers. The exposure to domestic sewage did not elicit a significant increase in the expression of the ALAS gene in the digestive gland, although the exposed group showed increased ALAS mRNA levels in gills. Our results showed a 68% increase in the expression of the ALAS gene in gills in the exposed group when compared to the control group (non-exposed). These data suggest that *ALAS* gene is a potential candidate as a molecular biomarker of domestic sewage exposure in *C. gigas*.

Keywords: 5-aminolevulinic acid synthase, ALAS, heme, domestic sewage, molecular biomarker, *C. gigas*.

1. INTRODUÇÃO

1.1. A contaminação ambiental

O impacto ambiental causado pela presença de contaminantes mostrou um aumento significativo no último século, como decorrência do crescimento da população mundial e da intensificação das atividades humanas ligadas à indústria e agricultura. O termo contaminante difere do termo poluente, pois o primeiro refere-se à presença de uma substância no ambiente e/ou nos organismos, enquanto o segundo causa, necessariamente, um efeito adverso à biota (WALKER et al, 1996)

Compostos tóxicos para os organismos vivos, também conhecidos como xenobióticos, presentes no ecossistema são, usualmente, de origem industrial e apresentam uma estrutura química normalmente não encontrada na biosfera. Entre eles estão as bifenilas policloradas (PCBs), as policlorodioxinas, o trinitrotolueno (TNT) e diversos corantes.

As maiores fontes de contaminação ambiental são as indústrias química e farmacêutica que produzem um amplo repertório de xenobióticos e polímeros sintéticos. Os processos envolvendo a produção de papel e celulose representam a maior fonte de organoclorados no ambiente. Por outro lado, as atividades mineradoras liberam metais pesados. O uso generalizado de combustíveis fósseis, como carvão e petróleo, aumenta significativamente as concentrações de CO₂ na atmosfera e, conseqüentemente a incidência de chuvas ácidas, enquanto a agricultura intensiva utiliza grandes quantidades de fertilizantes e pesticidas (DUA et al, 2002; BONNIE; CAREY; PETSONK, 2002; LEAF; VEROLME; HUNT, 2003).

Entre os contaminantes químicos liberados no ambiente em larga escala, estão compostos alifáticos, aromáticos, halogenados, nitroaromáticos e outros (LINIVGSTONE, 1985; CAJARAVILLE et al., 2000). As condições do local e a concentração do contaminante dependem da quantidade presente, da sua biodisponibilidade, da estabilidade do composto sobre condições aeróbicas e anaeróbicas, da sua mobilidade e da taxa de degradação biológica e não-biológica. Os xenobióticos orgânicos são mais frequentes e mais disponíveis em ambientes aquáticos em comparação aos inorgânicos. Por terem características apolares, são absorvidos

facilmente pelos organismos, atravessam as membranas biológicas passivamente e são distribuídos para os tecidos através de fluidos corpóreos, geralmente associados a lipoproteínas (HODGSON & LEVI, 1994). O rápido avanço do desenvolvimento industrial em todo o mundo tem contribuído para o grande aporte de contaminantes ao ambiente, provocando sérias ameaças ao equilíbrio ambiental (NIYOGI et al., 2001).

Se por um lado a atividade industrial é caracterizada pela emissão de substâncias altamente tóxicas, o esgoto doméstico apresenta quantidade cada vez maior de contaminantes, como produtos farmacêuticos humanos e veterinários, produtos de higiene pessoal, surfactantes e seus resíduos (PETROVIC; GONZALEZ; BARCELÓ, 2003). Além disso, patógenos, principalmente entéricos, como vírus e bactérias encontram concentrações elevadas de nutrientes, o que favorece seu desenvolvimento nos locais de descarte. A contaminação de ambientes aquáticos por patógenos apresenta importante papel epidemiológico por constituir um veículo potencial de dispersão de microrganismos, estando o papel da água como fonte de transmissão bem caracterizado para uma série de doenças, tanto de origem viral quanto bacteriana (TAUXE et al., 1994; PARASHAR et al., 2003).

A intensa ocupação urbana, associada à atividade humana e industrial, resulta em exploração inadequada dos recursos disponíveis e a conseqüente degradação do ambiente (KENISH, 1991; PELLETIER et al., 2006).

O crescimento desordenado e o adensamento das populações costeiras no Brasil tiveram sua origem na colonização do país. O papel de colônia de exploração promoveu a ocupação do território brasileiro do litoral para o interior, tendo em vista facilitar o escoamento do comércio e o trânsito de pessoas entre colônia e metrópole. Estas áreas foram alvos de um processo de ocupação acelerado que teve como vetores básicos a urbanização, o turismo e a industrialização (Macrodiagnóstico da Zona Costeira do Brasil na Escala da União, 1996). Com o surgimento de grandes centros urbanos próximos a faixa litorânea, têm-se observado mudanças significativas na qualidade das águas costeiras e estuários, principalmente em função do despejo de esgoto doméstico e efluentes industriais não tratados, diretamente nos corpos de água (MEDEIROS et al, 2005; NAKADA et al, 2006; BOUND; VOULVOULIS, 2006). Dados do IBGE (2000) mostram uma grande concentração de áreas com potencial poluidor ao longo do litoral brasileiro e próximo a corpos de água (Figura 1).

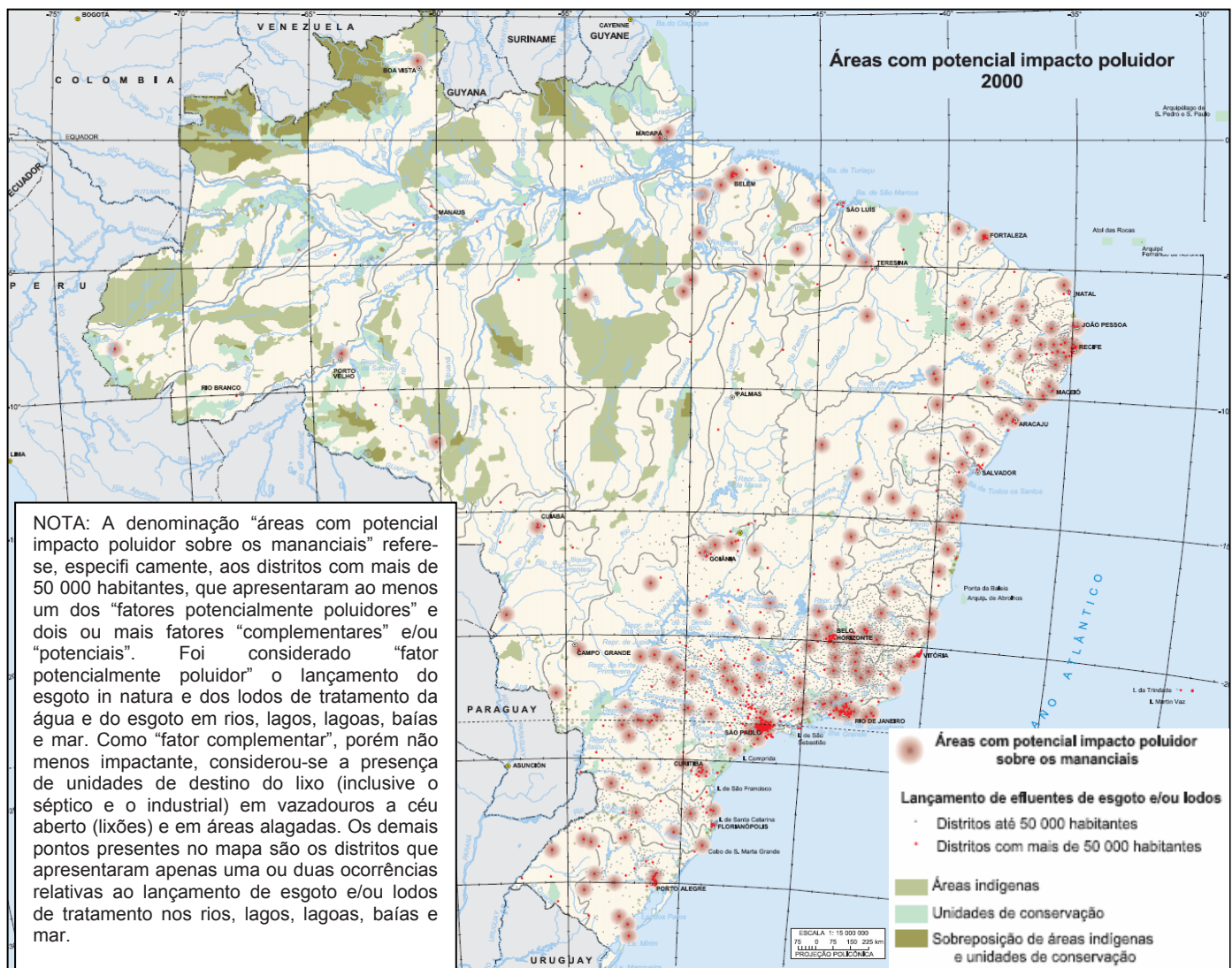


Figura 1. Áreas no território brasileiro com potencial impacto poluidor, localizadas próximas a corpos d’água. Os pontos vermelhos indicam as áreas com potencial impacto poluidor. A maior concentração dessas áreas encontra-se ao longo da costa, onde observamos maior concentração de atividades humanas e industriais. *Fonte:* IBGE, 2000

Assim, o aumento no grau de variedade e a complexidade dos problemas causados em decorrência do despejo de efluentes municipais e industriais no meio ambiente nas últimas décadas, têm gerado a necessidade de proteger principalmente, seus recursos hídricos e avaliar as condições de seus sistemas físicos, químicos e biológicos (KENNISH, 1991)

1.2. Esgoto doméstico

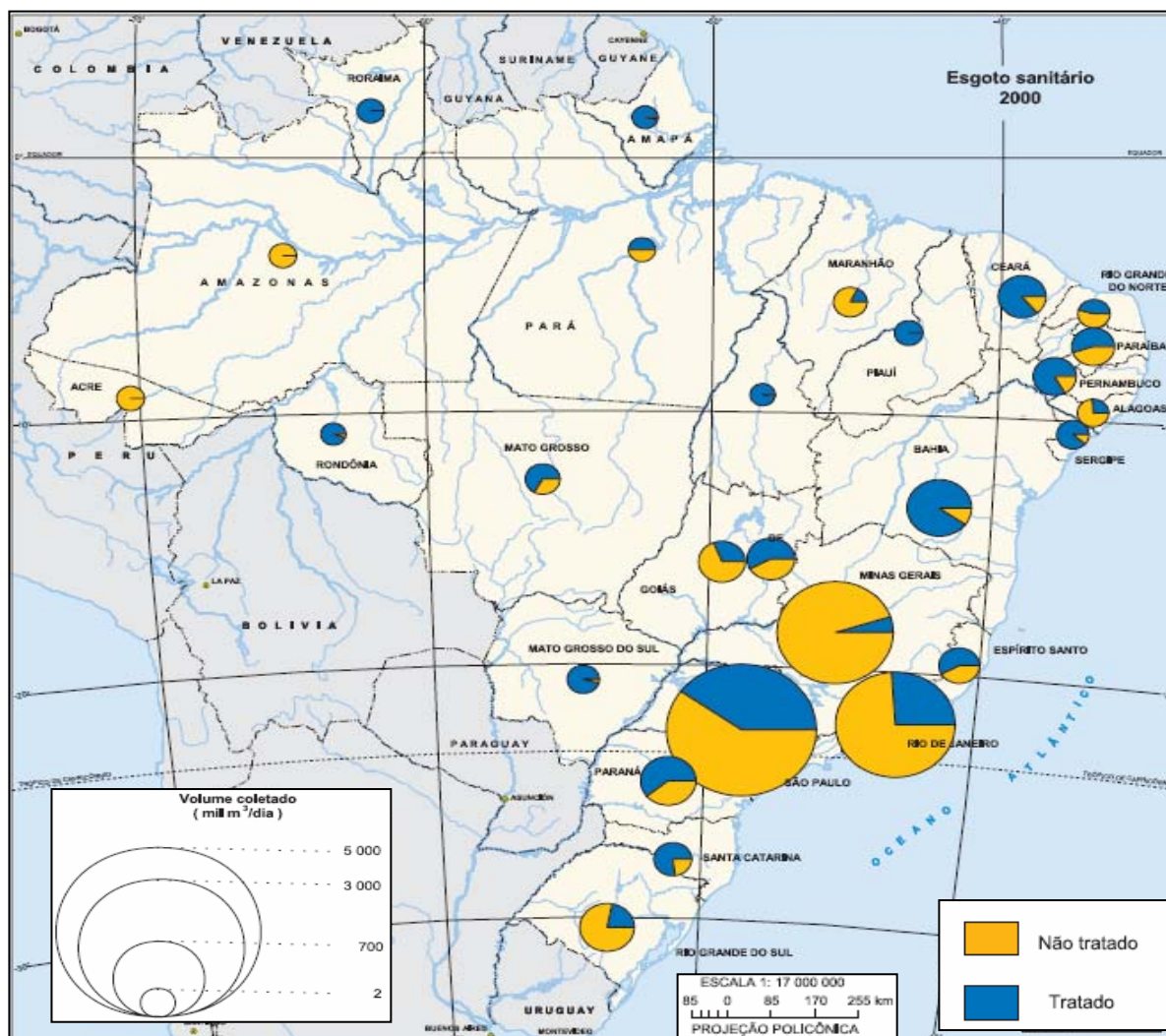
Entre os serviços de saneamento básico, o esgotamento sanitário é o que tem menor cobertura nos municípios brasileiros. Em relação ao esgotamento sanitário, 47,8% dos municípios brasileiros não têm coleta de esgoto (IBGE, 2000). O Norte é a região com a maior proporção de municípios sem coleta (92,9%), seguido do Centro-Oeste (82,1%), Sul (61,1%), Nordeste (57,1%) e Sudeste (7,1%). Nesses casos, os principais receptores do esgoto *in natura* não coletado são os rios e mares, comprometendo a qualidade da água utilizada para abastecimento, irrigação e recreação. No Brasil, dos 52,2% dos municípios que têm esgotamento sanitário, 32% têm serviço de coleta e 20,2% coletam e tratam o esgoto (IBGE, 2000).

Tabela 1. Proporção dos municípios nas diferentes regiões brasileiras com serviço de esgotamento sanitário (%).

Grandes Regiões	Esfera administrativa									
	Total		Municipal		Estadual		Federal		Particular	
	1989	2000	1989	2000	1989	2000	1989	2000	1989	2000
Brasil	47,3	52,2	35,2	38,4	11,9	14,1	0,7	0,1	0,2	1,0
Norte	8,4	7,1	3,4	3,3	4,0	2,2	0,3	0,0	1,7	1,8
Nordeste	26,1	42,9	22,3	37,9	3,9	5,6	0,6	0,2	0,0	0,6
Sudeste	91,0	92,9	67,6	66,3	22,7	26,8	1,5	0,0	0,2	1,9
Sul	39,1	38,9	28,2	24,5	11,2	15,0	0,1	0,0	0,0	0,1
Centro-Oeste	12,9	17,9	3,7	7,4	9,2	10,1	0,3	0,0	0,0	0,4

Fonte: Diretório de Pesquisas, Departamento de População e Indicadores Sociais, Pesquisa Nacional de Saneamento Básico 1989/2000. IBGE, 2000.

A)



B)

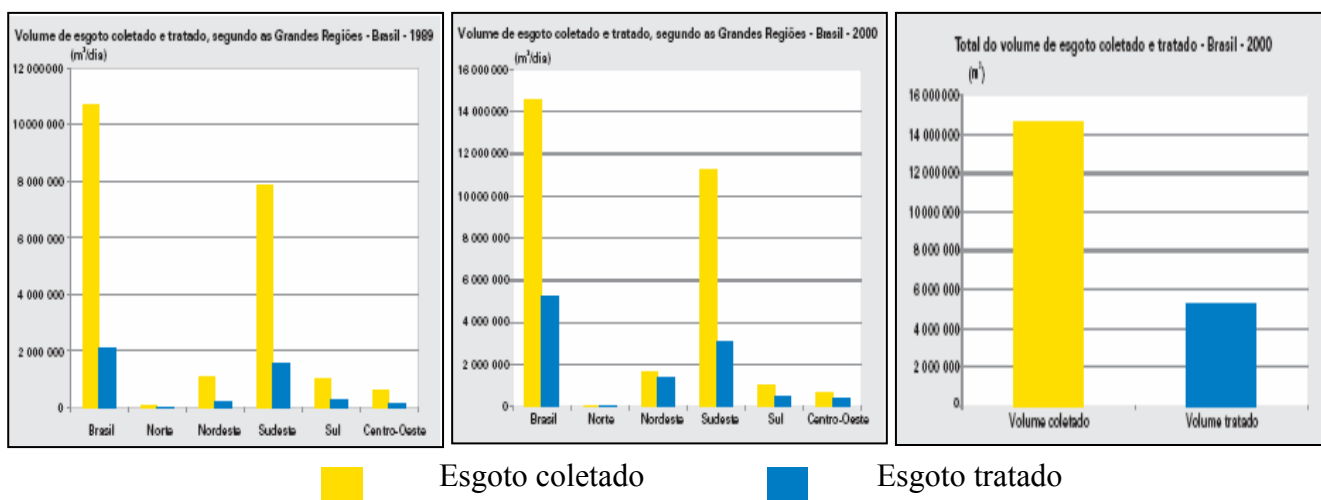


Figura 2.: O problema do esgoto no Brasil. Mapa do Brasil contendo dados referentes aos sistemas de tratamento (A) e coleta (B) do esgoto no Brasil. Os dados revelam a falta de eficiência dos sistemas de esgotamento sanitário nas diferentes regiões do Brasil. *Fonte:* IBGE, 2000.

A maioria das cidades da costa brasileira não é capaz de realizar a coleta e o tratamento de esgotos domésticos, sendo o esgoto *in natura* lançado nos rios ou no mar (Figura 2). Quando existe rede coletora, não há estação de tratamento de esgotos, o que vem a agravar ainda mais a situação, pois a carga acaba por se concentrar em um determinado ponto ou setor do rio ou manancial .

O Brasil apresenta mais de 2/3 da sua população vivendo ao longo da costa (LACERDA et al., 2002). O processo de urbanização do litoral brasileiro promoveu a concentração da população e das atividades econômicas nessa região do país e vem sendo um dos principais processos responsáveis pela modificação dos habitats e das comunidades dos ecossistemas aquáticos (MASALA, 1999). Assim, a necessidade de sistemas de saneamento básico e tratamento eficaz de esgoto se mostra intimamente ligada à questão da qualidade da água. As principais conseqüências da má utilização desses recursos hídricos são a contaminação de águas recreacionais e de consumo, além da modificação de ecossistemas (MARQUES et al., 2004).

