



CAPTAR
ciência e ambiente para todos

volume 1 • número 1 • p 40-53

A expressão genética como ferramenta de avaliação de impactos da poluição por pesticidas em sistemas aquáticos.

O uso de pesticidas é objecto de controvérsia: são geralmente necessários para o sucesso da produção agrícola, mas a contaminação do solo e de sistemas aquáticos (e.g. lagos e rios) é prejudicial para muitas espécies. A utilização de insecticidas é particularmente preocupante porque grande parte da biomassa aquática é composta por artrópodes semelhantes aos organismos-alvo (pragas). A utilização das biomoléculas de ADN e dos seus mecanismos operativos (e.g. formação de ARN mensageiro durante a síntese proteica) é uma das mais recentes biotecnologias aplicadas à análise dos efeitos nefastos de compostos tóxicos. De uma forma simplificada, sabendo que, em condições controlo, um organismo aquático produz X moléculas de ARNm, ao observar que, após exposição a um insecticida, produz 2X ou -2X, pode concluir-se que o organismo foi afectado pela exposição. Posteriormente analisando a função dos genes envolvidos neste processo, pode concluir-se acerca dos mecanismos biológicos que foram inibidos ou estimulados, podendo estimar-se riscos do insecticida para o ecossistema. O objectivo deste estudo foi verificar as alterações na expressão genética de um zooplancote (*Daphnia magna*) após exposição a Metomil, um insecticida muito usado em Portugal. Para tal, utilizou-se um *chip* de ADN (*microarray*), que permite o estudo da expressão de milhares de genes numa só leitura.

Palavras-chave

expressão genética
microarrays de ADN
pesticidas
efeitos tóxicos
Daphnia magna
zooplâncton

Joana L Pereira^{*}
Fernando Gonçalves

CESAM e Departamento de Biologia da
Universidade de Aveiro, 3810-193 Aveiro.

^{*}jpereira@ua.pt

ISSN 1647-323X



INTRODUÇÃO

Um dos organismos que é muito utilizado no contexto da avaliação dos efeitos de contaminantes em ecossistemas de água doce é a pulga de água, *Daphnia magna* (Figura 1). Trata-se de um crustáceo de água doce, herbívoro, que é parte geralmente muito significativa do zooplâncton de sistemas lênticos (sem corrente, e.g., lagos, lagoas). Ocupa uma posição ecológica central na teia trófica do ecossistema aquático (Lampert, 2006) uma vez que: por um lado, é um herbívoro filtrador poderoso (retém as partículas alimentares suspensas na água passando-as através do seu aparelho de filtração), capaz de controlar a produção vegetal microscópica do ecossistema (em geral microalgas verdes); por outro lado, é um item alimentar muito importante para o elo seguinte da cadeia trófica (invertebrados ou peixes planctívoros). As dáfrias são relativamente fáceis de manter em laboratório e reúnem uma série de características fisiológicas que, conjuntamente com o facto de serem ecologicamente importantes, lhes conferem um estatuto de organismo-modelo numa série de disciplinas da Biologia, inclusivé na Ecotoxicologia¹ (Antunes e Pereira, 2007): i) são fáceis de manusear no decurso de diversos processos experimentais porque não são nem demasiado pequenos para não se verem a olho nú, nem demasiado grandes que exijam grande aparato logístico para o manuseamento; ii) têm ciclos de vida curtos (algumas semanas) e reproduzem-se ciclicamente após a maturidade (atingida aos 6-8 dias de vida), geralmente de dois em dois dias, produzindo ninhadas grandes (até cerca de 50 neonatos); iii) possuem um processo de reprodução assexuada por partenogénese, o que permite controlar a variabilidade genética em qualquer experiência; iv) são organismos bastante sensíveis a uma gama alargada de compostos tóxicos, incluindo pesticidas.



FIGURA 1: observação à lupa de *Daphnia magna*

A contaminação dos ecossistemas por pesticidas é bastante preocupante, dado que estes compostos são utilizados em larga escala para combater pestes que afectam a produção agrícola. Como frequentemente existem massas de água superficiais (rios, lagos, lagoas, etc) junto de áreas agrícolas, é relativamente comum aí encontrar resíduos de pesticidas. O transporte destes resíduos, desde a área de aplicação até às massas de água, depende das suas propriedades físicas e químicas e ocorre geralmente através de processos de deriva por aspersão (transporte de partículas suspensas nas massas de ar corrente), escorrência à superfície do solo ou lixiviação (infiltração no solo) (Carter, 2000; Huber et al., 2000). Estes contaminantes constituem frequentemente uma ameaça às comunidades aquáticas e o estudo dos seus efeitos em organismos pertencentes a estas comunidades permite obter dados que facilitam a compreensão da extensão dos danos que podem ocorrer nos ecossistemas aquáticos.

Os resíduos de pesticidas têm sido detectados em diversas matrizes aquáticas (Cerejeira et al., 2003; Guest et al., 2006; Wilson e Foos, 2006), a concentrações que frequentemente ultrapassam os máximos permitidos pela legislação aplicável (e.g. CE, 1998). O insecticida metomil [S-metil N-(metilcarbamoiloxi) tioacetimidato] é um exemplo desta situação. O metomil pertence à classe química dos carbamatos e é muito usado para combater uma larga gama de insectos e acarídeos, por contacto com a superfície do organismo-alvo ou por ingestão (Tomlin, 2001). Os carbamatos são compostos neurotóxicos, ou seja,

¹ Estudo integrado dos efeitos tóxicos, causados por poluentes, em organismos constituintes dos ecossistemas.

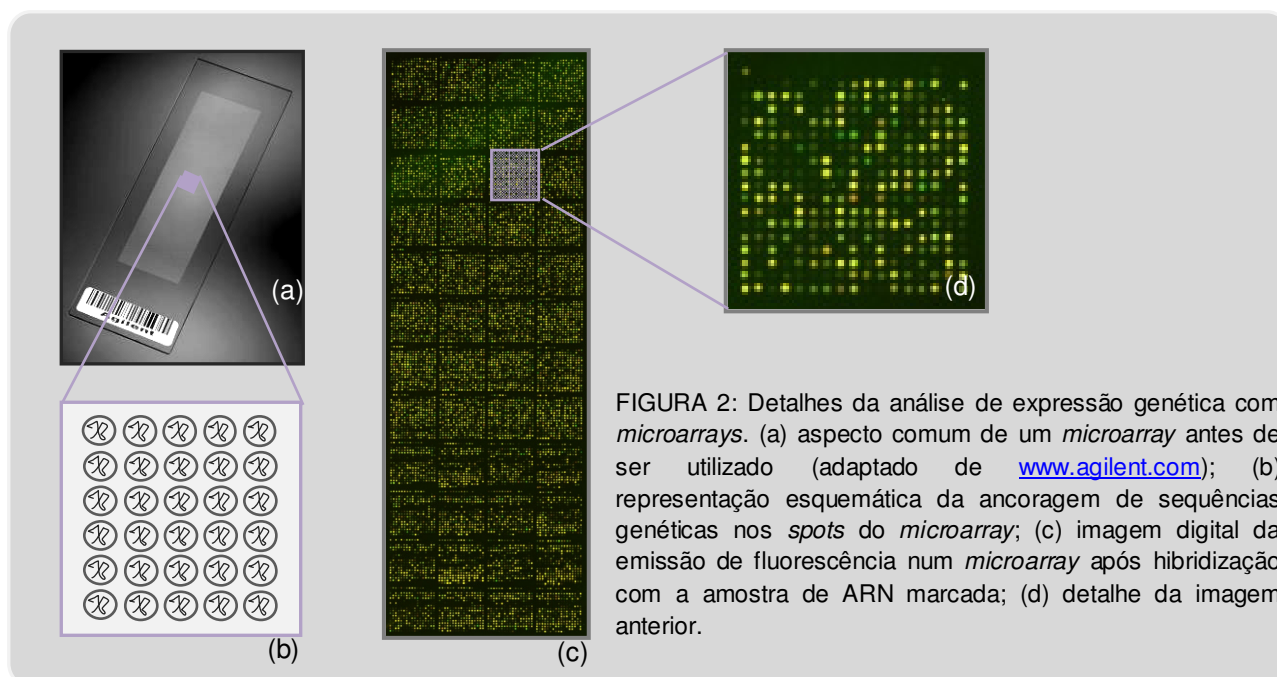
comprometem a função neuronal dos organismos expostos, inibindo enzimas específicas essenciais ao bom funcionamento da transmissão de impulsos nervosos, tais como a acetilcolinesterase (Quinn, 1987). Os efeitos da exposição a inibidores de acetilcolinesterase traduzem-se geralmente na sobre-activação do tecido muscular, nas consequentes alterações comportamentais e, em última instância, na morte do organismo (Timbrell, 2009). Vários estudos demonstraram já que os pesticidas com modo de acção centrado na disrupção da função neuronal inibem estas enzimas em *Daphnia* (e.g., Barata et al., 2004; Printes e Callaghan, 2004).

Em geral, o estudo do impacto de diferentes compostos potencialmente tóxicos em organismos não-alvo é focado na avaliação de respostas ao nível do organismo ou ao nível da população. Apesar de produzirem dados relevantes que nos permitem conhecer os efeitos que uma determinada exposição pode produzir, este tipo de estudos não permite discriminar os mecanismos de toxicidade que induzem a resposta geral do organismo a essa exposição. A Ecotoxicogenómica, uma área recente da Ecotoxicologia que integra ferramentas de análise do genoma, é promissora na produção de informação relevante acerca dos mecanismos de toxicidade operantes em situações específicas de exposição a tóxicos (Neumann e Galvez, 2002; Snape et al., 2004). A análise quantitativa e qualitativa da transcrição genética² (produção de moléculas de ARN mensageiro) é uma das ferramentas que pode ser utilizada neste contexto. Ao estabelecer, numa experiência, um tratamento com uma concentração de um dado tóxico e um tratamento de controlo, e se, após o devido tempo de exposição, for comparada a produção de ARNm entre os dois tratamentos, é possível obter uma imagem directa dos mecanismos sub-celulares que estão a ser afectados pela exposição ao tóxico - é fornecida uma indicação acerca dos genes que passam a ser transcritos quando se alteram as condições ambientais. A análise dos perfis de transcrição (expressão genética global) de sistemas biológicos sujeitos a um determinado estímulo de stress, utilizando *microarrays* de ADN, é uma tecnologia recentemente desenvolvida que permite obter precisamente essa imagem.