Na cidade de Florianópolis, a poluição orgânica é uma constante no mar das baías Norte e Sul, estendendo-se para áreas estuarinas, nos manguezais de Ratonés e Itacorubi, caracterizando estes ambientes como deficitários de oxigênio, predominando, nas áreas de baixa circulação, os processos de decomposição anaeróbica (MATER et al., 2004). Essas alterações podem estar associadas à floração de cianobactérias, dentre elas algumas do gênero *Trichodesmium*, as quais geram toxicidade no meio aquático, afetando a cadeia alimentar do ecossistema e impossibilitando o uso de recursos marinhos (FONSECA; BRAGA; EICHLER, 2002). Recentemente, a preocupação com o crescente impacto ambiental que a Lagoa da Conceição vem experimentando, bem como os problemas decorrentes desta situação foram objeto de matéria jornalística na imprensa local (Jornal Notícias do Dia, 2007). A inexistência de saneamento ao redor de toda a Lagoa destacada na referida matéria foi confirmada pelo representante da CASAN (Companhia Catarinense de Águas e Saneamento), o qual informou, inclusive, que a ampliação da rede coletora da região faz parte das ações planejadas pela companhia. Além do grande potencial turístico, Florianópolis também se destaca pela alta produtividade na aquicultura, em especial no cultivo de ostras. Com núcleos de produção em Sambaqui e Santo Antônio de Lisboa, ao norte, e no Ribeirão da Ilha e áreas próximas, ao sul, a capital catarinense é a maior produtora de ostras do Brasil.

Santa Catarina aparece em primeiro lugar no país, detendo cerca de 85% da produção. Devido às características climáticas e geográficas do litoral, tais como, inúmeras áreas protegidas, compostas por baías, enseadas e estuários, com águas de ótima qualidade, a costa litorânea catarinense tem se destacado como uma região excelente para o cultivo de moluscos.

O esgoto doméstico representa uma fonte rica em fósforo, potássio e nitrogênio, particulado ou dissolvido, além de outras substâncias químicas de uso diário. Em ambientes costeiros que apresentam maiores concentrações imobiliárias, os efluentes são despejados *in natura* na coluna d'água, aumentando a concentração de matéria orgânica e promovendo eutrofização. Entretanto, o esgoto doméstico é heterogêneo em relação à sua composição e por isso, apresenta grande variedade de classes de contaminantes. Entre aqueles mais encontrados estão os fármacos, compostos fenólicos, desinfetantes, hidrocarbonetos, patógenos, como vírus e bactérias, e matéria orgânica (MONARCA et al, 1999; BRETON; TEED; MOORE, 2003; STACKELBERG et al., 2004).

A natureza lipofílica de contaminantes, como hidrocarbonetos e pesticidas, aumenta a probabilidade de associação com componentes de membranas lipídicas. Metais pesados também são conhecidos por interagir com componentes da membrana, catalisando o processo de peroxidação de lipídeos (CHELOMIN; BELCHEVA, 1991)

Recentemente, o monitoramento de fármacos residuais no meio ambiente vem ganhando grande interesse devido ao fato de muitas destes compostos serem freqüentemente encontradas em efluentes de Estações de Tratamento de Esgoto (ETEs) e águas naturais, em concentrações na faixa de $\mu\text{g/L}$ e ng/L . Os fármacos são desenvolvidos para serem persistentes, mantendo suas propriedades químicas o bastante para servir a um propósito terapêutico. Stumpf et al. (1999), relataram em seu estudo que a presença de fármacos residuais em águas superficiais pode ser um indicativo de contaminação por esgoto. Em todo mundo, fármacos, tais como, antibióticos, hormônios, anestésicos, antiinflamatórios entre outros, foram detectados no esgoto doméstico (ZUCCATO; CASTIGLIONI; FANELLI, 2005; NAKADA et al., 2006). Alguns grupos de fármacos residuais merecem uma atenção especial, dentre eles estão os antibióticos e os estrogênios. Os antibióticos são usados em grandes quantidades, tanto na medicina humana, quanto na medicina veterinária, na produção bovina, avícola, suína e, ainda, na aquicultura e apresentam potencial para promover o desenvolvimento

de bactérias resistentes no meio ambiente (SCHMIDT et al., 2000; PETERSEN et al., 2002). A importância dos estrogênios reside no seu potencial de afetar adversamente o sistema reprodutivo de organismos aquáticos, por exemplo, causando, a feminização de peixes machos presentes em rios contaminados (GAGNÉ et al., 2005).

Alguns patógenos também podem estar presentes no esgoto doméstico. Bactérias vêm sendo isoladas de diferentes efluentes urbanos e, em alguns casos, sua resistência a algum antibiótico já foi demonstrada (COSTA; VAZ-PIRES; BERNARDO, 2006; SCHWARTZ et al., 2006). Na Suécia, pesquisadores observaram a sobrevivência de uma cepa de *Salmonella*, envolvida em casos de infecção humana, após o tratamento do esgoto (SAHLSTRÖM; DE JONG; ASPAN, 2006). Além das bactérias, a presença de vírus também torna o esgoto um veículo de propagação de doenças, tanto para o ser humano, como para os organismos aquáticos (DANOVARO et al., 2003). Entre os vírus mais encontrados no esgoto, estão aqueles que utilizam a via fecal-oral como meio de transmissão (GRIFFIN et al., 2003).

A utilização de cloro é um dos métodos mais utilizados para desinfecção da água para consumo. Entretanto, seu uso pode provocar a formação de produtos de propriedades tóxicas com características mutagênicas e carcinogênicas que são potencialmente nocivos para seres humanos e organismos aquáticos. Por isso, efluentes domésticos podem apresentar substâncias químicas desconhecidas com propriedades mutagênicas em virtude de reações químicas sofridas pelos precursores presentes nos desinfetantes (MONARCA et al., 2000).

Substâncias surfactantes estão presentes em produtos de uso doméstico como, por exemplo, detergentes, emulsificantes, dispersantes, pesticidas, além de outros com aplicações industriais. A classe de surfactante mais utilizada é a dos alquilfenóis etoxilados, cujo a degradação primária no ambiente pode gerar alquilfenóis de cadeia curta. Esses produtos de degradação são substâncias persistentes como nonilfenol, octilfenol e alquilfenóis mono-, di- e tri-etoxilados que são metabólitos de relativa estabilidade e apresentam características estrogênicas para alguns organismos aquáticos (YING; WILLIAMS; KOOKANA, 2002; CHENG et al., 2006).

Alguns trabalhos demonstram a utilização de lipídeos como marcadores de contaminação por esgoto (AVERY; DUNSTAN; NELL, 1998; CHALER; SIMONEIT; GRIMALT, 2001; CARREIRA; WAGENER; READMAN, 2004). A maior parte desses lipídeos são descartados após o uso doméstico ou são excretados pelo homem.

Da mesma forma que os coliformes fecais são utilizados como indicadores de poluição por serem liberados juntamente com as fezes, os esteróis presentes nas fezes também podem ser considerados como tal, pois são produtos da redução do colesterol pela ação microbiana no intestino, gerando o coprostanol (TAKADA; EGANHOUSE, 1998).

Com isso, a presença de esteróis ou o perfil desses lipídeos presentes na água, sedimento e/ou em organismos aquáticos podem ser usados para indicar o impacto de um ambiente aquático por esgoto doméstico.

Assim sendo, podemos considerar que o esgoto constitui um material no qual existem contaminantes, os quais podem interagir e causar alterações prejudiciais ao ecossistema aquático. Com isso, o monitoramento dos lançamentos deste tipo de efluente e seu efeito potencial sobre os organismos aquáticos deve se tornar uma ferramenta importante não somente na conservação de ambientes aquáticos, mas ainda, na prevenção de acidentes ambientais, na fiscalização e na implementação de projetos para a recuperação de ambientes impactados por esgoto doméstico.

1.3. A importância dos Recursos Marinhos.

O potencial turístico do Estado de Santa Catarina alcança expressão nacional, sendo que, particularmente, a Ilha de Santa Catarina encontra no turismo uma das principais fontes de renda da sua população. A população flutuante atraída pela beleza natural da região, principalmente as praias, praticamente triplica durante a alta temporada. Tal fato traz benefícios econômicos à população local, mas também aumenta a quantidade de esgoto doméstico produzido e lançado direta ou indiretamente nos ecossistemas aquáticos.

O Estado de Santa Catarina atualmente destaca-se como produtor de organismos aquáticos cultivados do país. As características do Estado permitem uma aquicultura diversificada, gerando oportunidades de ocupação de mão-de-obra e renda para cerca de 24 mil pequenos produtores rurais e pescadores artesanais (EPAGRI, 2005). A zona litorânea, cuja extensão é de 561 km, apresenta inúmeras áreas protegidas, compostas por baías, enseadas e estuários, o que, associado à elevada produtividade do mar, favorece o desenvolvimento do cultivo de moluscos (mexilhões, ostras e vieiras), representando alternativa de renda para os pescadores artesanais e populações

tradicionais das comunidades pesqueiras. Na faixa litorânea, áreas planas próximas ao mar, impróprias para a agricultura caracterizam-se com potencial para implantação de cultivo de camarões e peixes marinhos. Os recursos marinhos apresentam grande diversidade nesta região e por um longo período movimentaram a economia da cidade de Florianópolis e levaram o Estado, na década de 70 e 80, a ocupar uma posição de destaque na produção de pescado no Brasil.

Santa Catarina é o principal produtor nacional, com mais de 8 mil toneladas de mexilhões e 1.600 toneladas de ostras, equivalente a 82% da produção nacional. Atualmente a atividade gera cerca de 5000 empregos diretos, e movimenta em torno de trinta e oito milhões de reais, o que representa cerca de 1,15% do PIB catarinense (PMF, 2004).

A criação do camarão marinho em cativeiro teve início em Santa Catarina em 1983, embora o pioneirismo da atividade no Estado tenha sido na década de 70. Atualmente, os cultivos concentram-se no Complexo Lagunar Sul (Laguna, Imaruí, Imbituba e Jaguaruna), estendendo-se também para outras regiões próximas a grande Florianópolis, Bacia da Foz do Tijucas e Litoral Norte catarinense, utilizando áreas subaproveitadas ou não competitivas para atividades agropecuárias.

Assim, a qualidade da água passa a ser item determinante para a certificação sanitária dos produtos de origem aquícola, o que, conseqüentemente, aponta a relevância de se monitorar as áreas de cultivo. A implementação de programas de monitoramento aquático tem a finalidade de evitar ou detectar a presença de contaminação por substâncias tóxicas, como metais; óleos, pesticidas e corantes, entre outros e, ainda, agentes patogênicos, os quais podem estar presentes na composição do esgoto doméstico. Além disso, a matéria orgânica produzida pelas atividades humanas e descartada no ambiente, provoca modificações no aporte de oxigênio e na concentração de nutrientes, gerando alterações que acarretam prejuízos ao ecossistema aquático.

1.4. Biomonitoramento

A habilidade de avaliar os impactos em ecossistemas depende da capacidade de distinguir os efeitos das ações humanas das variações naturais, buscando entendimento dessas ações sobre os sistemas biológicos (CAIRNS; McORMICK;

NIEDERLEHENER, 1993). Desta forma, o desenvolvimento de metodologias eficientes de diagnóstico é fundamental para uma gestão eficiente dos recursos hídricos. Segundo documento das Nações Unidas, Agenda 21, “... a utilização da água deve ter como prioridades a satisfação das necessidades e a preservação dos ecossistemas.”. Para isso, é necessário o desenvolvimento de métodos específicos, sensíveis e rápidos de detecção e que não estejam baseados unicamente na detecção de patógenos bacterianos ou em análises físico-químicas. As metodologias atuais utilizadas na determinação de qualidade sanitária da água, baseadas no monitoramento dos níveis de coliformes fecais, têm se mostrado ineficientes para a detecção de enterovírus e protozoários (MUNIAIN-MUJIKÁ et al., 2003). Do primeiro dispositivo legal voltado exclusivamente para recursos hídricos, o Código das Águas (decreto nº 24.643 de 10 de julho de 1934 –Brasil), passando pela resolução do Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA) nº 20 de 1986, até a Lei das Águas (Lei 9.433/97, Brasil), não há qualquer menção ao uso de biomonitoramento para avaliar a qualidade das águas. Desta forma, as aplicações mais bem sucedidas na implementação desses programas no Brasil são realizados de forma não sistemática pelas agências ambientais, em conjunto com as universidades ou centros de pesquisa (BUSS; BAPTISTA; NEISSIMIAN, 2003).

Resta portanto, estabelecer metodologias que possam evidenciar situações de risco ambiental. Tradicionalmente, os programas de avaliação e monitoramento de contaminação aquática utilizam parâmetros químicos para avaliar a presença e concentração de contaminantes na água, sedimento e organismos do ecossistema. Entretanto, estes tipos de análise não evidenciam as consequências toxicológicas dos contaminantes na biota (FENT, 2003). A utilização de respostas fisiológicas em avaliações de laboratório é genericamente conhecida como testes toxicológicos. O *International Council for the Exploitation of the Sea*, ICES (2003) sugere a análise de biomarcadores como metodologia complementar às tradicionais, para expressar o grau de toxicidade dos contaminantes nos organismos (BURGEOT et al., 1996).

Biomarcadores são respostas em nível molecular, celular ou fisiológico de organismos vivos, que podem ser utilizadas para avaliar as alterações ocorridas no ambiente e que expressam o efeito tóxico causado por contaminantes (MATTHEWS; BUIKEMA; CAIRNS, 1982, WALKER et al., 1996; BINELLI et al., 2006).

Os biomarcadores moleculares ou bioquímicos apresentam a vantagem de servirem de aviso prévio da degradação ambiental causada pelos contaminantes (RAND, 1995), antecipando os possíveis danos em maior escala, tais como efeitos deletérios na população e na comunidade biológica (CAJARAVILLE et al., 2000). Além disso, a análise desses biomarcadores apresenta, na maioria das vezes, menor custo, maior facilidade de execução e rapidez do que as análises químicas convencionais (GALLOWAY et al., 2004). Apesar dessas vantagens, a especificidade das respostas dos biomarcadores para as diferentes classes de contaminantes na maioria das vezes não é muito clara. Desta forma, os programas de monitoramento vêm utilizando esta estratégia com cautela, avaliando um conjunto de biomarcadores de maneira programada e esquemática, juntamente com as análises químicas (GALLOWAY et al., 2004). Respostas bioquímicas como indução de metalotioneínas em resposta a exposição de metais pesados, assim como a indução de citocromos P450 por PAH's e PCB's e a inibição de enzimas envolvidas na síntese de quitina associada à exposição a pesticidas são observadas em peneídeos (BAINY, 2000). Além disso, os metabólitos gerados por um contaminante também podem ser usados como biomarcadores. Os conjugados pela glutatona durante a biotransformação, por exemplo, podem ser identificados pela formação de metabólito reativo presente na urina (TIMBRELL, 2003).

Os biomarcadores podem ser divididos em dois grupos, indicando o efeito ou a exposição do organismo a um contaminante. Os biomarcadores de exposição indicam a magnitude da perturbação causada em resposta a um poluente. Dentre eles estão as enzimas de conjugação de xenobióticos, as metalotioneínas e as defesas antioxidantes. Entre os biomarcadores de efeito, encontram-se as medidas de dano de DNA e de peroxidação de lipídeos (RAND, 1995; CAJARAVILLE et al., 2000).

Programas de biomonitoramento vêm sendo utilizados em diversos países para prevenir e avaliar danos ambientais. Estes estudos utilizam espécies-chaves com diferentes propósitos, podendo ser definidas como indicadores, sentinelas ou monitores, de acordo com o propósito a que se destinam. As espécies indicadoras acusam mudanças populacionais da espécie em resposta ao impacto causado. Nas espécies sentinelas, a análise da concentração de substâncias químicas em seus tecidos, reflete a concentração do contaminante que está biodisponível no ambiente. Já as espécies monitoras demonstram efeitos adversos no metabolismo em resposta a presença do

contaminante (BEEBY, 2001). Segundo Johnson, Weiderholm, Rosenberg (1993), espécies-chave ideais devem apresentar as seguintes características: distribuição geográfica ampla; variabilidade genética e ecológica; baixa mobilidade, longo ciclo de vida; ser abundante e/ou de fácil coleta, dispor de características ecológicas bem conhecidas, além de apresentar facilidade de uso e manipulação em estudos laboratoriais.

Moluscos bivalves vêm sendo amplamente utilizados em programas de biomonitoramento, uma vez que apresentam características como ampla distribuição geográfica, além de serem sésseis, abundantes e filtradores (WALKER et al, 1996; SHEENAN; POWER, 1999). Alterações no metabolismo energético desses animais foram relatadas em resposta ao estresse ambiental, associado à temperatura, salinidade e deficiência de oxigênio, além da exposição a contaminantes (WALKER et al, 1996; PÖRTNER et al., 1998; SOKOLOVA; BOCK; PÖRTNER, 2000).

Nesse sentido, o programa “*Mussel Watch*”, nos Estados Unidos, foi um dos pioneiros na utilização de bivalves como sentinelas, assim como o programa de avaliação de Controle de Poluição na Região do Mediterrâneo (MED-POL) (RAND, 1995; BURGEOT et al., 1996; CAJARAVILLE et al., 2000). A Comunidade Européia encontra-se mais desenvolvida neste sentido, sendo que os programas de biomonitoramento marinho realizados nesta região são utilizados, geralmente, como referência para outros programas em distintas regiões do globo terrestre. O programa BEEP (*Biological Effects of Environmental Pollution*) encontra-se em desenvolvimento na Europa desde 2001 e apresenta perspectivas para a padronização internacional de técnicas de biomonitoramento marinho. O BEEP inclui a análise de parâmetros enzimáticos e genéticos, utilizando espécies ecologicamente relevantes.

1.5. Genes diferencialmente expressos: a busca por biomarcadores moleculares

Diversas metodologias de Biologia Molecular estão sendo aplicadas e padronizadas para os programas de biomonitoramento e focam principalmente, a expressão diferencial de genes em organismos expostos a diferentes classes de contaminantes.