Os *microarrays* de ADN são lâminas de vidro (semelhantes, em aspecto, às lâminas que se usam nas preparações microscópicas) em cuja superfície se encontram ancorados milhares de sequências de nucleotídeos (que podem ser porções significativas de genes ou outros elementos do ADN), individualizados em *spots* de localização conhecida (Van Straalen e Roelofs, 2006) (Figura 2). As diferentes moléculas de ADN que se encontram no microarray hibridizam com moléculas de ARN, coradas geralmente com um corante de fluorescência, com as quais sejam colocadas em contacto, e é emitido um sinal de fluorescência em cada *spot* do *microarray*. Esta tecnologia é então baseada no princípio de hibridização dos ácidos nucleicos, que reflecte a complementaridade entre as bases azotadas (a Adenina hibridiza com a Timina e a Guanina com o Uracilo, no caso do ARN). Os sinais de fluorescência são detectados e quantificados por espectrofotometria, sendo que a intensidade do sinal indica em que medida a expressão dos genes correspondentes a cada *spot* sofreu ou não alteração (foi induzida ou reprimida) relativamente a um controlo (para detalhes *vide* “Metodologia”). Sabendo quais os genes cuja expressão foi alterada após exposição a um tóxico, e conhecendo a função da proteína que é codificada por esse gene, é possível perceber que alterações está o tóxico a promover ao nível sub-celular; por outras palavras, é possível

² Transcrição genética: passo fundamental da síntese proteica durante a qual os genes codificados nas moléculas de ADN são transcritos para ARNm.

perceber o mecanismo efectivo de toxicidade do composto testado no organismo estudado (Neumann e Galvez 2002).



Os *microarrays* de ADN têm sido usados com sucesso para avaliar as alterações na expressão genética de *Daphnia magna* exposta a diferentes contaminantes ambientais tais como, produtos farmacêuticos, metais, pesticidas e hidrocarbonetos aromáticos (Soetaert et al., 2006; Soetaert et al., 2007; Watanabe et al., 2007; Connon et al., 2008; Heckmann et al., 2008). No presente estudo, que constitui uma adaptação de parte de um estudo original que será brevemente publicado numa revista internacional (Pereira et al., *in prep.*), pretendeu-se analisar os mecanismos de toxicidade do insecticida metomil no crustáceo de água doce *Daphnia magna*, ao nível sub-celular. Para isso, realizou-se a exposição dos organismos ao tóxico e avaliaram-se as alterações de expressão genética ocorridas após a exposição, utilizando um *microarray* de ADN adaptado à espécie.

METODOLOGIA

Daphnia magna foi mantida em laboratório em culturas monoclonais³. Grupos de 15-20 dáfias foram cultivados em cerca de 1 L de meio sintético apropriado (ISO, 1996), ao qual se adiciona um suplemento nutricional orgânico. As culturas foram alimentadas diariamente com suspensões de fermento (concentração = 0.04 mg L⁻¹) e de uma alga verde unicelular (concentração equivalente a uma ração de 3x10⁵ células mL⁻¹). A sala de cultura foi mantida em condições controladas de fotoperíodo (16h^L:8h^E) e de temperatura (20±1°C). Nas experiências de exposição foram utilizados neonatos com menos de 24 horas de idade, provenientes da terceira, quarta ou quinta ninhada nascida nas culturas. Numa fase preliminar, foram feitos ensaios de toxicidade aguda (OECD, 2004), que permitiram definir a concentração de tóxico a que as dáfias seriam expostas na experiência de avaliação da expressão genética. Expuseram-se neonatos de *D.*

³ Como as dáfias se reproduzem partenogeneticamente, é possível assegurar que todos os indivíduos que estão a ser cultivados e mantidos em laboratório são geneticamente idênticos, ou seja, constituem clones de um só genótipo.

magna a uma gama de concentrações de metomil (Pestanal®, 99.5% pureza; Sigma Aldrich), durante 48 horas (Figura 3).

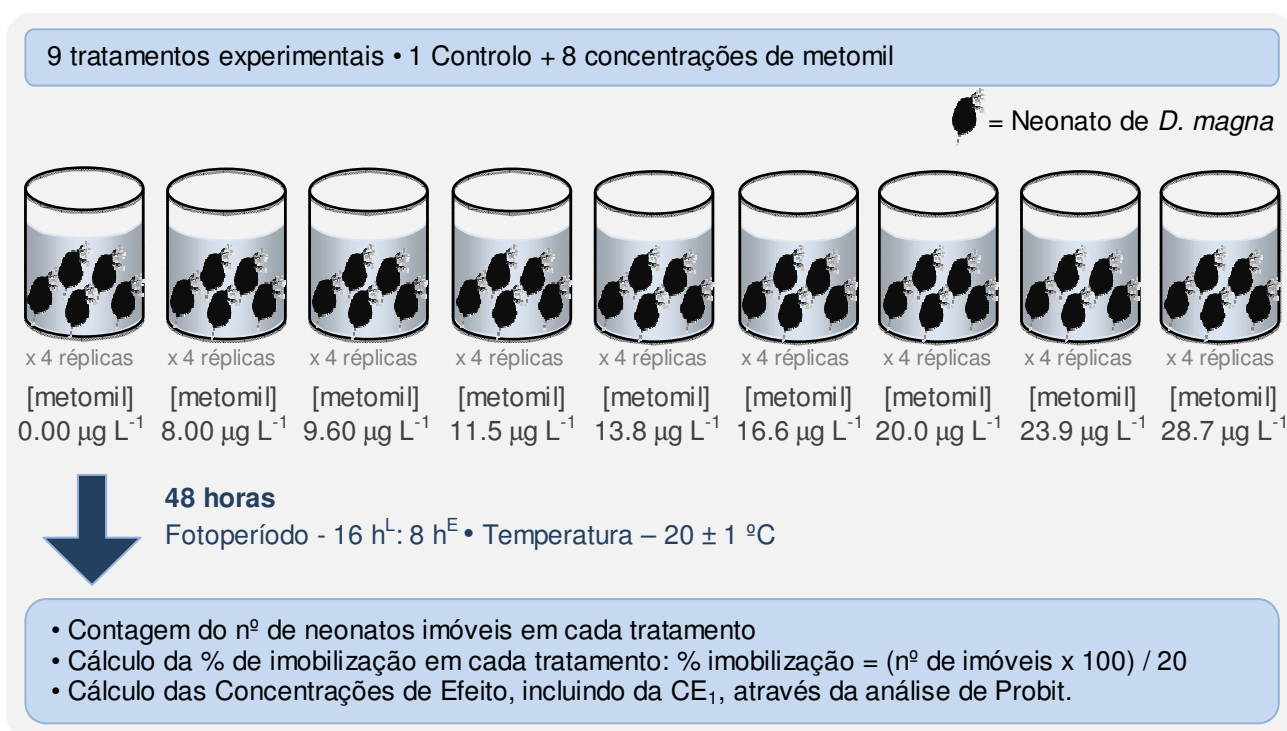


FIGURA 3: Representação esquemática da metodologia utilizada na exposição aguda de *Daphnia magna* a metomil, efectuada para obter o valor de CE₁ a utilizar na experiência seguinte.

Esta exposição decorreu nas mesmas condições usadas para o cultivo dos organismos, exceptuando o facto de não ser adicionado qualquer suplemento nutricional ou alimento durante o período de teste. Findo o período de exposição, registou-se o número de dáfrias que se encontravam imóveis⁴ nos frascos de teste. A partir destes dados, e com o apoio de ferramentas de análise estatística (análise de Probit; Finney, 1971), calculou-se a concentração em que se espera obter imobilização em cerca de 1% dos organismos expostos (Concentração de Efeito a 1%, CE₁)⁵. De uma forma simplificada, esta análise permite, a partir da curva concentração-resposta obtida, estimar a CE₁ mais provável, para os organismos testados e para o tóxico utilizado.

Numa segunda fase, os organismos foram expostos à CE₁ de metomil estimada, durante 48h. Expuseram-se 30 neonatos, nascidos há menos de 24 horas (na terceira ninhada das culturas), a metomil, em 1 L de meio de cultura sintético. O mesmo número de neonatos, nas mesmas condições, foi mantido em meio sintético limpo, funcionando como controlo. Destes dois tratamentos estabeleceram-se 5 réplicas (no total estabeleceram-se 5 frascos com 30 indivíduos cada, em cada tratamento). Findo o período de exposição,

⁴ Um dos parâmetros de avaliação usados tradicionalmente em exposições agudas é a mortalidade. Em *Daphnia*, a mortalidade só pode ser confirmada à lupa; por outro lado, como se trata de um organismo filtrador que precisa de se movimentar para poder alimentar-se, a imobilização (ausência de natação) é um parâmetro que por si só indica que o estado fisiológico do animal está seriamente afectado. Assim, considera-se frequentemente a imobilização como parâmetro de avaliação neste tipo de exposições em vez da tradicional mortalidade.

⁵ A selecção do CE₁ para a exposição final dos organismos prendeu-se com duas premissas fundamentais: i) não pode haver mortalidade significativa no final da exposição, sob pena de não ser possível extrair ARN suficiente dos organismos testados para prosseguir os estudos (e, claro, não há qualquer interesse em analisar ARN de organismos que não sobrevivam ao tempo total de exposição); ii) é preciso assegurar que a concentração aplicada tem algum efeito fisiológico, ou não será possível discriminar os mecanismos de toxicidade da substância.

os organismos de cada frasco foram fixados e concentrados em *RNAlater*® (permite preservar a qualidade do ARN da amostra). O ARN dos organismos foi extraído usando um *kit* comercial apropriado. A quantidade de ARN que é extraído de 30 neonatos (1 amostra) de *Daphnia* não é suficiente para a técnica de análise de expressão genética funcionar. Assim, procede-se à amplificação do ARN extraído⁶, utilizando também um *kit* comercial adequado. A figura 4 esquematiza estes e os procedimentos subsequentes da metodologia.