A utilização da tecnologia de microarranjos (*microarrays*) tem sido uma importante ferramenta que, aliada ao grande número de projetos genoma, tem permitido a análise simultânea da expressão de uma grande quantidade de genes em uma única amostra biológica. A transcrição ou perfil de expressão são analisados através da utilização de até 10.000 sondas em uma única matriz ou *chip*, podendo ser as mesmas oligonucleotídeos ou cDNAs. Esta técnica vem sendo aplicada, principalmente, na elucidação de mecanismos de doenças humanas e processos toxicológicos (NEUMANN; GALVEZ, 2002; VISSERS et al., 2005; LETTIERI, 2006) A utilização desta ferramenta na área ambiental ainda é pequena, principalmente, pelo baixo número de espécies que têm seu genoma completamente seqüenciado e são utilizadas como organismos sentinelas.

Uma forma alternativa para o isolamento e a caracterização de sondas, seria a utilização de genes que apresentem a sua expressão alterada. Esta estratégia permite a criação de bibliotecas de cDNA enriquecidas por genes transcritos em resposta a um poluente. Isto pode ser obtido através da supressão subtrativa de genes, seguida de hibridização. Através da *Supression Subtractive Hybridization* (SSH), técnica desenvolvida por Diatchenko et al. (1996), os genes transcritos e diferencialmente expressos são isolados como fragmentos de cDNA, através da subtração entre os animais expostos a contaminantes e os animais controle (não-expostos). Com base nestes resultados, aliados à bioinformática e análises estatísticas, podemos inferir quais os genes que estão sendo expressos em diferentes tecidos, sugerindo sua relevância dentro dos diferentes processos bioquímicos e fisiológicos do organismo. Isso nos permite relacionar as alterações geradas no metabolismo em decorrência das alterações dos níveis de expressão dos genes, em condições específicas (CARULLI et al., 1998; KOZIAN; KIRSCHBAUM, 1999).

Podemos determinar os níveis de expressão de um determinado gene em resposta a presença de contaminantes através da quantificação das moléculas de RNA mensageiro (RNAm). Essas moléculas refletem os níveis de transcrição dos genes no instante da exposição. Vários métodos como *Northern blot*, *Ribonuclease assay protection* e RT-PCR (*Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction*) são propostos para quantificar os níveis de RNA. Através da comparação desses métodos, REUE (1998) demonstrou vantagens e desvantagens e preconiza que a escolha da metodologia a ser utilizada irá depender da sua aplicação. Sendo assim, o RT-PCR

mostrou ser a metodologia mais adequada para avaliar potenciais candidatos a biomarcadores moleculares por apresentar maior sensibilidade na detecção da alteração dos níveis de RNAm. Em teoria, o PCR é capaz de detectar o cDNA originado de uma única molécula de RNAm, mas na prática, pelo menos 10 cópias da molécula são requeridas. Tal fato se deve a ineficiência da transcriptase reversa ao converter RNAm em cDNA para posterior amplificação (FOLEY; LEONARD; ENGEL, 1993).

O RT-PCR semiquantitativo é um método rápido para estimar as quantidades relativas em populações de RNA, utilizando um gene constitutivo como controle interno para normalizar os níveis de expressão do gene alvo de interesse. A expressão do gene referência utilizado para normalização deve permanecer constante entre as células de diferentes tecidos e sob condições diferentes. Caso contrário, a escolha de um gene referência inadequado pode levar a resultados errôneos. Genes envolvidos em rotas metabólicas básicas como os que codificam para a ubiquitina, actina, o RNA ribossomal (rRNA) 28S e a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) têm sido usados amplamente como controle interno para a análise da expressão de genes. Entretanto, alguns trabalhos demonstram que o nível de transcrição de alguns dos genes tidos como constitutivos pode apresentar variações nos níveis de transcrição sob diferentes condições experimentais (SELVEY et al., 2001; HALLER et al., 2004; SHULZHENKO et al., 2005).

A relação dos produtos amplificados deve refletir a relação inicial da concentração de RNAm. Com isso, a metodologia requer padronização prévia das condições da reação, como concentração dos iniciadores, dos desoxi-ribonucleotídeos trifosfatados (dNTPs) e, principalmente, da concentração inicial de cDNA e número de ciclos, para assegurar que os dados sejam capturados durante a fase exponencial da reação de amplificação. Durante a fase exponencial a taxa de amplificação permanece constante devido à plena atividade da enzima, concentrações suficientes de iniciadores e dNTPs e não há formação de produtos inibitórios da reação. Após a fase exponencial, a taxa de amplificação é reduzida drasticamente, alcançando a fase de saturação, onde a maior parte dos reagentes já foi consumida, além de se observar perda da atividade enzimática, reduzindo a eficiência da reação. A determinação do número de ciclos pode ser feita através da retirada progressiva dos produtos da reação (REUE; COHEN; SCHOTZ, 1997) e, assim, monitorar a intensidade do sinal gerado a cada intervalo determinado de ciclos por densitometria. Com isso, podemos determinar em quantos

ciclos o sinal passa de indetectável (cerca de 20 ciclos) à saturado, ao se alcançar o fim da fase exponencial.

Entre os biomarcadores de contaminação aquática mais utilizados e recomendados estão as enzimas de defesa antioxidante e de conjugação de xenobióticos, pois estas fornecem informações a respeito da capacidade de defesa do organismo, bem como a capacidade de transformação de compostos tóxicos (BURGEOT et al., 1996; MONSERRAT et al., 2006; VALAVANIDIS et al., 2006). Entre as fases do metabolismo de xenobióticos, podemos citar as reações de fase I (biotransformação) e fase II (conjugação). A primeira fase promove o aumento da hidrosolubilidade dos contaminantes, facilitando a sua excreção (LIVINGSTONE, 1985). Por isso, a demanda metabólica requerida durante o processo de detoxificação acarreta na alteração dos níveis de expressão dos genes que codificam as enzimas envolvidas. Sendo assim, a variação dos níveis de expressão de um gene ou conjunto de genes, pode indicar alterações no metabolismo em resposta a presença de um contaminante específico presente no ambiente. Estas respostas podem então ser utilizadas como biomarcadores moleculares de contaminação aquática.

O Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica – Labcai, CCB, UFSC, vem desenvolvendo um projeto (CNPq-Proc. 475995/2003-1) que envolve a identificação e a caracterização de biomarcadores de exposição a esgoto doméstico na ostra *Crassostrea gigas*. Através da técnica de hibridização subtrativa de cDNA, foi possível encontrar seqüências gênicas que apresentaram similaridades com aquelas que codificam para proteínas conhecidas, como, por exemplo, a Proteína Ligante a Ácidos Graxos (FABP), o citocromo P450 (CYP450) e a enzima 5-aminolevulinato sintase, entre outras.

1.6. A enzima 5- aminolevulinato sintase

Os compostos tetrapirrólicos desempenham um importante papel metabólico como pigmentos fotossintéticos (clorofilas e bilinas) e grupos prostéticos (grupos heme e corrinas) de diversas proteínas, como os citocromos da cadeia respiratória e o citocromo P450, por exemplo.

A reação que catalisa o primeiro passo da biossíntese dos tetrapirróis foi descoberta por Shemin (1955) e sua atividade em eritrócitos foi comprovada por Laver, Neuberg, Udenfriend (1958). A enzima 5-aminolevulinato sintase (ALA-sintase ou ALA-S; EC 2. 3. 1. 37), também denominada ácido δ -aminolevulínico sintase, purificada por Warnick, Burnham (1971) é um homodímero piridoxal fosfato-

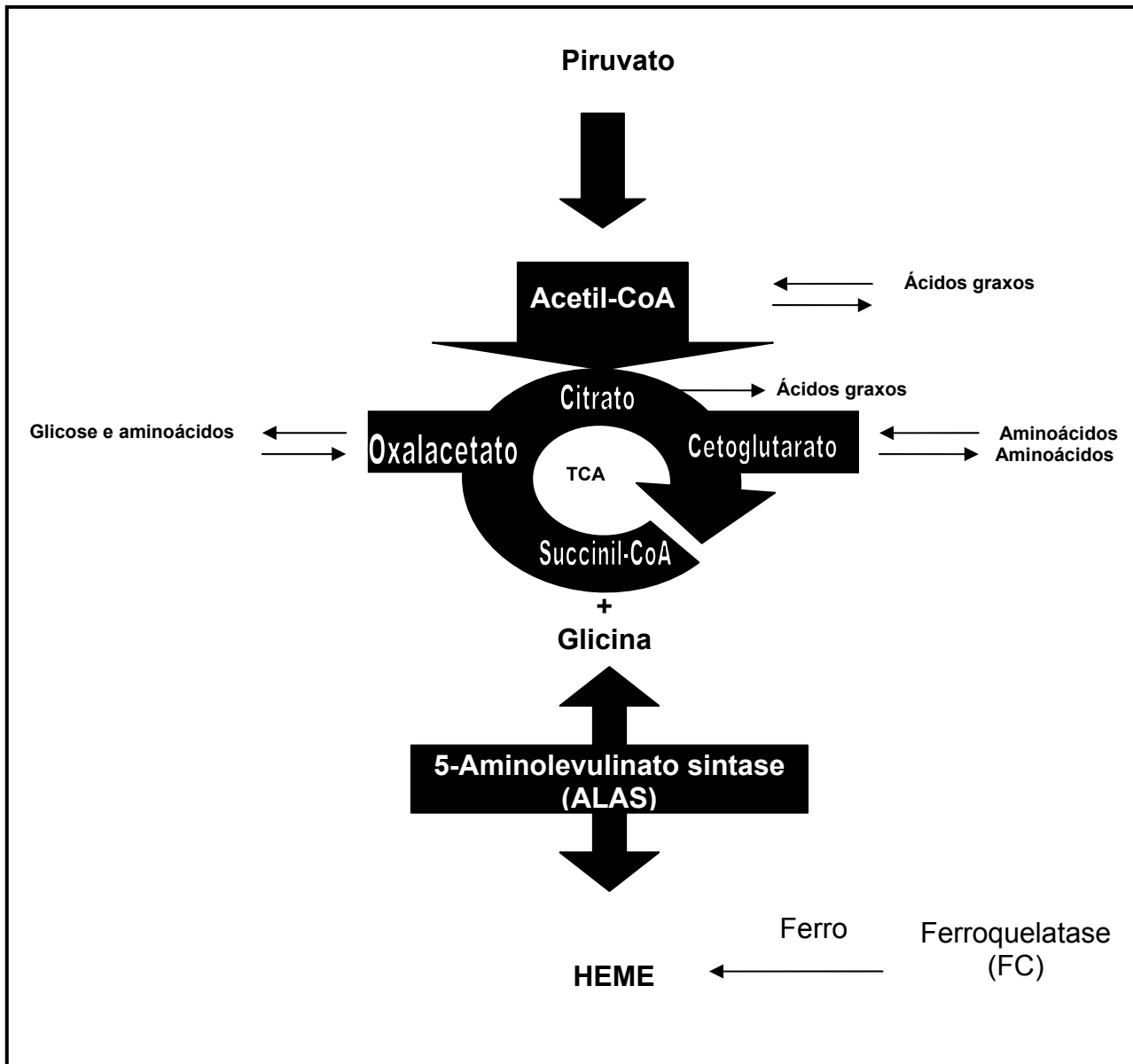


Figura 3.: Modelo esquemático das principais etapas da biossíntese de heme a partir de intermediários do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA). A enzima 5-aminolevulinato sintase (ALAS) promove a condensação de succinil-CoA e glicina para a formação de heme. As setas indicam a direção do fluxo metabólico dos intermediários.

dependente, composto por monômeros de 44-65 kDa (CHRISTEN; METHA 2001), que catalisa a descarboxilação condensativa da glicina e do succinil-Coenzima A (CoA-SH). Este último proveniente do Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos (TCA) (Figura 3). O produto gerado na reação é o ácido 5-aminolevulínico (ALS ou ALA), precursor universal dos anéis tetrapirróis. Esta reação acontece na mitocôndria de uma série de organismos, como animais, fungos e alguns protistas, diferentemente de plantas, bactérias e archaea, onde o ALA é derivado do glutamato (via C5) por vias biossintéticas distintas (FERREIRA; GONG, 1995; SCHULZE et al., 2006).

A análise de 30 seqüências do gene que codifica a ALA-S demonstrou que ele é altamente conservado entre protostomados, fungos, protozoários e bactérias. Na enzima, 2/3 da seqüência da região carboxi-terminal da proteína não processada, apresentam entre 40-90% de homologia, sendo que as bactérias mostraram os maiores percentuais (DUNCAN et al, 1999). A seqüência de ALAS apresenta 49% de identidade entre a proteína humana e aquela sintetizada pela bactéria *Rhodobacter capsulatus* (ASTNER et al., 2005). Oh-Hama, 1997, propôs que a produção de ALA via C5 é ancestral em relação à produção via ALAS, fazendo parte do metabolismo de α -proteobactérias que estariam crescendo em aerobiose durante a oxigenação da atmosfera terrestre.

Os vertebrados apresentam duas isoformas da enzima, as quais são codificadas por diferentes genes, localizados em diferentes cromossomos. A isoforma *ALS1* ou *ALS-H*, tida como produto de um gene “*housekeeping*”, é provavelmente produzida por todos os tecidos, ativando a biosíntese de heme para os citocromos e outras hemoproteínas (MAY et al., 1995). A *ALS2* ou *ALS-E*, é uma enzima específica de células eritróides que tem sua síntese aumentada durante a eritropoiese, devido à demanda por grupos heme para a produção de hemoglobina (MAY et al., 1995).

Além de seu papel como grupo prostético de proteínas envolvidas no transporte de oxigênio na respiração mitocondrial, o heme (Figura 4) desempenha funções biológicas importantes, como no metabolismo de drogas, biossíntese de estrógenos, defesa celular antioxidante e, ainda, na transdução de sinal (PODVINEC et al., 2002; OATES; WEST, 2006; TSIFTSOGLU; TSAMADOU; PAPADOPOULOU, 2006; ATAMNA, 2004). Por outro lado, o heme pode ter sua síntese aumentada em resposta a estrógenos e aumento de disponibilidade de ferro (Figura 5).

O heme é capaz de promover a repressão da transcrição do gene, a diminuição da meia vida da enzima e a inibição dos processos pós-traducionais da pré-proteína

(HAMILTON et al., 1991). Muitas condições são capazes de alterar a biosíntese de heme, diminuindo ou aumentando sua concentração celular, como deficiência de vitaminas específicas (B6 e riboflavinas), minerais, exposição a altas doses de toxinas e anoxia, podem levar a diminuição da síntese de heme (DANIELL et al., 1997). O produto final da reação catalisada pela ALA-S, o heme, atua não somente como inibidor alostérico da enzima, mas, ainda, como co-repressor da sua biossíntese. Este segundo mecanismo de regulação, envolvendo a síntese da enzima, parece ser o mais importante (ELLIOT; ELLIOT, 2001).

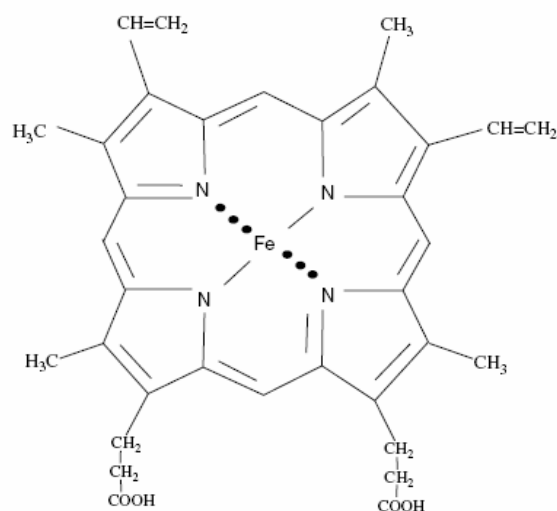


Figura 4.: Estrutura molecular de heme com íon divalente ferro.

Apesar do controle da síntese do heme estar intimamente relacionado com a regulação do *uptake* de Fe e o armazenamento deste elemento na célula, a atividade da ALAS é o passo limitante da velocidade da síntese de heme pois é ela quem dá origem às moléculas de ALA para montagem de heme. A última etapa da biosíntese de heme é catalisada pela enzima ferroquelatase que promove a inserção de um átomo de ferro na protoporfirina IX, formando heme (WOODARD; DAILEY, 2000; BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2002) (Figura 5). Além disso, existem mecanismos de regulação pós-transcricionais relacionados como a concentração de ferro através de uma alça ou estrutura em grampo (*hairpin loop*), denominada de elemento reponsivo a Fe (*Iron- Responsive Element, IRE*) na região não traduzida da extremidade 5' (5'-Untranslated Region, 5'-UTR) do RNAm da *ALAS-E* (COX et al., 1991). O controle é

mediado pela proteína *Irr* (*Iron response regulator*) que regula negativamente a síntese de heme (figura 5). *Irr* é uma proteína condicionalmente estável que é degradada quando as células estão expostas a ferro, permitindo a repressão da síntese de heme (HAMZA et al., 1998). Quando a disponibilidade de ferro para a síntese de heme é suficiente, *Irr* se liga a enzima ferroquelatase. Este *turnover* dependente de ferro é mediado por heme, que se liga a *Irr* promovendo sua degradação (QI et al., 1999).

O chumbo quando presente no sangue e ossos em níveis elevados ($0.8 \mu\text{g mL}^{-1}$) pode interferir nos níveis de heme e induzir a síntese de porfirinas, reduzindo os níveis de hemoglobina (TIMBRELL, 2003). Enzimas como ALA-S, ferroquelatase e δ -aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D) (E.C.: 4.2.1.24.) têm suas funções comprometidas pelo chumbo. Metais como o chumbo podem comprometer importantes etapas de biosíntese de heme pois competem com o ferro. Os altos níveis de chumbo em humanos resultam na inibição da enzima δ -ALA-D que promove as etapas de condensação e ciclização de duas moléculas de ácido aminolevulínico para geração de porfobilinogênio. Com isso, a presença de ALA na urina é um dos principais marcadores de exposição a chumbo em humanos.

Muitos trabalhos indicam uma co-regulação na síntese de heme pela atividade do citocromo P450 (CYP). O heme livre é encontrado em baixas concentrações no interior das células, pois seu aumento causa efeitos citotóxicos (MAY et al., 1995). Assim, a demanda por heme pode aumentar em resposta ao aumento da síntese e atividade do citocromo P450 durante a metabolização de algumas drogas (LOUIS et al., 1998; IBA et al., 1999). Nesta situação, os níveis de RNAm da *ALAS1* são aumentados com o objetivo de suprir a demanda de heme dos apocitocromos. Além disso, outros estudos têm demonstrado que a regulação pode ocorrer pela ativação direta da transcrição do gene *ALAS1* por algumas drogas, devido à presença de sequências capazes de interagir com xenobióticos, funcionando como xenosensores (JOVER, HOFFMANN; MEYER, 1996; FRASER et al., 2002; PODVINEC et al., 2004).

Assim sendo, poder-se-ia considerar que a regulação e, conseqüentemente, a expressão do gene *ALAS* venham apresentar variações em resposta a exposição a contaminantes, ao estresse oxidativo e a outras condições que alterem a homeostase celular. Estas variações podem representar uma estratégia fundamental na tentativa de manter o equilíbrio celular, podendo vir a ser um biomarcador molecular de contaminação aquática em potencial.

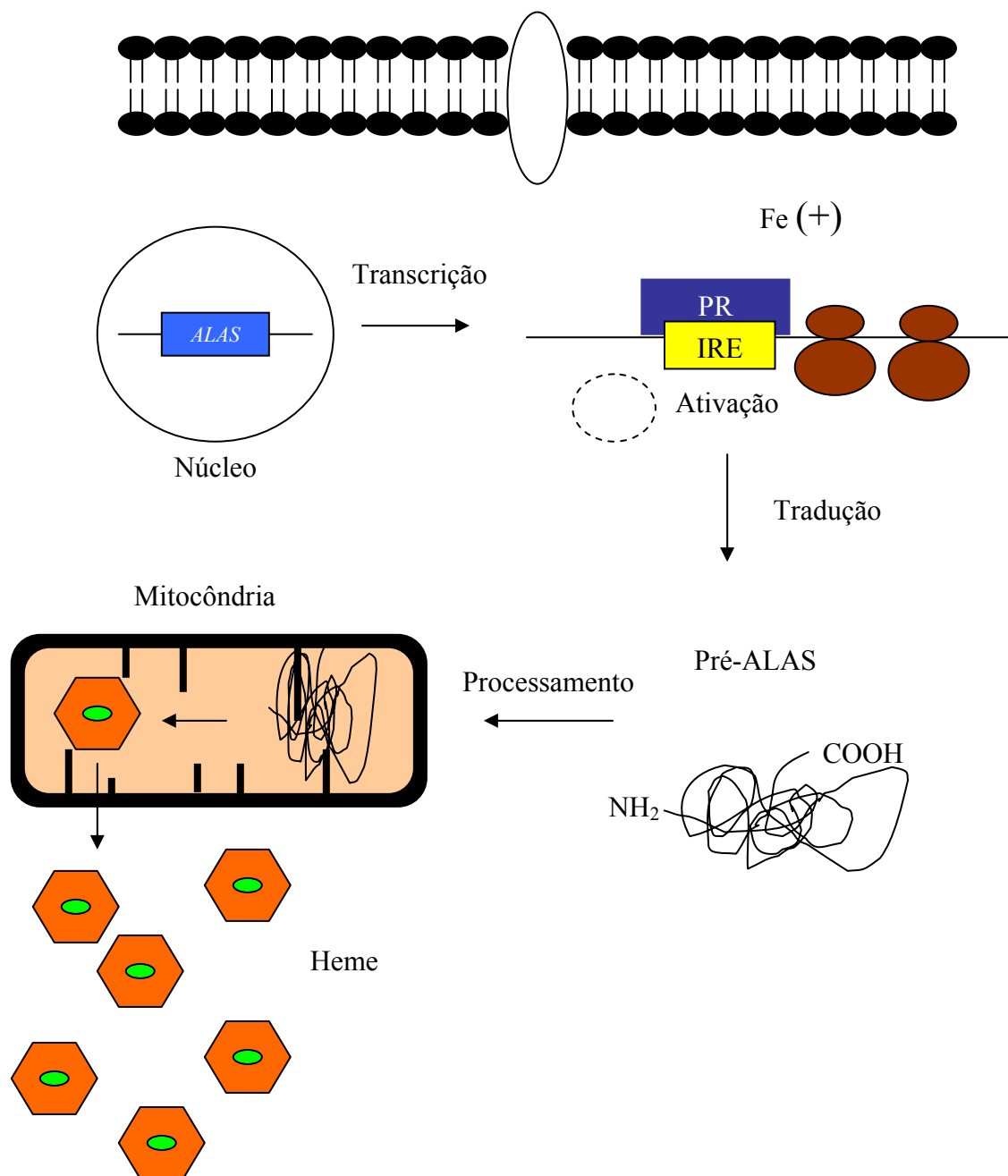


Figura 5.: Modelo esquemático da regulação do gene *ALAS* por ferro. Inicialmente, o gene *ALAS* é transcrito no núcleo e traduzido no citoplasma. Na presença de ferro (Fe^{+}), uma proteína reguladora (PR) se liga ao domínio IRE (*Iron Response Element*), permitindo a tradução do RNAm de *ALAS*, levando à degradação de *Irr* (*Iron Response Regulator*). *Irr* promove a repressão do gene em baixas concentrações de Fe se ligando ao IRE, impedindo a ligação da PR. A tradução do gene *ALAS* gera uma proteína pré-ALAS que só se torna ativa após translocação para o interior da mitocôndria, após processamento de uma sequência da porção N-terminal.

2. OBJETIVOS

Principal

Analisar os diferentes níveis de expressão do gene da aminolevulinato sintase (ALAS) em brânquias e glândula digestiva da ostra *Crassostrea gigas* exposta à esgoto doméstico, através de RT-PCR (*Reverse Transcriptase – Polimerase Chain Reaction*) semiquantitativo.

Específicos

Padronizar reações de PCR para a amplificação do fragmento do gene da ALAS em *C. gigas*;

Padronizar as reações de PCR semiquantitativo para o gene da ALAS em brânquias e glândula digestiva de *C. gigas*;

Analisar os diferentes níveis de expressão do gene da ALAS em *C. gigas*, após exposição a esgoto doméstico em laboratório.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Coleta e manutenção dos animais

Os espécimes de *Crassostrea gigas* (*C.gigas*) foram obtidos junto a unidade de mar do Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM, Universidade Federal de Santa Catarina), localizado na praia de Sambaquí (Florianópolis, SC, Brasil) (Figura 6. A). Após a coleta, os animais foram levados para o laboratório e separados em dois grupos distintos (n= 10 por grupo). Cada grupo foi mantido em um aquário com 45 L de água do mar filtrada, em salinidade 24‰ e a temperatura ambiente, sob aeração constante (Figura 6.B). Os animais foram mantidos nestas condições por um período inicial de 10 dias (período de aclimatação), durante o qual foram realizadas, diariamente, a troca de água e a alimentação dos animais com microalgas *Chaetocerus calcitrans* (10^4 cel/mL).

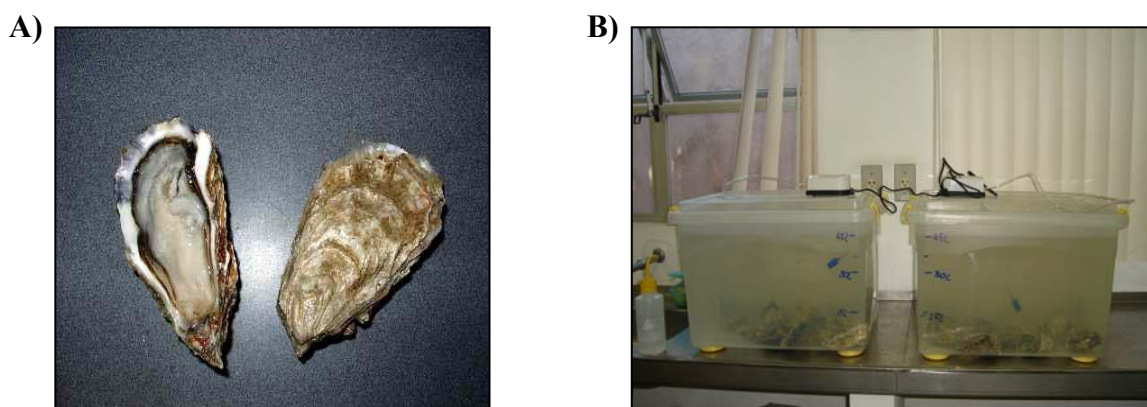


Figura 6.: Experimento de exposição à esgoto doméstico em laboratório. A) Ostras *Crassostrea gigas*. B) As ostras em aclimatação em um aquário com 45 L de água do mar filtrada, salinidade 24‰, a temperatura ambiente, sob aeração constante por 10 dias.

3.2. Exposição ao esgoto doméstico

Após o período de aclimação, um dos grupos foi exposto a esgoto doméstico não-tratado, coletado na estação de tratamento da Companhia Catarinense de Águas e Saneamento (CASAN) na data de 25 de junho de 2005 e diluído para uma concentração final igual a 33%. O período de exposição deste grupo de ostras *C. gigas* foi de 48 horas. Durante este período, o grupo mantido no segundo aquário recebeu apenas água do mar filtrada (Figura 7). Não houve mortalidade entre os indivíduos durante o período de exposição.



Figura 7.: Aquários contendo água do mar (à esquerda) e esgoto doméstico diluído a 33% (à direita), utilizados no experimento de exposição.

3.3. Obtenção dos tecidos

Ao término do período de exposição, 10 animais de cada grupo foram dissecados para a retirada das brânquias e da glândula digestiva. Os tecidos foram armazenados em solução RNAlater (Ambion) à -20°C até a extração do RNA total.

3.4. Clonagem dos fragmentos de cDNA diferencialmente expressos

Utilizamos *pGEM®-T Easy Vector Systems* (Promega) (Figura 8) para a clonagem do fragmento contendo a seqüência do gene *ALAS*, obtido a partir da biblioteca de cDNA resultante de experimentos de hibridização subtrativa. Neste sistema, o vetor de clonagem apresenta um sítio múltiplo de clonagem, além de uma seqüência para clivagem com a enzima de restrição *Eco RI*. A seleção das células transformantes é realizada através da alteração de cor, devido à inserção do fragmento

clonado, a qual promove a interrupção de um gene promotor (*lacZ*). Este gene está envolvido no metabolismo de lactose. Sendo assim, a perda de função desse promotor será indicada por alterações colorimétricas das células, indicando a inserção (colônias brancas) ou não (colônias azuis) do fragmento de interesse.

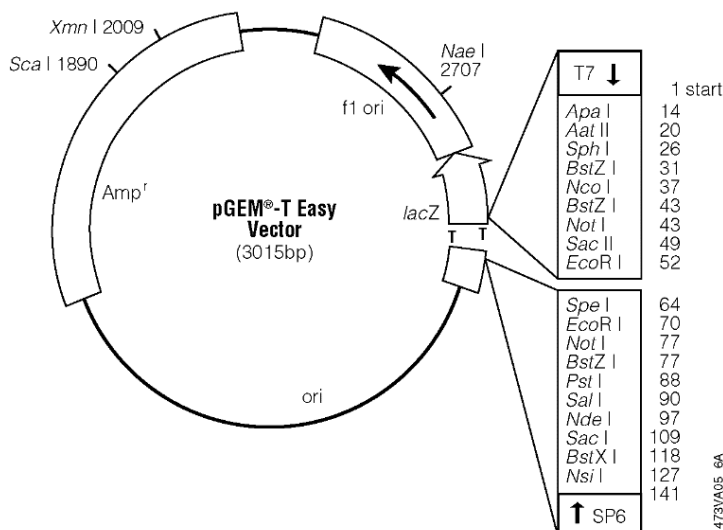


Figura 8.: Plasmídeo pGEM-T Easy utilizado como vetor de clonagem. Apresenta um promotor *lacZ* com sítio múltiplo de clonagem, flanqueado por sítio de restrição para *EcoRI*.

Para a reação de ligação foram utilizados 2 μ L do cDNA em tampão de ligação (5x), contendo o vetor (50 ng) e a enzima de ligação T4 DNA ligase (4 U); sendo a mistura mantida por 14 horas a 4°C.

Para a reação de transformação foram utilizadas bactérias competentes *Escherichia coli*, linhagem JM109. Foram adicionados 2 μ L da reação de ligação a 50 μ L de células competentes, as quais foram mantidas em gelo por 30 minutos. Em seguida, as amostras foram colocadas a 42°C por 45 segundos e, imediatamente transferidas para o gelo novamente por mais dois minutos. Para cada amostra foram adicionados 950 μ L de meio LB, seguido de incubação a 37°C por 90 minutos, sob agitação constante a 120 rpm. Após a transformação, 200 μ L da solução contendo as bactérias transformadas foram aplicados em placa contendo ágar 35g/L (LB Agar-Sigma), ampicilina (100mM), IPTG (0,5mM) e X-Gal (50mM), as quais foram mantidas a 37°C por 18 horas para o crescimento das colônias.

3.5. Purificação do plasmídeo para seleção dos clones

Todas as colônias brancas, obtidas na transformação, foram transferidas separadamente para tubos de ensaio contendo meio de cultura líquido 20g/L (LB Broth - Sigma), os quais foram, em seguida, mantidos sob agitação constante durante 18 horas a 37° C.

A purificação do plasmídeo foi feita a partir de 3 mL do meio líquido, pelo método de lise alcalina, utilizando o kit Perfectprep[®] Plasmid Mini (Eppendorf), de acordo com as instruções do fabricante.

A presença do fragmento foi confirmada através de digestão do plasmídeo no sítio de restrição da enzima *Eco RI* (Biolabs). A reação, contendo 2 µL de tampão, 1 µL da enzima, 15 µL de água e 100 ng de DNA plasmidial, foi mantida a 37°C durante 2 horas. O produto da reação foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1%.

3.6. Seqüenciamento e análise das seqüências

Os fragmentos de cDNA diferencialmente expressos clonados foram encaminhados para seqüenciamento ao Laboratório de Hanseníase (FIOCRUZ, Rio de Janeiro), sob a coordenação do Dr. Milton Ozório de Moraes. O seqüenciamento foi realizado com o kit ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing kit (PE Applied Biosystems).

As seqüências obtidas foram analisadas através do programa computacional BioEdit e comparadas com o banco de dados disponíveis no banco de genes. A análise comparativa dos dados foi feita com o programa BLASTX (<http://ncbi.nlm.nih.gov//BLAST/>).

3.7. Iniciadores

Após seqüenciamento dos fragmentos clonados, obtidos pela hibridização subtrativa, utilizamos o programa BioEdit para a análise das seqüências obtidas e o

programa Primer 3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) para desenhar os iniciadores, bem como para analisar suas características gerais, visando obter uma maior eficiência nas reações de amplificação pela reação em cadeia da polimerase (PCR).

Os pares de iniciadores obtidos foram denominados PL 48 (*antisense*) e PR 475 (*sense*), cujas seqüências são respectivamente: 5'- CTT CAC TAC CAG TCT CCT CCC ACC AC – 3' e 5'- AGA CCT CAC ACTCATCCG GAC AGA CAG – 3', sendo o tamanho do fragmento esperado igual a 427 pb.

Paralelamente, foram também desenhados iniciadores para a amplificação da seqüência correspondente a um gene constitutivo a ser utilizado como gene referência ou gene normalizador, o gene da enzima Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH). Os pares de iniciadores obtidos foram denominados GAPDHF e GAPDHR, cujas seqüências são respectivamente: 5' - ACT CCA AAG ACC AGA ACA TCG T - 3' e 5' - CAA AGC TGT CGG AAA GGT TAT C - 3' , sendo o tamanho do fragmento esperado de 275 pb.

3.8. Extração do RNA total

A extração do RNA total foi realizada pelo método TRIzol (Invitrogen), seguindo protocolo modificado em nosso laboratório. Do tecido excisado, 100 mg foram transferidos para um microtubo livre de DNase e RNase, ao qual foi adicionado 1 mL de TRIzol. Após homogeneização, como o auxílio de um homogeneizador de tecidos, as amostras foram incubadas por 1 hora a temperatura ambiente, sendo, em seguida, adicionados 200 µL de clorofórmio. Após vigorosa agitação por 15 segundos, as amostras foram incubadas por 30 minutos no gelo. Os tubos foram centrifugados a 14.000 x g por 30 minutos a 4°C e a fase aquosa foi coletada e transferida para tubos limpos. À fase aquosa foram adicionados 500 µL de isopropanol, seguidos de incubação por 10 minutos a temperatura ambiente. Após a incubação, o material foi centrifugado a 14.000 x g por 40 minutos à 4°C. O sobrenadante foi descartado e, após a adição de 1 mL de etanol, o material foi novamente centrifugado, a 7.500 x g à 4°C. O sobrenadante foi descartado e, após secagem do precipitado a temperatura ambiente, o material foi ressuscitado em 20 µL de água tratada com DEPC e armazenado a -80°C.

A concentração do RNA total foi determinada pela razão das absorvâncias determinadas a 260 e 280 nm (A_{260}/A_{280}).

3.9. Síntese do cDNA

Para a síntese do cDNA foi realizada a transcrição reversa, utilizando o sistema comercial *Omniscript RT Kit* (Qiagen). Este sistema apresenta uma transcriptase reversa multifuncional com três atividades distintas, tornando o processo mais rápido em relação aos protocolos tradicionais. Além de apresentar atividade como DNA polimerase RNA-dependente e DNA polimerase DNA-dependente, comum às outras transcriptases, esta enzima apresenta atividade de exoribonuclease. Desta forma, a combinação destas três atividades permite a síntese do cDNA e a degradação do RNA molde em uma única reação. A obtenção do cDNA, a partir do RNA, foi realizada utilizando como iniciador oligo-dT₁₅ (Promega), o qual hibridiza especificamente com a cauda poli-A das moléculas de RNA mensageiro.

As reações de transcrição reversa (RT) foram realizadas com 2µg de RNA molde, tampão RT 1x, 2 mM de dNTPs (concentração final), 1 mM de oligo-dT (concentração final), 10 U de inibidor de Rnase, 4 U de Omniscript Reverse Transcriptase em um volume final de 20 µL, completado com água livre de DNase e RNase. A reação foi incubada a 37°C durante 1 hora. O material resultante foi guardado em alíquotas a -20°C. A concentração do cDNA sintetizado foi determinada pela razão das absorvâncias determinadas a 260 e 280 nm (A_{260}/A_{280}).