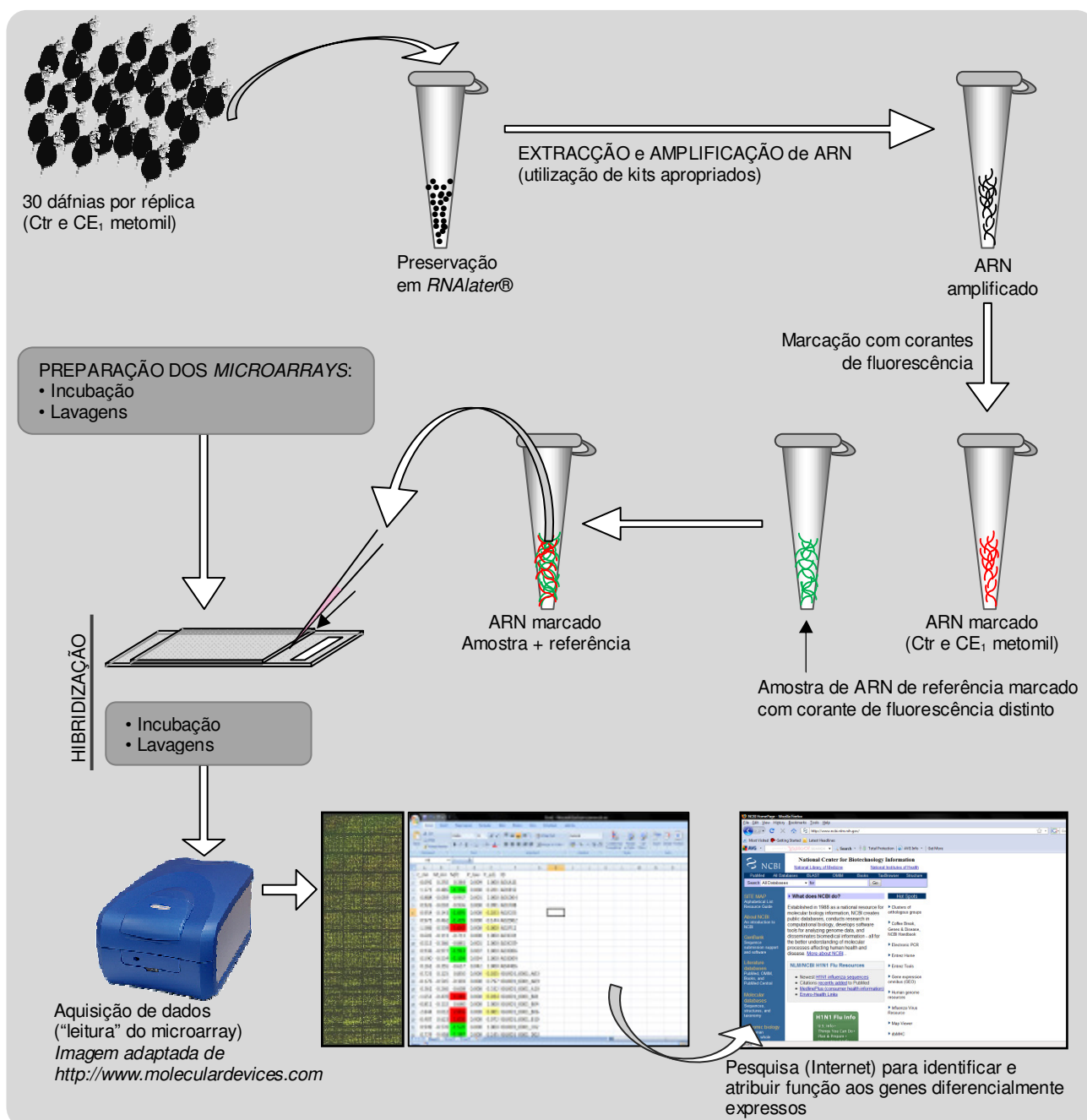


FIGURA 4: Representação esquemática da metodologia utilizada na análise da expressão genética de *Daphnia magna*, após exposição ao insecticida metomil.

⁶ A amplificação de ARN não é mais do que uma duplicação sucessiva repetitiva das moléculas de ARN; ou seja, se numa amostra for extraída X quantidade de ARN, no final do processo de amplificação pode conseguir-se 2X, 3X, etc.

De seguida procedeu-se à marcação das amostras com corantes de fluorescência. Corou-se uma amostra de referência (resultante da mistura de quantidades mínimas e idênticas do ARN amplificado a partir de uma amostra mista de dáfias) com um corante, e coraram-se as amostras experimentais com um corante diferente. Cada amostra experimental foi então misturada com uma quantidade equivalente da amostra de referência e cada mistura resultante foi hibridizada (colocada em contacto) com um *microarray*. A hibridização das amostras com o *microarray* é um processo que envolve quatro fases sequenciais: i) os *microarrays* são preparados para a hibridização através de uma incubação de curta duração numa solução de lavagem e estabilização; ii) cada amostra corada é preparada para a hibridização com o *microarray*, sendo-lhe adicionado um estabilizador, um tampão e uma mistura de moléculas de ARN e ADN conhecidas (que funcionarão como controlo de qualidade aquando da análise do *microarray*); iii) cada amostra preparada é hibridizada com o *microarray*; iv) os *microarrays* são incubados novamente para que ocorra a hibridização do ARN das amostras com as sequências genéticas.

Os *microarrays* foram então analisados em equipamento espectrofotométrico apropriado e a intensidade da emissão de fluorescência de cada *spot* foi registada quantitativamente em suporte digital. Quando ocorre hibridização de ARN da amostra com a sequência genética que está ancorada num determinado *spot* do *microarray* é emitido um sinal particular de fluorescência; a análise da intensidade desse sinal permite saber que o gene representado naquele *spot* foi transcrito. Seguindo a mesma lógica de análise é possível também saber que genes representados no *microarray* não foram transcritos. Estes dados foram processados de acordo com metodologias normalizadas internacionalmente (Yang et al., 2002; Saeed et al., 2003). De seguida, é feita uma comparação entre as intensidades de sinal em *spots* equivalentes dos *microarrays* correspondentes ao controlo e ao tratamento de exposição a metomil, o que permite concluir acerca da indução ou repressão da expressão genética pelo tóxico.

As sequências genéticas do *microarray* utilizado neste estudo são conhecidas, uma vez que este foi desenvolvido especificamente para *Daphnia* a partir de estudos prévios de vários autores, que sequenciaram⁷ e/ou identificaram uma série de genes (*Daphniabase* <http://daphnia.nibb.ac.jp>, Soetaert et al., 2006; Heckmann et al., 2008; Connon et al., 2008). A função celular de todos os genes que foram reprimidos ou induzidos pela exposição ao insecticida foi determinada com recurso a bases de dados internacionais. Nestas bases de dados, investigadores de todo o mundo adicionam sequências genéticas representativas de genes que vão sendo sequenciados e/ou descodificados durante a análise do genoma de uma série de organismos distintos. Em algumas bases de dados é disponibilizada a identificação de genes a partir de sequências de bases azotadas únicas, como as que estão impressas em cada *spot* dos *microarrays* (ex: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), enquanto que noutras é disponibilizada a função das proteínas que os genes identificados codificam (ex: <http://beta.uniprot.org/>). A análise dos resultados de expressão genética neste contexto é composta por dois passos sequenciais: (i) é efectuada uma busca por sequência genética (sequência de bases azotadas) para identificar o gene que lhe corresponde; (ii) o nome do gene identificado anteriormente é utilizado para fazer nova busca, no sentido de caracterizar a função desse gene (ou seja, identificar a proteína que é codificada pelo gene em questão).

⁷ A sequenciação de um gene é o processo de determinação da sequência de nucleotídeos (expressa sob a forma de sequência de bases azotadas, A,T,C,G) que compõe um determinado gene.

RESULTADOS

Os testes de imobilização preliminares, efectuados para determinar a concentração mais apropriada de metomil a utilizar na exposição para análise da expressão genética, permitiram obter uma curva de concentração-resposta robusta (Figura 5). Assim, os resultados permitiram estimar adequadamente vários valores de CE, inclusivamente o valor da CE₁ que seria utilizada nas exposições subsequentes (Tabela I).

TABELA I: Concentrações de efeito e respectivos intervalos de confiança a 95%⁸, estimadas através de análise de Probit, após exposição de *Daphnia magna* a metomil durante 48h.

	Concentração	Limites de Confiança a 95%
CE ₁	10,5 µg L ⁻¹	8,82-11,7 µg L ⁻¹
CE ₁₀	12,8 µg L ⁻¹	11,5-13,8 µg L ⁻¹
CE ₅₀	16,3 µg L ⁻¹	15,3-17,3 µg L ⁻¹

A exposição dos organismos à CE₁ permitiu estabelecer uma relação directa entre a toxicidade de metomil ao nível do organismo e a toxicidade ao nível sub-celular (expressão genética). As alterações na expressão genética de *Daphnia magna* após exposição ao insecticida foram consideráveis: o insecticida provocou alterações nos níveis de expressão de 624 sequências genéticas do *microarray*, sendo que, proporcionalmente, se identificou maior expressão induzida (64%) do que expressão reprimida (34%) (Figura 6).

Após este tratamento preliminar dos dados obtidos foi feita a pesquisa para a identificação e atribuição de função celular dos 624 genes. Destes, apenas a 293 foi possível atribuir uma função celular, pelo que só estes foram considerados para os passos seguintes da análise. Assim, metomil promoveu o aumento da expressão (indução) de 182 genes e a diminuição da expressão (repressão) de 111 genes com significado funcional. Estes genes foram então agrupados segundo o seu papel funcional, de forma a facilitar a interpretação dos efeitos sub-celulares do tóxico (Figura 7).

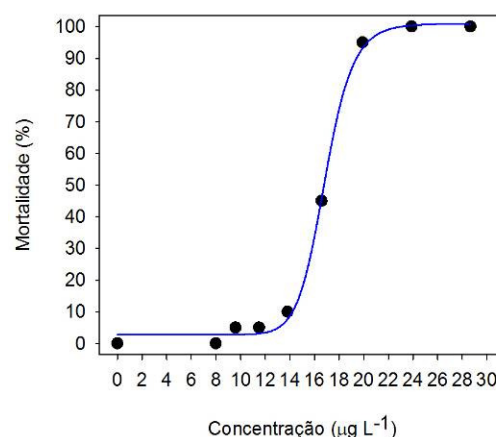


FIGURA 5: Curva concentração-resposta (mortalidade) relativa à exposição de *Daphnia magna* a metomil durante 48h. Os pontos correspondem às respostas obtidas nos diferentes tratamentos experimentais e a curva constitui uma representação gráfica de um modelo matemático ajustado às respostas, que permite estimar respostas correspondentes a concentrações não testadas (ex: CE₁).