3.10. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para otimizar e padronizar as condições para a amplificação do cDNA pela reação de PCR, cada par de iniciador foi utilizado em um ensaio preliminar para confirmar sua especificidade e o número de ciclos em que a quantidade de cDNA formado pudesse ser avaliada durante a fase exponencial.

Como a reação de PCR é baseada no aumento logarítmico da quantidade de produto formado em um intervalo de tempo, não é possível comparar simultaneamente a

expressão de múltiplos genes. Assim, as reações para o gene alvo (*ALAS*) e o gene controle (*GAPDH*) foram realizadas separadamente.

Para cada reação de PCR, a concentração de cada uma das amostras foi ajustada de modo a apresentar 1,2 µg de cDNA em um volume final de 20 µL, contendo: 2 µL de Tampão 10X; 0,4 µL de dNTP (2,5 mM); MgCl₂ (50 mM); 0,4 µL de Iniciador *forward* (10 mM); 0,4 µL de Iniciador *reverse* (10 mM) e 0,2 µL de Taq polimerase (5 U/µL).

Os programas utilizados para as reações de amplificação estão mostrados na Tabela 2. O número de ciclos para cada reação variaram de acordo com a padronização obtida para cada tecido utilizado (26 e 27, para as brânquias e para a glândula digestiva, respectivamente). Para testar a eficiência dos iniciadores e confirmar a presença do fragmento nos clones, foram utilizados 30 ciclos.

Tabela 2. Programas utilizados nos experimentos de PCR

Gene	Programa	Tamanho do fragmento esperado
ALAS	94°C por 30 s	427 pb
	58°C por 30 s	
	72°C por 30 s	
GAPDH	94°C por 15 s	275 pb
	49°C por 45 s	
	72°C por 1 min	

Os produtos de PCR (10µl da reação) foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,2% em tampão TAE 1x, sendo visualizados com brometo de etídeo (0,7µg/mL), sob luz U.V. O gel foi fotografado e o tamanho do fragmento obtido foi comparado com o marcador de peso molecular 1kb Plus (Amersham).

3.11. Reações de PCR semiquantitativo

A variação dos níveis de mRNA nas amostras foi avaliada a partir das condições determinadas na padronização da reação de PCR. Para cada condição foram utilizados o cDNA de 5 ou 6 indivíduos, de acordo com a disponibilidade do tecido a ser analisado.

Os produtos de PCR foram visualizados e fotografados conforme descrito anteriormente (item 2.10).

3.12. Análise dos resultados

Após a fotodocumentação dos géis, as imagens foram digitalizadas e a densitometria das bandas foi realizada através do programa *Scion Image for[®] Windows*.

A análise da normalidade dos dados foi realizada através do teste Kolmogorov Smirnov, utilizando-se um $p < 0,05$, através do programa Statistica 6.0. Os dados de densitometria dos fragmentos amplificados foram comparados estatisticamente pelo teste t de Student após confirmação da normalidade dos dados.

regiões dentro da seqüência correspondente aos iniciadores (PL48 e PR475), utilizados neste trabalho para amplificação posterior do fregmento de 427pb, também mostradas.

4.2. Iniciadores

Foram realizados ensaios preliminares com os iniciadores desenhados utilizando-se o programa computacional Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi), a partir da seqüência obtida na hibridização subtrativa e comparação com seqüências de bancos de dados disponíveis em rede. Os iniciadores desenhados através do referido programa, tanto para o gene da ALAS quanto para o da GAPDH, foram alinhados com as seqüências existentes, de modo a avaliar sua especificidade em relação aos respectivos genes e o restante do genoma.

Os pares de iniciadores geraram fragmentos dentro do tamanho esperado e com grande especificidade, gerando uma banda única de 427 pb para o gene *ALAS* e uma banda única de 275 pb para o gene da GAPDH (Figura 10).

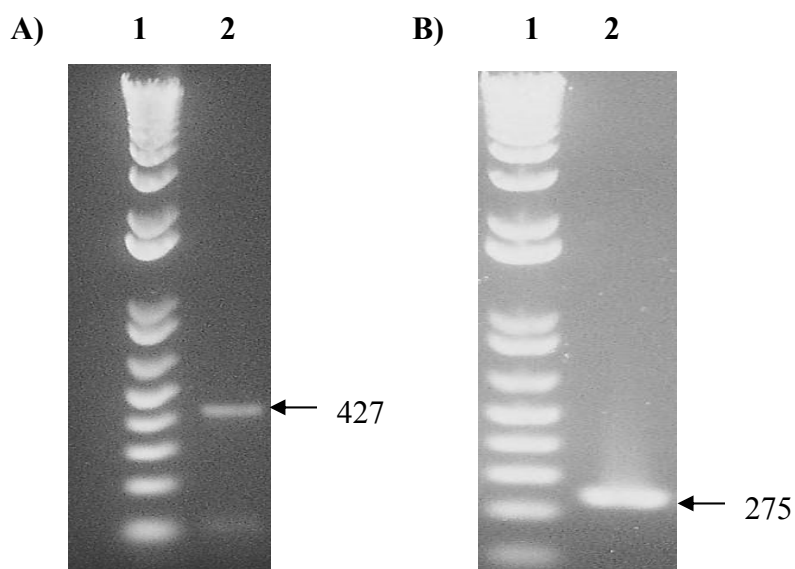


Figura 10. Perfil da eletroforese em gel de agarose 1,2% em TAE 1X, utilizada para avaliar a eficiência dos iniciadores para *ALAS* e *GAPDH*, após a reação de amplificação (PCR). (A) 1. Marcador de peso molecular 1 kb Plus Ladder (Amersham); 2. fragmento de 427 pb, correspondente à amplificação da seqüência parcial do gene da ALAS; (B) 1. Marcador de peso molecular 1kb Plus Ladder (Amersham); 2. Fragmento de 275 pb, a partir do conjunto de cDNA de indivíduos tratados e não tratados.

4.3. Padronização das condições de PCR

A padronização das condições para a realização da RT-PCR semiquantitativa, de modo a se determinar o ponto no qual a reação encontrava-se ainda na fase exponencial, foi realizada utilizando-se diferentes números de ciclos da reação, para cada par de iniciadores de cada um dos genes, a partir de uma mesma quantidade inicial de cDNA, visando comparar a variação na síntese de produtos entre os indivíduos tratados e não tratados em relação ao gene controle.

Conforme mostrado na Figura 11.A, os ciclos testados nas brânquias para o gene *ALAS* foram 20, 25, 30 e 35 enquanto que 20, 23, 25, 28 e 30 ciclos foram testados para *GAPDH*. Para a glândula digestiva, testamos os ciclos 20, 25, 30 e 35 para *ALAS* e 25, 30 35, 40 e 45 para *GAPDH*.

Após análise densitométrica das bandas, determinamos o número de ciclos a serem usados nos experimentos de RT-PCR semiquantitativo. Para as brânquias foram estabelecidos 26 e 27 ciclos para *ALAS* e *GAPDH*, respectivamente. Para a glândula digestiva, 27 e 30 ciclos foram os determinados para *ALAS* e *GAPDH*, respectivamente (Figura 11.B).

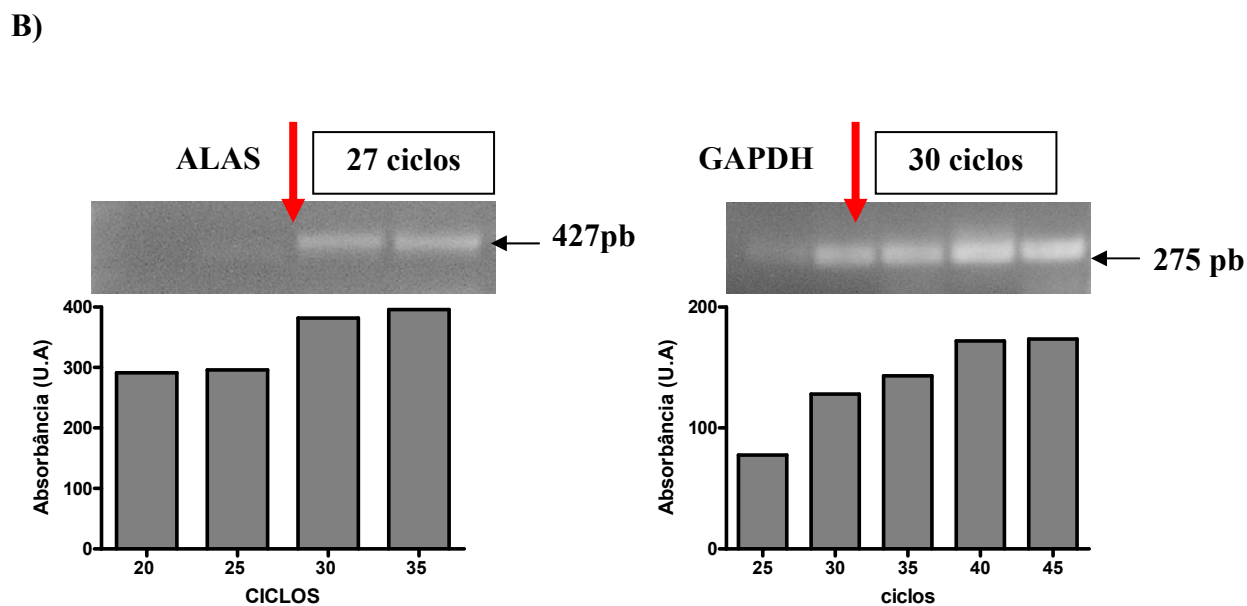
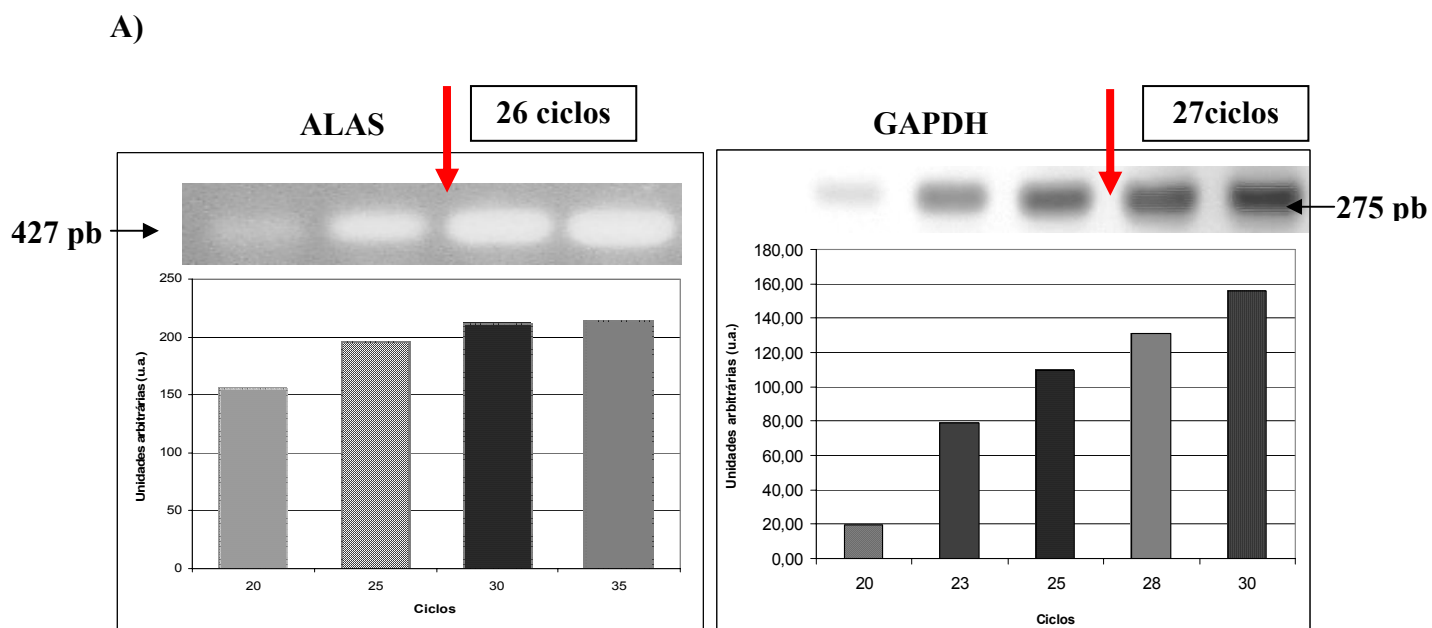
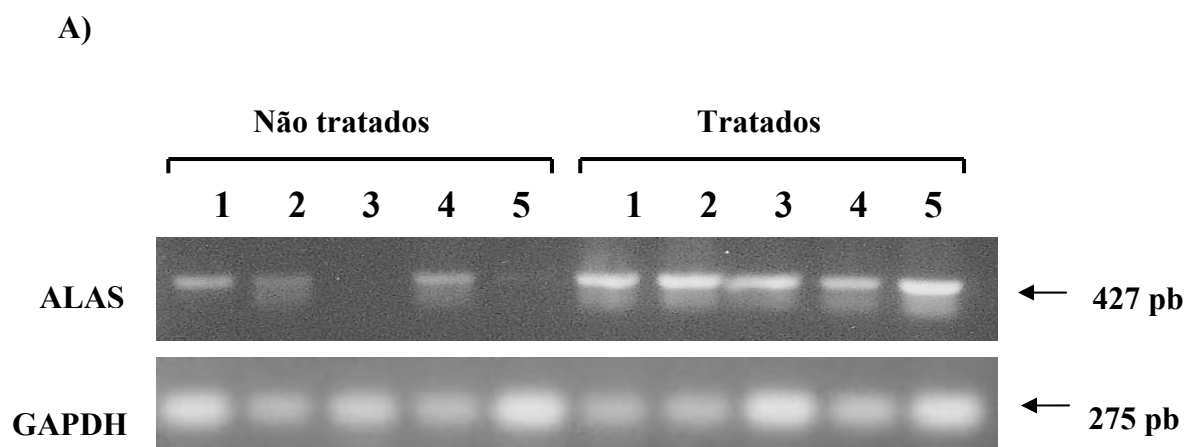


Figura 11. Perfil da eletroforese em gel de agarose 1,2%, TAE 1X. Produtos de PCR obtidos na curva de expressão para determinação do número de ciclos para padronização das reações de PCR semiquantitativo para diferentes tecidos e gráficos da densitometria para determinação do ponto de saturação das reações. A) Brânquias e B) Glândula digestiva. As setas indicam o número de ciclos identificados como ideal.

4.4. RT-PCR semiquantitativo

A reações foram realizadas separadamente de acordo com o tecido e genes alvo e controle. Utilizamos o gene da GAPDH para normalizar os níveis de cDNA presentes nas amostras. Apesar de todos os indivíduos apresentarem a banda correspondente à amplificação do gene controle, a intensidade captada pela densitometria demonstra que ocorrem variações internas, que podem ser consideradas normais entre os indivíduos de uma população.

Assim, a quantidade relativa de cDNA, que reflete a quantidade inicial de RNA total, foi determinada através da relação densitométrica *ALAS*/GAPDH. Comparamos as relações obtidas na densitometria dos indivíduos tratados e não tratados nos diferentes tecidos: brânquia e glândula digestiva. Nas brânquias observamos que entre os indivíduos tratados, o gene *ALAS* foi induzido 0,59 vezes (Figura 12). Na glândula digestiva observamos que houve uma pequena indução do gene *ALAS* no grupo tratado. Entretanto, esta indução não foi significativa, gerando uma relação de 0,93 (Figura 13). Este resultado próximo a 1 demonstra que a variação na expressão do gene *ALAS* foi mínima e com isso não podemos afirmar que realmente ocorreu indução ou repressão do gene neste tecido.



B)

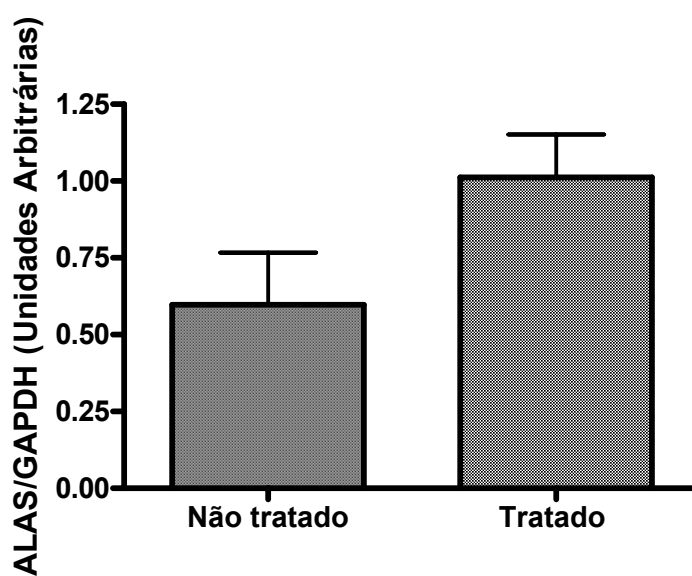


Figura 12. Avaliação semiquantitativa da variação da expressão do gene *ALAS* em brânquias de ostras *C. gigas* após 48 horas de exposição a esgoto doméstico a 33%. A) Gel de agarose 1,2%, TAE 1X. Diferença de expressão do gene *ALAS* e *GAPDH* (normalizador) entre grupo tratado e não tratado. B) Aumento de 68% na expressão do gene após tratamento. O gráfico mostra a relação entre a intensidade densitométrica das bandas geradas pela expressão do gene *ALAS*, normalizadas com *GAPDH* para cada indivíduo ($P > 0,05$).

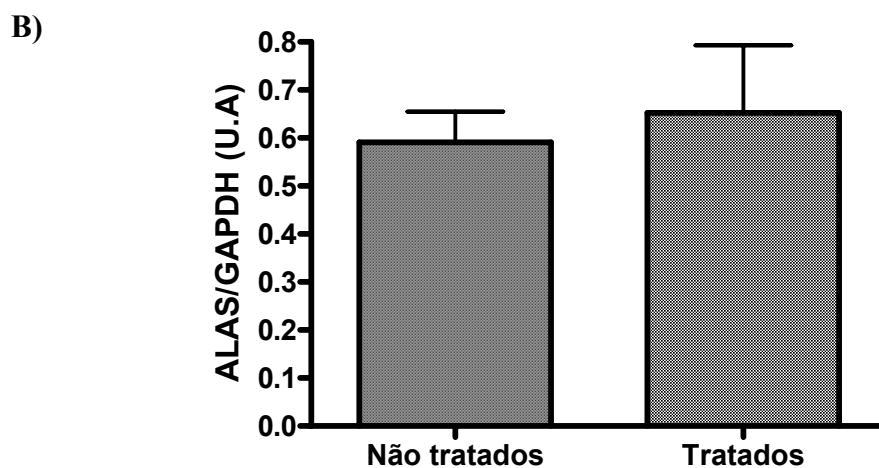
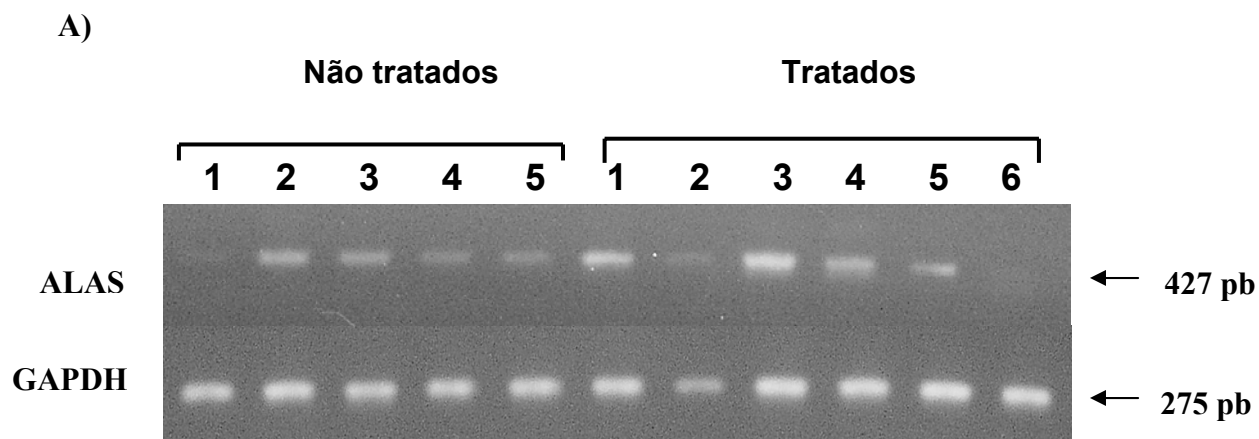


Figura 13. Avaliação semiquantitativa da variação da expressão do gene *ALAS* em Glândula digestiva de ostras *C. gigas* após 48 horas de exposição a esgoto doméstico a 33%. A) Gel de agarose 1,2%, TAE 1X. Diferença de expressão do gene *ALAS* e *GAPDH* (normalizador) entre indivíduos do grupo tratado e não tratado. B) Aumento não significativo na expressão do gene após tratamento. O gráfico mostra a relação entre a intensidade densitométrica das bandas geradas pela expressão do gene *ALAS*, normalizadas com *GAPDH* ($P > 0,05$).

5. Discussão

A implementação de programas de monitoramento do ambiente aquático pode reduzir, ou mesmo evitar, o impacto ambiental sobre os recursos hídricos. Desta forma, a identificação e a caracterização de genes expressos diferencialmente sob condições de impacto antropogênico, decorrente da exposição à xenobióticos, bem como alterações no padrão de expressão destes genes, representam uma ferramenta valiosa para o delineamento de estratégias que visem garantir a qualidade da água para o consumo e para as atividades de produção aquícola.

O desenvolvimento de métodos específicos, sensíveis e rápidos para avaliar o grau de comprometimento ou a qualidade do ambiente aquático é desejável e não deveriam ser baseados unicamente na detecção de patógenos bacterianos ou em análises físico-químicas. As metodologias atuais utilizadas na determinação de qualidade sanitária da água, baseadas no monitoramento dos níveis de coliformes fecais, por exemplo, têm se mostrado ineficientes para a detecção de enterovírus e protozoários, além da grande variedade de xenobióticos presentes no esgoto doméstico (HALLING-SØRENSEN *et al.*, 1998; MUNIAIN-MUJICA *et al.*, 2003).

O presente estudo está inserido dentro de um projeto em curso, o qual tem como objetivo o estabelecimento de um “Programa de Controle e Monitoramento de Águas Destinadas ao Consumo Humano e Cultivo de Bivalves” (CNPq-Proc. 475995/2003-1), através do desenvolvimento de uma metodologia capaz de identificar o impacto gerado pela contaminação desses recursos hídricos pelo esgoto produzido em áreas com grande concentração de atividades humanas e industriais. Assim, alterações dos níveis de expressão do gene *ALAS* foram analisadas em ostras *C. gigas* expostas à esgoto doméstico, em condições de laboratório

Apesar de reconhecermos a necessidade de uma maior caracterização do esgoto não-tratado utilizado no presente trabalho, devemos destacar que nosso objetivo foi avaliar a resposta de um determinado gene de um organismo indicador frente a uma mistura de contaminantes para, posteriormente, poder relacioná-la à presença de um grupo de contaminantes específicos, presentes no esgoto. Sendo assim, os diferentes padrões de resposta podem identificar esgotos com maiores teores de uma classe ou contaminantes específicos em sua composição. Dados sobre a composição química e microbiológica do esgoto doméstico não-tratado utilizado nos experimentos de

exposição nos permitiriam possivelmente rastrear alterações mais específicas na expressão de genes em resposta a determinado contaminante presente em diferentes concentrações.

Os dados referentes ao esgoto utilizado neste trabalho foram obtidos através da CASAN, sendo as análises realizadas por técnicos da própria companhia (Tabela 3). Cabe salientar que a exposição dos animais foi realizada com uma diluição de 33% do esgoto doméstico, visando possibilitar a manutenção da salinidade na faixa de 25. De acordo com estudos anteriores desenvolvidos em nosso laboratório, nesta faixa de salinidade ocorre um aumento na atividade das defesas antioxidantes nas brânquias da ostra *C. rhizophorae*, favorecendo, assim, a variação da expressão de genes envolvidos no processo de biotransformação e conjugação de xenobióticos, seja por indução ou por repressão (SILVA et al., 2005). Segundo Castro et al. (1985), ostras da espécie *C. rhizophorae* apresentam maior taxa de filtração nas salinidades 20 e 25, com valores de 1,33 e 1,4 L/h, respectivamente, a temperatura de 24°C. Esta taxa de filtração mais elevada aumenta a disponibilidade de energia oriunda da alimentação, propiciando condições mais adequadas para uma conjugação eficiente de xenobióticos.

Tabela 3.: Parâmetros referente ao esgoto utilizado neste estudo (CASAN, 2007).

pH	Alcalinidade mg/L CaCO₃	Cloretos mg Cl/L	DBO mg/L	DQO mg/L	Coli. Totais NMP/100mL	Coli. Fecais NMP/100mL
6,51	18,24	203	280	370	2,7x10 ⁹	4,7x10 ⁴

Legenda: DQO (Demanda Química de Oxigênio); DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio); Coli (Coliformes); NMP (Número mais provável).

A expressão diferencial de genes vem se tornando uma ferramenta cada vez mais utilizada na elucidação dos mecanismos moleculares associados às alterações ambientais. Para organismos invertebrados, muitos pesquisadores têm obtido sucesso ao utilizar esta abordagem para a identificação de genes envolvidos nas respostas imunes e respostas celulares frente à presença de contaminantes químicos e alterações das condições ambientais (LIAO et al., 2002). Algumas proteínas homólogas de vertebrados têm sido encontradas em organismos invertebrados utilizados como modelo, em resposta a diferentes mecanismos de resposta a estresse (STEVENSON et al., 2006; CELLURA et

al., 2007; GONZALEZ et al, 2007; PREVODNIK et al, 2007). Entre elas estão as Metalotioneínas (MT), a Superóxido dismutase (SOD), a Ubiquitina, a Catalase (CAT), as isoenzimas da família da Glutathione-S-transferase (GST) e as Proteínas de Choque Térmico (*Heat-shock proteins, HSP*) ou de Estresse, tanto de alto, como de baixo peso molecular (GIGLIO et al., 1994 ; BOUTET et al., 2002; BOUTET et al., 2004; HUVET et al., 2004; TANGUY et al., 2005).

Conforme mencionado anteriormente, este trabalho teve início a partir de uma biblioteca de cDNA, obtida a partir de um experimento de hibridização subtrativa realizado em nosso laboratório. Dentre os diferentes fragmentos clonados, identificados como genes diferencialmente expressos em brânquias de *C. gigas* após a exposição ao esgoto doméstico, optamos por trabalhar com um fragmento de 540 pb, cuja seqüência, após análise comparativa em bancos de dados, revelou identidade com parte da seqüência do gene que codifica para a enzima 5-aminolevulinato sintase (ALA-S). A comparação com seqüências disponíveis em bancos de dados encontrou homologia com mais de 500 seqüências, sendo registrado alto *score*, ou seja, entre 80 e 200, de diferentes espécies animais, para o gene que codifica a enzima 5-aminolevulinato sintase (ALA-S). Este resultado aumenta a confiabilidade na identificação de um gene que apresenta alto grau de conservação durante a evolução das espécies (DUNCAN et al., 1999). Com base nestes resultados, foram desenhados iniciadores para as extremidades 5' e 3' do fragmento e, através da amplificação por PCR, confirmamos a especificidade e eficiência deste par de oligonucleotídeos, sendo gerado um fragmento único de 427 pb. A partir destes resultados, foram realizados os ensaios de RT-PCR semiquantitativo.

A maioria dos fragmentos de cDNA gerados através de expressão diferencial contém a região 3' não traduzida. Para a grande maioria dos invertebrados, não há genomas e genes inteiramente sequenciados para podermos inferir o tamanho total do gene com o qual estamos trabalhando. Por isso, utilizamos o kit Smart Race (Clontech) na tentativa de amplificarmos as extremidades das regiões 5' e 3' para possibilitar o sequenciamento total do gene. Entretanto, apesar de conseguirmos amplificar as regiões com eficiência (resultados não mostrados), não obtivemos resultados positivos com o sequenciamento. Acreditamos que este resultado tenha sido decorrente da metodologia utilizada para a purificação das bandas retiradas do gel de agarose, o que não permitiu obter uma concentração satisfatória da amostra para as reações de sequenciamento.

A aplicação da metodologia de RT-PCR semiquantitativo permite a análise da expressão de RNAm de um gene induzível, na presença de determinado xenobiótico, em relação a um gene constitutivo. Em muitos estudos, o foco não é a avaliação de pequenas variações ou mesmo, do número exato de moléculas presentes, mas, sim, do aumento ou decréscimo na faixa mínima de uma ou duas vezes nos níveis de mRNA expresso. Apesar da significativa precisão das tecnologias desenvolvidas mais recentemente, os métodos semiquantitativos, são ainda largamente empregados e considerados como apropriados para várias situações ou vários objetivos (MARONE et al., 2001). De modo a assegurar uma análise quantitativa, a utilização desta estratégia metodológica deve considerar ainda, como base comparativa, a expressão de um gene constitutivo (controle interno) (MARONE et al., 2001). Desta forma, podemos identificar genes ou grupos de genes que apresentem determinado padrão de expressão na resposta à alterações ambientais e utilizá-los como biomarcadores moleculares

Evidências demonstram que todos os genes são regulados por alguma condição que pode, potencialmente se manifestar em campo (BUSTIN, 2000; HUGGETT et al., 2005). Por isso, o estabelecimento de um gene controle adequado constitui uma escolha determinante para o sucesso da aplicação do RT-PCR semiquantitativo, uma vez que não existe um gene controle ideal. Cada caso exige a análise de um gene candidato a controle, adequado para uma condição específica. Assim, mesmo sendo a normalização realizada contra um gene controle que deve apresentar uma expressão uniforme, ou seja, um gene constitutivo do organismo, como mencionado anteriormente, mesmo aqueles genes considerados como “*housekeeping*” sofrem pequenas variações na sua expressão, em diferentes condições (CHRISTOPHER; DIPAK, 2005).

Neste trabalho, utilizamos como controle o gene que codifica para a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) (EC 1.2.1.12), uma enzima glicolítica envolvida na produção de energia celular. É uma das mais abundantes proteínas celulares, expressa em diferentes tipos celulares e o gene que a codifica é considerado como um gene “*housekeeping*”. Entretanto, estudos vem demonstrando que esta proteína desempenha papel importante em outras vias metabólicas, indicando que seu papel não está restrito apenas à funções glicolíticas, mas também à fusão de membrana, atividade fosfotransferase, replicação e reparo do DNA (SIROVER, 1999; HARA; CASCIO; SAWA, 2006). Para este trabalho, a eficácia da utilização deste gene foi confirmada através de experimentos de RT-PCR semiquantitativo para o gene da

GAPDH, apresentando um padrão de expressão homogêneo entre os indivíduos submetidos às mesmas condições. Entretanto, o mesmo não aconteceu para o gene que codifica para a β -actina. A variação na expressão do gene impossibilitou sua utilização como gene controle/normalizador neste trabalho (resultados não mostrados).

Como resultado da padronização do número de ciclos a ser utilizado, foi definido 26 e 27 ciclos para a amplificação do fragmento do gene *ALAS* e 29 e 30 ciclos para amplificação do fragmento do gene *GAPDH*, em brânquias e glândula digestiva respectivamente. Estes ciclos correspondem ao número mínimo de ciclos necessários para que a reação alcance seu ponto de saturação (WANG; DOYLE; MARK, 1989).

Neste trabalho, avaliamos a expressão do gene *ALAS* em diferentes tecidos de *C. gigas* expostas a esgoto doméstico. Observamos que a exposição não foi capaz de promover variação significativa do gene em glândula digestiva. O grupo que foi exposto apresentou níveis de expressão do RNAm de *ALAS* muito próximos aqueles observados no grupo controle, após a normalização dos resultados. Entretanto, a expressão do gene nas brânquias apresentou uma grande variação entre os grupos. Observamos um aumento de 68% nos níveis de expressão do grupo exposto em relação ao grupo controle. Acreditamos que as brânquias apresentaram uma maior variação na expressão em relação a glândula digestiva em decorrência das suas distintas funções biológicas. As brânquias de animais filtradores como a *C. gigas* funcionam como uma peneira, retendo partículas que ficam suspensas na água, que depois são levadas à boca e ingeridas, enquanto a glândula digestiva tem como função promover a digestão enzimática desses alimentos (NIELSEN, 2002). Logo, as brânquias ficam em contato com o meio ambiente, e por consequência com os contaminantes ali presentes, e este contato pode ter gerado uma maior ativação do gene *ALAS*. Além disso, a análise dos níveis de expressão do RNAm da *ALAS* em diferentes tecidos da ostra *C. gigas*, demonstrou que os níveis basais de expressão são mais altos na glândula digestiva em relação às brânquias, manto e músculo (dados não mostrados). Isso sugere que quando exposta ao esgoto doméstico a 33%, a expressão do gene nas brânquias apresenta maior variação níveis de expressão, pois este tecido parte de uma concentração menor de RNAm do que a glândula digestiva, um órgão que promove a biotransformação de contaminantes em moluscos bivalves e por este motivo apresenta concentrações basais mais altas que as brânquias.

A enzima 5-aminolevulinato sintase catalisa o primeiro passo da biosíntese de tetrapirróis, promovendo a condensação de succinil-CoA e glicina (SHEMIN, 1955). Heme é um tetrapirrol que serve de gupamento prostético para diversas proteínas conjugadas como mioglobinas, hemoglobinas, ubiquinonas e citocromos.

Nos vertebrados, a isoforma ALAS2 é fortemente induzida em células eritróides durante a hematopoiese, para a formação de hemoglobina. Por outro lado, a isoforma ALAS1 é expressa em todos os tecidos para prover heme para os citocromos respiratórios e outras hemoproteínas (SADLON et al., 1999). Sob certas condições, a biosíntese de heme gera espécies reativas de oxigênio por dois mecanismos gerais: oxidação aeróbica de precursores do ácido aminolevulínico por metais e reações fotoquímicas da protoporfirina IX (RYTER; TYRREL, 2000). Desta forma, as condições a que foram submetidas as ostras, expostas a esgoto doméstico, pode ter alterado o metabolismo de heme em virtude da demanda energética empregada no processo de detoxificação em resposta às diferentes classes de contaminantes presentes no esgoto.

Muitos trabalhos indicam uma co-regulação na síntese de heme pela atividade do citocromo P450 (CYP). O heme livre é encontrado em baixas concentrações no interior das células, pois seu aumento causa efeitos citotóxicos (MAY et al., 1995). Assim, a demanda por heme pode aumentar em resposta ao aumento da síntese e atividade do citocromo P450 durante a metabolização ou biotransformação de algumas drogas (LOUIS et al., 1998; IBA et al., 1999). Nesta situação, os níveis de RNAm de ALAS1 são aumentados com o objetivo de suprir a demanda de heme dos apocitocromos. Sob condições fisiológicas normais, os níveis de heme livre é baixo e severamente regulado devido ao potencial efeito tóxico que ocorre com o aumento da concentração de heme não incorporado. Após a acumulação do RNAm e da proteína ALAS1, heme reprime a expressão de *ALAS1* por mecanismos de “*feedback*” negativo ainda não bem esclarecidos, os quais inibem o transporte de ALAS1 para o interior da mitocôndria, aumentando a degradação de heme pela indução da atividade heme oxigenase (CABLE; MILLER; ISOM, 2000). Desta maneira, a célula é capaz de suprir sua demanda de heme sem que os níveis de heme livre, bem como de seus precursores, atinjam níveis potencialmente tóxicos para o seu metabolismo.

Entretanto, outros estudos têm demonstrado que a regulação pode ocorrer pela ativação direta da transcrição do gene *ALAS1* por algumas drogas, devido à presença de

sequências capazes de interagir com xenobióticos, funcionando como xenosensores (JOVER, HOFFMANN; MEYER, 1996; FRASER et al., 2003; PODVINEC et al., 2004). Entre as diferentes sequências “enhancers” dos genes CYP, os receptores nucleares tem se mostrado essenciais na ativação transcripcional desses genes em resposta a drogas (STOLTZ; ANDERSON, 1999; PODVINEC, et al., 2002). Duas sequências desses elementos presentes na região 5'-UTR do gene *ALAS1* humano também são encontradas nos receptores X pregnano, androstano e “chicken xenobiotic-sensing”. No gene *ALAS1* esses elementos são chamados “*aminolevulinic acid synthase drug-responsive enhancer sequence*” (ADRES) (FRASER et al., 2002). Isso reforça a idéia de que estas sequências promovem a ativação do genes através de motivos específicos capazes de interagir com uma variedade de compostos exógenos e endógenos.