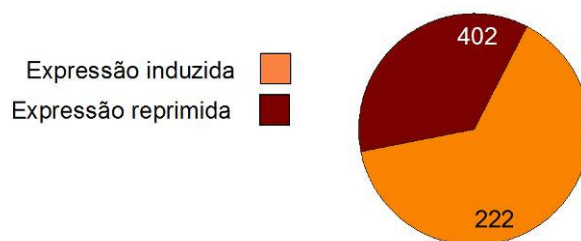
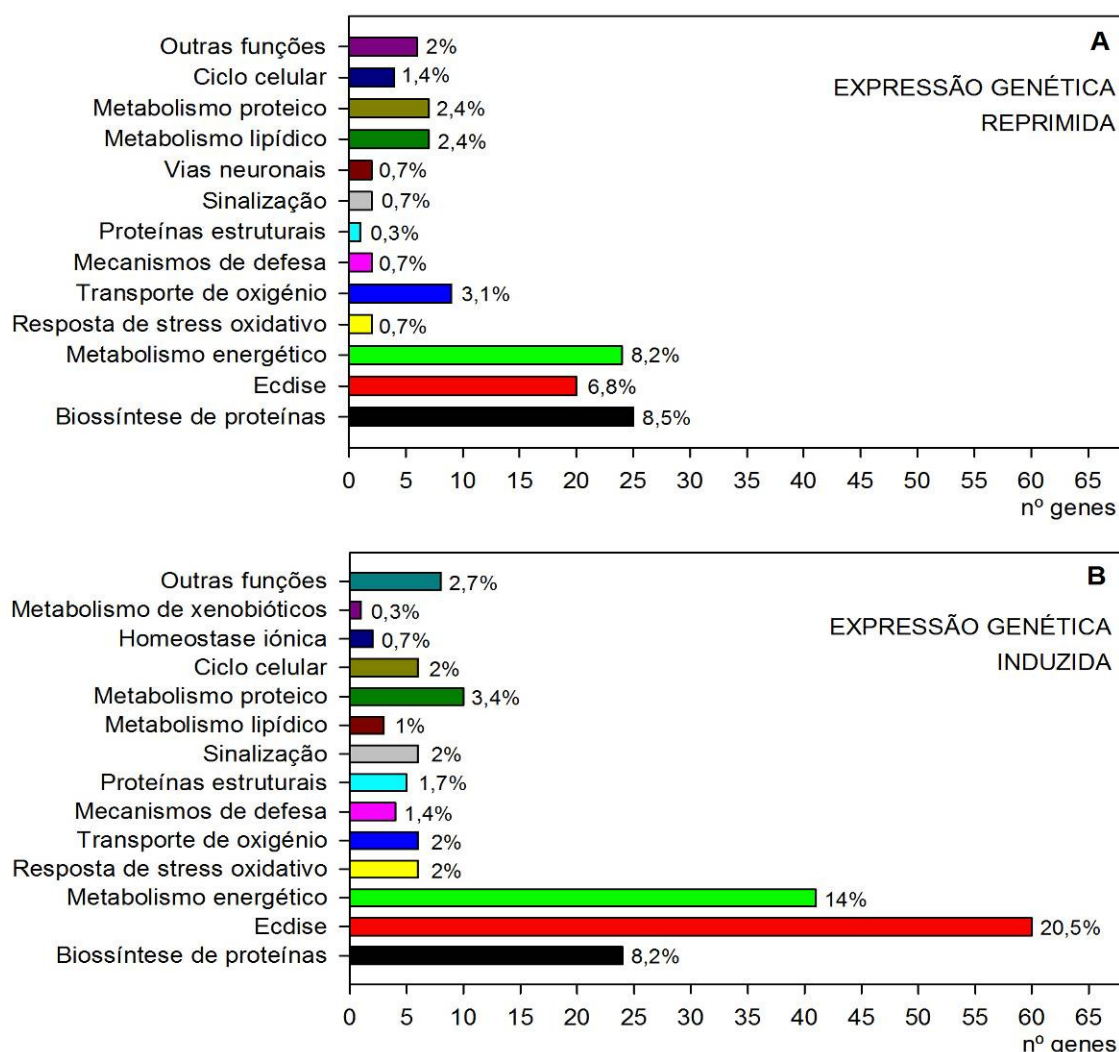


FIGURA 6: Sequências genéticas diferencialmente expressas após exposição de *Daphnia magna* ao insecticida metomil. O número total de sequências genéticas induzidas e reprimidas é indicado na área do gráfico respectiva

⁸ Os intervalos de confiança são uma medida da incerteza associada à determinação de um valor de CE. Por exemplo, se um valor de CE de 25 g L⁻¹ tem associado um intervalo de confiança que se situa entre os valores de 24 e 26 g L⁻¹, o grau de incerteza da determinação é muito pequeno (é grande a probabilidade de o valor real desta CE ser coincidente com o valor que foi estimado).



Biossíntese proteica: proteínas ribossómicas; proteínas com actividade no complexo de Golgi e no retículo endoplasmático | **Ecdise:** proteínas cuticulares, de ligação da quitina e precursoras da formação da carapaça | **Metabolismo energético:** enzimas da cadeia respiratória e da glicólise | **Resposta de stress oxidativo:** HSP's; ferritina; superóxido dismutase | **Transporte de oxigénio:** hemoglobina | **Mecanismos de defesa:** lectina; preproadipsina | **Proteínas estruturais:** actina; colagénio | **Metabolismo lipídico:** vitelogenina | **Metabolismo proteico:** carboxipeptidases; tripsina; fosfatases | **Metabolismo de xenobióticos:** sulfotransferase | **Sinalização:** rodopsina; proteínas quimio-sensoriais | **Vias neuronais:** carboxilesterase | **Homeostase iónica:** proteínas de troca iónica ao nível da membrana plasmática | **Ciclo celular:** proteínas com actividade na divisão celular e replicação de ADN | **Outras funções:** anidrase carbónica; angiostatina; selenoproteínas; cisteína sintetase.

FIGURA 7: Representação, em proporção, da alteração da expressão genética (A – repressão; B – indução) após exposição de *Daphnia magna* a metomil. As percentagens entre parênteses referem-se à proporção de genes associados à função em causa no conjunto de genes cuja expressão foi alterada (reprimida ou induzida) pela exposição a metomil. Na caixa de texto encontram-se discriminadas alguns exemplos das proteínas agrupadas em cada função celular.