Estudos têm demonstrado que nas células hepáticas, a síntese da ALAS pode ser induzida por diferentes compostos, como o *N*-alil-*N*-isopropilacetamida, o qual é bastante ativo e, ainda, por diversos medicamentos de uso comum, como anti-micóticos (Griseo-fulvin, por exemplo), fenobarbital e outros barbitúricos (KARLSON, GEROK; GROSS, 1989; DOGRA; MAY, 1996). A indução por estas classes de compostos parece também ter relação com a indução do P450, durante o processo de biotransformação de xenobióticos. Estudos anteriores mostraram que a administração de fenobarbital em células de hepatócito de galinha induziu o aumento nos níveis de

mRNA de ALAS e CYP2H1 em 15 e 10 veze, respectivamente (DOGRA et al., 1993). Aparentemente, não apenas substâncias exógenas podem agir como indutoras da síntese da ALAS mas também alguns esteróides que podem ocorrer como produtos intermediários ou finais do metabolismo de lipídeos, como o 17-hidroxi-5 β -androstano-3-ona, porém não os hormônios esteróides fisiológicos (KARLSON et al., 1989).

Moluscos bivalves vêm sendo amplamente utilizados em programas de biomonitoramento, uma vez que apresentam características como ampla distribuição geográfica, além de serem sésseis; abundantes e filtradores (WALKER et al, 1996). As respostas bioquímicas apresentam potencial demonstrado como biomarcadores de contaminação ambiental, sendo que a caracterização das diferentes classes e tipos isoenzimáticos pode determinar a susceptibilidade de uma espécie animal a um inibidor ambiental específico (MORA; FOURNIER; NARBONNE, 1999; BINELLI et al., 2006; ZANETTE; MONSERRAT; BIANCHINI, 2006). O estudo realizado por Silva et al.,

2001 demonstrou diferença significativa entre a acumulação de nove metais-traço pela ostra *Crassostrea rhizophorae*, conferindo ao organismo potencial para sua utilização em programas de biomonitoramento. A espécie ainda apresentou índices de expressão gênica que puderam ser correlacionados com as concentrações de metais detectados na região da Baía de Sepetiba (RJ) (REBELLO, 2001).

O estudo da expressão diferencial de genes de *Dreisseria polymorpha* em contato com arcolor 1254,3 - metilcolantreno, criseno e atrazine foi capaz de identificar 242 mRNA, alguns envolvidos com mecanismos de detoxificação, o quais podem ser potencialmente usados para monitorar os efeitos da poluição aquática por estas classes de compostos (BULTELLE et al., 2002). Estudos utilizando SSH demonstraram diferença na expressão de genes em *Crassostrea gigas*, envolvidos nas bases funcionais da resistência e susceptibilidade a mortalidade no verão, demonstrando de forma satisfatória a utilização desta técnica em ostras (HUVET et al., 2004). A avaliação da resposta dessa mesma espécie de bivalve à contaminação por hidrocarbonetos, levou à clonagem de um total de 258 genes diferencialmente expressos (BOUTET; TANGUY; MORAGA et al., 2004). Uma biblioteca de cDNA gerada por SSH permitiu a identificação de 18 genes que tiveram sua expressão avaliada por RT-PCR em *Crassostrea gigas* expostas a pesticida (TANGUY et al., 2005). A exposição da ostra *C. gigas* à condição de hipoxia em laboratório e a análise de brânquias, manto e glândula digestiva gerou 616 sequências relacionadas a doze funções fisiológicas diferentes, sendo alguns envolvidos com detoxificação de xenobióticos e metabolismo energético (DAVID et al., 2005).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Índices baseados nos níveis de expressão gênica podem ser desenvolvidos para detectar o grau de impacto decorrente de derramamentos de óleo, poluição orgânica, lançamento de pesticidas e outras fontes de contaminação ambiental, como o esgoto doméstico.

A implementação de programas de monitoramento de águas destinadas ao consumo e atividades aquícolas, como o cultivo de moluscos, através da avaliação do grau de contaminação por efluentes domésticos, pode servir de alerta precoce, fornecendo subsídios para a tomada das medidas necessárias para a manutenção da qualidade dos recursos aquáticos.

Neste trabalho, analisamos a expressão de um gene relacionada ao metabolismo do grupo heme em diferentes tecidos (glândula digestiva e brânquias) da ostra *C. gigas*. Nossos resultados demonstraram que, em condições controladas de laboratório, houve uma indução significativa no aumento dos níveis (68%) de RNAm de *ALAS* nas brânquias. Estes dados sugerem que o gene *ALAS* pode ser considerado como um potencial candidato a biomarcador molecular por esgoto doméstico. Por isso, os resultados aqui apresentados serão de fundamental importância para a continuidade desta linha de pesquisa.

Futuramente, temos como objetivo retomar a clonagem e o sequenciamento deste gene para que possamos complementar as análises comparativas com as sequências já descritas, bem como, aprofundar nossos conhecimentos sobre os mecanismos moleculares envolvidos nos processos regulatórios da biosíntese de heme.

Além disso, pretendemos dar continuidade aos experimentos em campo, já iniciados, visando avaliar os níveis de RNAm de *ALAS*, após exposição a esgoto doméstico *in situ*, bem como validar a metodologia aqui empregada nos experimentos realizados em laboratório.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASTNER, I., SCHULZE, J., HEUVEL, J., JAHN, D., SCHUBERT, WD., HEINZ, DW. Crystal structure of 5-aminolevulinatase, the first enzyme of heme biosynthesis, and its link to XLSA in humans. **EMBO Journal**. 24: 3166–3177. 2005.

ATAMNA, H. Heme, iron, and the mitochondrial decay of ageing. **Ageing Res Rev**. 3: 303–318. 2004.

AVERY, EL; DUNSTAN, RH., NELL, JA. The Use of Lipid Metabolic Profiling to Assess the Biological Impact of Marine Sewage Pollution. **Arch. Environ. Contam. Toxicol**. 35: 229–235. 1998.

BAINY AC. Biochemical responses in penaeids caused by contaminants. **Aquaculture**. 191(1-3):163-168. 2000.

BEEBY A., What do Sentinels Stand for? **Environ Pol**. 112: 285-298. 2001.

BERG, JM., TYMOCZKO, JL., STRYER, L. **Oxygen Transporters and Oxidative Phosphorylation in “Biochemistry”** (5th ed.). New York: W. H. Freeman & Co. 2002.

BINELLI, A., RICCIARDI F., RIVA, C., PROVINI, A. New evidences for old biomarkers: Effects of several xenobiotics on EROD and AChE activities in Zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). **Chemosphere**. 62: 510–519. 2006.

BONNIE R., CAREY M., PETSONK A. Protecting terrestrial ecosystems and the climate through a global carbon market. *Philos Transact A Math Phys Eng Sci*. 15; 360 (1797):1853-73. 2002.

BOUND, JP., VOULVOULIS, N. Predicted and measured concentrations for selected pharmaceuticals in UK rivers: Implications for risk assessment. **Water Res**. 40 (15):2885-92. 2006.

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

BOUTET I., TANGUY A., AUFFRET M., RISO R., MORAGA D. Immunochemical quantification of metallothioneins in marine mollusks: characterization of a metal exposure bioindicator. **Environ Toxicol Chem**; 21(5):1009-14. 2002.

BRETON RL., TEED RS., MOORE DRJ. An Ecological Risk Assessment of Phenol in the Aquatic Environment. **Human and Ecological Risk Assessment**: 9(2): 549-568. 2003.

BULTELLE, F., PANCHOUT, M., LÉBOULENGER, FJ., DANGER, JM.. Identification of differentially expressed genes in *Dreissena polymorpha* exposed to contaminants. **Mar. Environ. Res**. 54: 385 –389. 2002.

BURGEOT T., BOCQNUÉNÉ G., DIMMET J., SANTELLA RM., GARCIA LM., PFHOL-LESZKOWICZ A., RAOUX C., GLAGANI F. Bioindicators of Pollutan Exposure in the Northwestern Mediterranean Sea. **Mar Ecol Prog Ser.** 131: 125-141. 1996.

BUSS, DF., BAPTISTA, DF., NEISSIMIAN, JL.. Bases conceituais para a aplicação de biomonitoramento em programas de avaliação da qualidade da água de rios. **Cad. Saúde Pública.** 19(2):465-473. 2003.

BUSTIN, SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **J Mol Endocrinol.** 25: 169–193 2000.

CABLE, EE., MILLER, TG., ISOM, HC. Regulation of Heme Metabolism in Rat Hepatocytes and Hepatocyte Cell Lines: d-Aminolevulinic Acid Synthase and Heme Oxygenase Are Regulated by Different Heme-Dependent Mechanisms. **Arch Biochem Biophys.** 384 (2): 15: 280–295, 2000.

CAIRNS, Jr., McORMICK, PV., NIEDERLEHENER, BR. A proposal framework for developing indicators of ecosystems healthy. **Hydrobiologia.** 263:1-44. 1993.

CAJARAVILLE, M.P., BEBIANNO, M.J., BLASCO, J., PORTE, C., SARASQUETEC, C., VIARENGO, A. The Use of Biomarkers to access the impact of pollution in coastal environmental of the Iberian Peninsula: a practical approach. **Sci Total Environ.** 247: 295-311, 2000.

CARREIRA, RS., WAGENER, LR., READMAN, JW. Sterols as markers of sewage contamination in a tropical urban estuary (Guanabara Bay, Brazil): space–time variations. **Est Coast Shelf Sci.** 60: 587–598. 2004.

CARULLI JP., ARTINGER M., SWAIN PM., ROOT CD., CHEE L., TULIG C., GUERIN J., OSBORNE M., STEIN G., LIAN J., LOMEDICO PT. High throughput analysis of differential gene expression. **J Cell Biochem Suppl.** 30-31:286-96. 1998.

CASTRO EM., URPI OP., MADRIZ EZ., QUESADA RQ., MONTOYA JA. Tasa de Filtración del Ostión de Manglar (*Crassostrea rhizophorae*, Guilding 1828), a Diferentes Salinidades y Temperaturas. **Revista de Biología Tropical.** 33(1): 77-79. 1985.

CELLURA C, TOUBIANA M, PARRINELLO N, ROCH P. Specific expression of antimicrobial peptide and HSP70 genes in response to heat-shock and several bacterial challenges in mussels. **Fish Shellfish Immunol.** (4):340-50. 2007.

CHALER, R. SIMONEIT, BRT., GRIMALT., JO. Bile acids and sterols in urban sewage treatment plants. **J Chromatogr A.** 927: 155–160. 2001.

CHELOMIN VP, BELCHEVA NN Alterations of microsomal lipid synthesis in gill cells of bivalve mollusc *Mizuhopecten yessoensis* in response to cadmium accumulation. **Comp Biochem Physiol.** 99C (1/2):1–5. 1991.

CHENG CY., WU CY., WANG CH., DING WH. Determination and distribution characteristics of degradation products of nonylphenol polyethoxylates in the rivers of Taiwan. **Chemosphere**. 65: 2275–2281. 2006.

CHRISTEN P., METHA PK. From cofactor to enzymes. The molecular evolution of pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzymes. **Chem Rec**. 1(6):436-47. 2001.

CHRISTOPHER, R. DIPAK, D. The benefits of 28S rRNA for standardization of reverse transcription polymerase chain reaction for studying gene expression. **Anal. Biochem**. 15;341(2):382-4. 2005.

COSTA PM., VAZ-PIRES P., BERNARDO F. Antimicrobial resistance in *Enterococcus* spp. isolated in inflow, effluent and sludge from municipal sewage water treatment plants. **Water Res**. 40(8):1735-40. 2006.

COX TC, BAWDEN MJ, MARTIN A, MAY BK. Human erythroid 5-aminolevulinate synthase: promoter analysis and identification of an iron-responsive element in the mRNA. **EMBO J**. 10(7):1891-902. 1991.

DANOVARO R, ARMENI M, CORINALDESI C, MEI ML. Viruses and marine pollution. **Mar Pollut Bull**.46(3):301-4. 2003.

DANIELL WE., STOCKBRIDGE HL., LABBE RF., WOODS JS., ANDERSON KE, BISSELL DM., BLOOMER JR., ELLEFSON RD., MOORE MR., PIERACH CA., SCHREIBER WE., TEFFERI A., FRANKLIN GM. Environmental chemical exposures and disturbances of heme synthesis. **Environ Health Perspect**. 105 Suppl 1: 37-53. 1997.

DAVID, E., TANGUY, A., PICHAVANT, K MORAGA, D. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hypoxia exposure under experimental conditions. **FEBS Journal**. 272: 5635–5652. 2005.

DIATCHENKO, L., LAU, FC., CAMPBELL, AP., CHENCIK, A., MOQADAM, F., HUANG, B., LUKYANOV, K., GURSKAYA, N., VERDLOV, ED., SIEBERT, PD. Suppression subtractive hybridisation: method for generating differentially regulated or issue-specific cDNA probes and libraries. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 93: 6025–6030. 1996.

DOGRA SC., MAY BK. Phenobarbital-induced activation of CYP2H1 and 5-aminolevulinate synthase genes in chick embryo hepatocytes is blocked by an inhibitor of protein phosphorylation. **Arch Biochem Biophys**. 15; 327(2):271-8. 1996.

DOGRA SC., HAHN CN., MAY BK. Superinduction by cycloheximide of cytochrome P4502H1 and 5-aminolevulinic acid synthase gene transcription in chick embryo liver. **Arch Biochem Biophys.** 300(1):531-4. 1993.

DUA M., SINGH A., SETHUNATHAN N., JOHRI AK.,. Biotechnology and bioremediation: successes and limitations. **Appl Microbiol Biot.** 59:143–152. 2002.

DUNCAN, RF., AGGART, MA., ROGER, AJW. CORNELL, NW. Phylogenetic Analysis of the 5-Aminolevulinic Acid Synthase **Gene. Mol. Biol. Evol.** 16(3):383–396. 1999.

ELLIOT, WH., ELLIOT, DC. **Biochemistry and Molecular Biology.** Oxford University Press. Oxford. p. 509-513. 2001.

EPAGRI (EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA E EXTENSÃO RURAL DE SANTA CATARINA). <http://www.epagri.rct-sc.br>. Acesso em janeiro de 2007.

FENT K. Ecotoxicological problems associated with contaminated sites. **Toxicol Lett.** 11;140-141:353-65. 2003.

FERREIRA GC., GONG J. 5-Aminolevulinic acid synthase and the first step of heme biosynthesis. **J Bioenerg Biomembr.** 27(2):151-9. 1995.

FOLEY, KP., LEONARD, MW., ENGEL, JD. Quantitation of RNA using the polymerase chain reaction. **Trends Genet.** 9: 380–385. 1993.

FONSECA, A., BRAGA, E., EICHLER, B. Distribuição espacial dos nutrientes inorgânicos dissolvidos e da biomassa fitoplanctônica no sistema pelágico da Lagoa da Conceição, Santa Catarina, Brasil. **Atlântica.** 24 (2): 69-83. 2002.

FRASER DJ., ZUMSTEG A., MEYER UA. Nuclear receptors constitutive androstane receptor and pregnane X receptor activate a drug-responsive enhancer of the murine 5-aminolevulinic acid synthase gene. **J Biol Chem.** 10;278(41):39392-401. 2003.

FRASER DJ., PODVINEC M., KAUFMANN MR., MEYER UA. Drugs mediate the transcriptional activation of the 5-aminolevulinic acid synthase (ALAS1) gene via the chicken xenobiotic-sensing nuclear receptor r(CXR). **J Biol Chem.** 20;277(38):34717-26. 2002.

GAGNÉ F., BLAISE C., PELLERIN J., PELLETIER E., STRAND J. Health status of *Mya arenaria* bivalves collected from contaminated sites in Canada (Saguenay Fjord) and Denmark (Odense Fjord) during their reproductive period. **Ecotoxicol Environ Saf.** 64(3): 348-61. 2005.

GALLOWAY, TS., BROWN, RJ., MARK A. BROWNE, MA., DISSANAYAKE, A., LOWE, D., JONES, MB, DEPLEDGE, MH. Ecosystem management bioindicators: the ECOMAN project – a multi-biomarker approach to ecosystem management. **Mar. Environ. Res.** (58) 233–237. 2004.

GONZALEZ-RIOPEDRE M, NOVAS A, DOBANO E, RAMOS-MARTINEZ JI, BARCIA R. Effect of thermal stress on protein expression in the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol**. *In press*. 2007.

GRIFFIN DW., DONALDSON KA., PAUL JH., ROSE JB. Pathogenic human viruses in coastal waters. **Clin Microbiol** 16(1):129-43. 2003.

HALLER F., KULLE B., SCHWAGER S., GUNAWAN B., VON HEYDEBRECK A., SULTMANN H., FUZESI L. Equivalence test in quantitative reverse transcription polymerase chain reaction: confirmation of reference genes suitable for normalization. **Anal Biochem**. 1;335(1):1-9. 2004.

HALLING-SORENSEN B., NORS NIELSEN S., LANZKY PF., INGERSLEV F., HOLTEN LUTZHOFT HC., JORGENSEN SE. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment -a review. **Chemosphere**. 36(2):357-93. 1998.

HAMILTON JW., BEMENT WJ., SINCLAIR PR., SINCLAIR JF., ALCEDO JA., WETTERHAHN KE. Heme regulates hepatic 5-aminolevulinate synthase mRNA expression by decreasing mRNA half-life and not by altering its rate of transcription. **Arch Biochem Biophys**. 289(2): 387-92. 1991.

HAMZA I., CHAUHAN S., HASSETT R., O'BRIAN MR. The bacterial *irr* protein is required for coordination of heme biosynthesis with iron availability. **J Biol Chem**. 273(34):21669-74. 1998.

HARA MR., CASCIO MB., SAWA A. GAPDH as a sensor of NO stress. **Biochim Biophys Acta**. 1762(5):502-9. 2006.

HODGSON E., LEVI PE. **Introduction to Biochemical Toxicology**, 2 ed. Appleton & Lange Copyright. Norwalk, Connecticut-USA. 544. 1994.

HUGGETT J., DHEDA K., BUSTIN S., ZUMLA A. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. **Genes Immun**.. 6(4): 279-84. 2005.

HUVET, A., HERPIN, A., DE'GREMONT, L., LABREUCHE, Y., SAMAIN, JF., CHARLES, CUNNINGHAM, C. The identification of genes from the oyster *Crassostrea gigas* that are differentially expressed in progeny exhibiting opposed susceptibility to summer mortality. **Gene**. 343: 211 –220. 2004.

IBA MM., ALAM J., TOUCHARD C., THOMAS PE., GHOSAL A., FUNG J. Coordinate up-regulation of CYP1A1 and heme oxygenase-1 (HO-1) expression and modulation of delta-aminolevulinic acid synthase and tryptophan pyrrolase activities in pyridine-treated rats. **Biochem Pharmacol**. 15;58(4):723-34. 1999.

IBGE (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA). Diretório de Pesquisas, Departamento de População e Indicadores Sociais. Pesquisa Nacional de Saneamento Básico 1989/2000. **Atlas nacional do Brasil**. 3. ed. Rio de Janeiro. 2000.

INTERNATIONAL COUNCIL FOR THE EXPLORATION OF THE SEA (ICES). **Report of the Working Group on Biological Effects of Contaminants**. Tromso. 2003.

JOHNSON, RK., WEIDERHOLM, T., ROSENBERG, DM.. Freshwatr biomonitoring using individual organisms, populations and species assemblages of benthic microinvertebrates. In: **Freshwater biomonitoring and benthic microinvertebrates** (D.M. Rosenberg e V.H. Resh, ed), pp.40-158, New York, Chapman & Hall. 1993.

JORNAL NOTÍCIAS DO DIA. Blitz de Verão: O que diz a CASAN. Grande Florianópolis. 23 de janeiro de 2007, p. 8.

JOVER R., HOFFMANN K., MEYER UA. Induction of 5-aminolevulinate synthase by drugs is independent of increased apocytochrome P450 synthesis. **Biochem Biophys Res Commun**. 4; 226(1):152-7. 1996.

KARLSON, P., GEROK, W., GROSS, W. **Patobioquímica**. Guanabara-Koogan. Rio de Janeiro. p. 81-83. 1989.

KENISH, MJ. **Ecology of Estuaries: Anthropogenic Effets**. CRC Press, London. P. 494. 1991.

KOZIAN DH, KIRSCHBAUM BJ. Comparative gene-expression analysis. **Trends Biotechnol**. 17(2):73-8. 1999.

LACERDA L.D., KREMER H.H., KJERFVE B., SALOMONS W., CROSSLAND JIM. CROSSLAND CJ. South American Basins: LOICZ Global Change Assessment and Synthesis of River Catchment-Coastal Sea Interaction and Human Dimenson. **LOICZ Reports and Studies**. 21, ISBN 1383-4304. 2002.

LAVER WG., NEUBERGER A. UDEFRIEND S. Initial stages in the biosynthesis of porphyrins. I. The formation of delta-am-inolaevulic acid by particles obtained from chickeerythrocytes. **Biochem J**. 70(1):4-14. 1958.

LEAF D., VEROLME HJ., HUNT WF JR. Overview of regulatory/policy/economic issues related to carbon dioxide. **Environ Int**. 29(2-3):303-10. 2003.

LETTIERI T. Recent applications of DNA microarray technology to toxicology and ecotoxicology. **Environ Health Perspect**. 114(1):4-9. 2006.

LIAO VH, FREEDMAN JH. Differential display analysis of gene expression in invertebrates. **Cell Mol Life Sci**. 59(8):1256-63. 2002.

LIVINGSTONE, DR. Responses of Detoxification/Toxication Enzymes Systems of Molluscs to Organic Pollutants and Xenobiotics. **Mar Pol Bull.** 16(4). 79-91. 1985.

LOUIS CA, WOOD SG, WALTON HS, SINCLAIR PR, SINCLAIR JF. Mechanism of the synergistic induction of CYP2H by isopentanol plus ethanol: comparison to glutethimide and relation to induction of 5-aminolevulinate synthase. **Arch Biochem Biophys.** 15;360(2):239-47. 1998.

MARONE M., MOZETTI S., De RITIS D., PIERELLI L., SCAMBIA, G. Semiquantitative RT-PCR analysis to assess the expression levels of multiple transcripts from the same sample. **Biol Proced Online**, 3 (1): 19-25, 2001.

MARQUES M., COSTA M., MAYORGA MI., PINHEIRO, PRC. Water Environments: Anthropogenic Pressures and Ecosystem Changes in the Atlantic Drainage Basins of Brazil. **Ambio.** 33: 68–77. 2004.

MARTINS DA COSTA P, VAZ-PIRES P, BERNARDO F. Antimicrobial resistance in *Enterococcus* spp. isolated in inflow, effluent and sludge from municipal sewage water treatment plants. **Water Res.** 40(8): 1735-40. 2006.

MASALA C. Demographic pressure and ecological restraints: The case of the **Mediterranean**. In: International Security Challenges in a Changing World. Spillmann, .R. and Krause, J. (eds). **ISBN 3-906763-68-4.** 349pp. 1999.

MATER L., ALEXENDRE MR., HANSEL FA., MADUREIRA LAS. **Assessment** of lipids compounds and phosphorous in mangrove sediments of Santa Catarina Island, SC, Brazil. **J. Braz. Chem. Soc.** 15(5): 725-734. 2004.

MATHEWS RA., BUIKEMA AL., CAIRNS Jr. Biological monitoring part IIA: Receiving system functional methods relationships and indices. **Wat Res.** 16:129-139. 1982.

MAY BK., DOGRA SC., SADLON TJ., BHASKER, CR., COX, TC., BOTTOMLEY, S. S. Molecular regulation of heme biosynthesis in higher vertebrates. **Progress in Acid Nucleic Research.** 51: 1-47, 1995.

MDC/MMA MACRODIAGNÓSTICO DA ZONA COSTEIRA DO BRASIL NA ESCALA DA UNIÃO. Ministério do Meio Ambiente dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal. **Sony Music-CD Room.** 1996.

MEDEIROS PM, BICEGO MC, CASTELAO RM, DEL ROSSO C, FILLMANN G, ZAMBONI AJ. Natural and anthropogenic hydrocarbon inputs to sediments of Patos Lagoon Estuary, Brazil. **Environ Int.** 31(1):77-87. 2005.

MONARCA S., FERETTI D., COLLIVIGNARELLI C., GUZZELLA L., ZERBINI I., BERTANZA G., PEDRAZZANI R. The influence of different disinfectants on mutagenicity e toxicity of urban waste water. **Wat. Res.** 34(17) **4261-4269.** 2000.

MONSERRAT JM., MARTINEZ PE., GERACITANO LA., LUND AMADO L., MARTINEZ GASPAR MARTINS C., LOPES LEAES PINHO G., SOARES CHAVES I., FERREIRA-CRAVO M., VENTURA-LIMA J., BIANCHINI A. Pollution biomarkers in estuarine animals: Critical review and new perspectives. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.** . *In press*. 2006.

MORA. P., FOURNIER., D., NARBONNE, JF. Cholinesterases from the marine mussels *Mytilus galloprovincialis* Lmk. and *M. edulis* L. and from the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* Müller. **Comp. Biochem and Physiology.**. Part C 122: 353–361. 1999.

MUNIAIN-MUJIKA, I., CALVO, M., LUCENA F., GIRONES, R. Comparative analysis of viral pathogens and potencial indicators in shellfish. **Intern. J. Food. Microbiol.** 83: 75-85. 2003.

NAKADA N., TANISHIMA T., SHINOHARA H., KIRI K., TAKADA H. Pharmaceutical chemicals and endocrine disrupters in municipal wastewater in Tokyo and their removal during activated sludge treatment. **Water Res.** 40(17): 3297-303. 2006.

NEUMANN, NF, GALVEZ, F. DNA microarrays and toxicogenomics: applications for ecotoxicology? **Biotechnol. Adv.** 20: 391–419. 2002.

NIELSEN, KS. **Fisiologia Animal.** 5^a ed. Livraria Santos Editora Com. Imp. Ltda. p. 610. 2002.

NIYOGY, S., BISWAS S., SARKER S., DATTA AG. Seasonal Variation of Antioxidant and Biotransformation Enzymes in Barnacle, *Balanus balanoides*, and Their Relation With Poliaromatic Hydrocarbons. **Mar Environ Res.** 52: 13-26, 2001.

OATES PS., WEST AR. Heme in intestinal epithelial cell turnover, differentiation, detoxification, inflammation, carcinogenesis, absorption and motility. **World J Gastroenterol.** 21;12(27):4281-95. 2006.

OH-HAMA T. Evolutionary consideration on 5-aminolevulinic synthase in nature. **Orig Life Evol Biosph.** 27(4): 405-12. 1997.

PARASHAR, UD., HUMMELMAN, EG. BRESEE, JS., MILLER MA. & GLASS, RI. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. **Emerg. Infect. Dis.** 9: 565-572. 2003.

PETERSEN A, ANDERSEN JS, KAEWMAK T, SOMSIRI T, DALSGAARD A. Impact of integrated fish farming on antimicrobial resistance in a pond environment. **Appl Environ Microbiol.** 68(12): 6036-42. 2002.

PETROVIC, M., GONZALEZ, S., BARCELÓ, D., Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drink water. **Trends Anal. Chem.** 22 (10): 685-696. 2003.

PMF (PREFEITURA MUNICIPAL DE FLORIANÓPOLIS). Instituto de Geração de Oportunidades de Florianópolis (IGEOP). **Informações Básicas da Maricultura em Santa Catarina e no Município de Florianópolis.** 2004.

PODVINEC M., HANDSCHIN C., LOOSER R., MEYER UA. Identification of the xenosensors regulating human 5-aminolevulinate synthase. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 101 (24):9127-32. 2004.

PODVINEC M., KAUFMANN MR., HANDSCHIN C., MEYER UA. NUBIScan, an in silico approach for prediction of nuclear receptor response elements. **Mol Endocrinol.** 16(6):1269-79. 2002.

PÖRTNER, HO., HARDEWIG, I., SARTORIS, F.J., VAN DIJK, P.L.M., Energetic aspects of cold adaptation: critical temperatures in metabolic, ionic and acid-base regulation. In: **Cold Ocean Physiology.** Pörtner, HO., Playle, R.C. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 88–120. 1998.

PREVODNIK A, LILJA K, BOLLNER T. Benzo[a]pyrene up-regulates the expression of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and multixenobiotic resistance polyglycoprotein (P-gp) in Baltic Sea blue mussels (*Mytilus edulis*). **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.** 145(2):265-74. 2007.

QI Z., HAMZA I., O'BRIAN MR. Heme is an effector molecule for iron-dependent degradation of the bacterial iron response regulator (Irr) protein. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 96(23):13056-61. 1999.

RAND GM., Fundamentals of Aquatic Toxicology: **Effect, Environmental Fates, Risk Assessment.** 2 ed. Washington: Taylor e Francis. p1125. 1995.

REBELLO, M.F. Aspectos fisiológicos e moleculares da ostra *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) como sentinela da contaminação por Zn e Cd na baía de Sepetiba, RJ. **Tese de doutorado. Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho. UFRJ.** 80p, 2001.

REUE K. mRNA quantitation techniques: considerations for experimental design and application. **J Nutr.** 28(11):2038-44. 1998.

REUE, K., COHEN, RC., SCHOTZ, MC. Evidence for hormone-sensitive lipase mRNA expression in human monocyte/macrophages. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.** 17: 3428–3432. 1997.

RYTER, SW., TYRRELL , RM., The Heme Synthesis and Degradation Pathways: Oxidant Sensitivity: Heme Oxygenase Has Both Pro and Antioxidant properties. **Free Radical Biology & Medicine.** 28(2): 289–309, 2000.

SADLON TJ, DELL'OSO T, SURINYA KH, MAY BK. Regulation of erythroid 5-aminolevulinic synthase expression during erythropoiesis. **Int J Biochem Cell Biol.** 31(10):1153-67. 1999.

SAHLSTRÖM L., DE JONG B., ASPAN A. Salmonella isolated in sewage sludge traced back to human cases of salmonellosis. **Lett Appl Microbiol.** 43(1): 46-52. 2006.

SCHMIDT AS., BRUUN MS., DALSGAARD I., PEDERSEN K., LARSEN JL. Occurrence of antimicrobial resistance in fish-pathogenic and environmental bacteria associated with four Danish rainbow trout farms. **Appl Environ Microbiol.** 66(11): 4908-15. 2000.

SCHULZE JO., SCHUBERT WD., MOSER J., JAHN D., HEINZ DW. Evolutionary relationship between initial enzymes of tetrapyrrole biosynthesis. **J Mol Biol.** 358(5): 1212-20. 2006.

SCHWARTZ T., VOLKMANN H., KIRCHEN S., KOHNEN W., SCHON-HOLZ K., JANSEN B., OBST U. Real-time PCR detection of *Pseudomonas aeruginosa* in clinical and municipal wastewater and genotyping of the ciprofloxacin-resistant isolates. **FEMS Microbiol Ecol.** 57(1): 158-67. 2006.

SELVEY S., THOMPSON EW., MATTHAEI K., LEA RA., IRVING MG., GRIFFITHS LR. Beta-actin--an unsuitable internal control for RT-PCR. **Mol Cell Probes.** 15(5):307-11. 2001.

SHEENAN D., POWER A. Effects of seasonality on xenobiotic and antioxidant defence mechanisms of bivalve molluscs. **Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol.** 123(3):193-9. 1999.

SHEMIN D. The biosynthesis of porphyrin. **Harvey Lect.** 50:258-84. 1955.

SHULZHENKO N., YAMBARTSEV A., GONCALVES-PRIMO A., GERBASE-DELIMA M., MORGUN A. Selection of control genes for quantitative RT-PCR based on microarray data. **Biochem Biophys Res Commun.** 337(1): 306-12. 2005.

SILVA AZ., ZANETTE J., FERNANDO FERREIRA J., GUZENSKI J., MARQUES MR., BAINY AC. Effects of salinity on biomarker responses in *Crassostrea rhizophorae* (Mollusca, Bivalvia) exposed to diesel oil. **Ecotoxicol Environ Saf.** 62(3): 376-82. 2005.

SILVA, CA., RAINBOW, PS., SMITH, BD. & SANTOS, ZL. Biomonitoring of trace metal contamination in the Potengi estuary, Natal (Brazil), using the oyster *Crassostrea rhizophorae*, a local food source. **Wat Res.** 35:4072-4078, 2001.

SIROVER MA. New insights into an old protein: the functional diversity of mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **Biochim Biophys Acta.** 13;1432(2):159-84. 1999

SOKOLOVA, I.M., BOCK, C., PÖRTNER, HO. Resistance to freshwater exposure in White Sea *Littorina* spp. I. Anaerobic metabolism and energetics. **J. Comp. Physiol. B** 170, 91–103. 2000.

STACKELBERG PE., FURLONG ET., MEYER MT., ZAUGG SD., HENDERSON AK., REISSMAN DB. Persistence of pharmaceutical compounds and other organic wastewater contaminants in a conventional drinking-water treatment plant. **Sci Total Environ.** 15;329 (1-3):99-113. 2004.

STEVENSON CN, MACMANUS-SPENCER LA, LUCKENBACH T, LUTHY RG, EPEL D. New perspectives on perfluorochemical ecotoxicology: inhibition and induction of an efflux transporter in the marine mussel, *Mytilus californianus*. **Environ Sci Technol.** 40(17):5580-5.2006.

STOLTZ, C., ANDERSON, A. Positive regulation of the rat CYP2B2 phenobarbital response unit by the nuclear receptor hexamer half-site.nuclear factor 1 complex. **Biochem. Pharmacol.** 57, 1073–1076. 1999.

STUMPF M., TERNES TA., WILKEN RD., RODRIGUES SV., BAUMANN W. Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Sci Total Environ.** 225(1-2):135-41. 1999.

TAKADA, H., EGANHOUSE, R.P. Molecular markers of anthropogenic waste. In: Meyers, R.A. (Ed.), **Encyclopedia of Environmental Analysis and Remediation**. John Wiley & Sons, Inc., New York, pp. 2883–2940. 1998.

TANGUY, A., BOUTET, I., LAROCHE, J., MORAGA, D. Molecular identification and expression study of differentially regulated genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in response to pesticide exposure. **FEBS Journal.** 272:390-400. 2005.

TAUXE, R., SEMINARIO, L., TAPIA, R., LIBEL, M. The latin America epidemic. P. 309-320. In I. K. Waschmuth, P. Blake e Olsvik (ed), **Vibrio cholerae in cholerae: molecular to global perspectives**. ASM Press Washington, DC. 1994.

TIMBRELL, J. **Introduction to Toxicology**. Taylor & Francis. Londres. 3rd ed., p. 129-131. 2003.

TSIFTSOGLU AS., TSAMADOU AI., PAPADOPOULOU LC. Heme as key regulator of major mammalian cellular functions: molecular, cellular, and pharmacological aspects. **Pharmacol Ther.** 111(2): 327-45. 2006.

VALAVANIDIS A., VLAHOGIANNI T., DASSENAKIS M., SCOULLOS M. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. **Ecotoxicol Environ Saf.** 64(2):178-89. 2006.

VISSERS LE., VELTMAN JA., VAN KESSEL AG., BRUNNER HG. Identification of disease genes by whole genome CG arrays. **Hum Mol Genet.** 15;14 Spec No. 2:R215-23. 2005.

WALKER CH., HOPKIN, SP., SIBLY, RM., PEAKALL, DB. **Principles of ecotoxicology**. Taylor & Francis, Londres, 1996. 321p. 1996.

WANG AM., DOYLE MV., MARK, DF. Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. **Proc. Nati. Acad. Sci. USA** 86, 9717-9721, 1989.

WARNICK GR., BURNHAM BF. Regulation of prophyrin biosynthesis. Purification and characterization of δ -aminolevulinic acid synthase. **J Biol Chem.** 246(22): 6880-5. 1971.

WOODARD S. I., DAILEY H. A. Multiple regulatory steps in erythroid heme biosynthesis. **Arch Biochem Biophys** 384(2): 375–378. 2000.

YING GG., WILLIAMS B., KOOKANA R. Environmental fate of alkylphenols and alkylphenolethoxylates--a. **Environ Int.** 28(3):215-26. 2002.

ZANETTE J., MONSERRAT JM., BIANCHINI A. Biochemical biomarkers in gills of mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae* from three Brazilian estuaries. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.** 143(2):187-95. 2006.

ZUCCATO E., CASTIGLIONI S., FANELLI R. Identification of the pharmaceuticals for human use contaminating the Italian aquatic environment. **J Hazard Mater.**;122(3):205-9. 2005.