Os genes associados à ecdise⁹, ao metabolismo proteico e ao metabolismo energético demonstraram ser aqueles cuja expressão foi mais alterada pela exposição ao insecticida metomil. O processo de ecdise foi particularmente visado pela exposição ao xenobiótico¹⁰, sendo que a expressão de genes que codificam algumas proteínas cuticulares mostrou-se cerca de 8 vezes superior à observada no controlo. Os genes envolvidos na biossíntese de proteínas foram induzidos e reprimidos em proporções idênticas (cerca de

⁹ Processo através do qual os crustáceos sofrem mudas regulares da carapaça quitinosa.

¹⁰ Termo que se refere a qualquer químico ou material que não é natural, que não é produzido pela natureza.

8%), embora as taxas de indução pareçam ser superiores às de repressão: por exemplo, encontraram-se genes ribossomais com uma expressão cerca de 9 vezes induzida relativamente ao controlo, mas apenas 4 vezes reprimida relativamente ao controlo. Após exposição a metomil, a indução de genes relacionados com o metabolismo energético foi também mais relevante (14% da expressão diferencial total) e mais forte do que a respectiva repressão (cerca de 8% da expressão diferencial total): por exemplo, a expressão do gene da citocromo oxidase, foi 8 vezes maior do que no controlo e atingiu um nível de repressão 4 a 5 vezes inferior ao controlo. Funções como o transporte de oxigénio e o metabolismo lipídico foram consideravelmente mais induzidas do que reprimidas pelo tóxico, e o oposto foi observado no caso de genes associados a proteínas estruturais e a mecanismos de defesa.

Apesar de na maior parte dos casos se verificar indução e repressão de genes associados a uma mesma função, observaram-se algumas excepções a este padrão: as vias neuronais, e em particular a carboxilesterase, só se encontram representadas no conjunto de genes cuja expressão foi reprimida (Figura 7A); o metabolismo de xenobióticos e a homeostase iónica são funções representadas apenas no conjunto de genes cuja expressão foi induzida por metomil (Figura 7B).



DISCUSSÃO

No presente estudo, foi feita a ligação entre um parâmetro de avaliação ecotoxicológica a nível do organismo/indivíduo (imobilização; exposição à CE₁) e um parâmetro ao nível sub-celular (expressão genética), utilizando o zooplancote *Daphnia magna*. Embora não tenha sido observada imobilização de *D. magna* após a exposição de 48 horas à CE₁ de metomil, sabe-se que esta concentração pode afectar o crescimento e reprodução da espécie, sob exposição crónica¹¹ (Pereira e Gonçalves, 2007). A sensibilidade destes organismos a um determinado estímulo de *stress* pode variar de acordo com vários factores de que se salientam: i) a linhagem clonal (genótipo) utilizada no teste; ii) as condições em que decorreu o teste (idade dos organismos, tipo de meio de cultura, condições físicas, etc.); iii) pureza do químico testado. Neste estudo *D. magna* apresentou um valor de CE₅₀ de 16 µg L⁻¹, enquanto que noutros estudos anteriores foram registados valores de CE₅₀ superiores a 24 µg L⁻¹ (Tomlin, 2001; Pereira e Gonçalves, 2007); assim, pode afirmar-se que a sensibilidade da espécie neste estudo foi superior, uma vez que, trabalhando com as condições de teste e a linhagem clonal utilizada, será necessária uma concentração inferior de metomil para imobilizar 50% das dáfias expostas. Esta afinação da concentração a utilizar em experiências relacionadas com a expressão genética é um procedimento que permite assegurar que o tóxico testado exercerá apenas um efeito a nível molecular, apesar de esse efeito poder não ser observável “a olho nú” (taxa muito baixa ou nula de imobilização). De facto, a concentração utilizada na exposição final dos organismos (valor de CE₁ estimado) revelou-se suficiente para promover a expressão diferencial de uma grande quantidade e diversidade de genes do *microarray*.

O crescimento dos artrópodes ocorre através da muda ou ecdise periódica do exoesqueleto (Ruppert e Barnes, 1996), que no caso de *Daphnia* se verifica geralmente de 2 em 2 ou de 3 em 3 dias. São vários os genes a interagir para promover processos de muda que foram diferencialmente expressos após exposição ao insecticida metomil. Neste conjunto de genes estão incluídos os envolvidos na síntese do novo

¹¹ Em geral, as exposições crónicas de *Daphnia* ocorrem durante 21 dias, período durante o qual é feita a renovação periódica da concentração do tóxico, é fornecido alimento aos organismos e é feita uma observação diária dos indivíduos em teste. Neste tipo de exposições pretende-se habitualmente avaliar efeitos ao nível reprodutivo.

exoesqueleto - como os que codificam para várias proteínas cuticulares, proteínas de ligação de quitina e constituintes estruturais da cutícula – e os relacionados com a degradação do exoesqueleto antigo – como as carboxipeptidases. A indução de genes relacionados com o processo de ecdise foi bastante expressiva, sugerindo que a aceleração do ciclo de muda poderá ser uma resposta à exposição a metomil. Para o crescimento de *Daphnia* contribuem, para além das mudas regulares do exoesqueleto, as proteínas estruturais produzidas nas células, sendo que os ribossomas são fundamentais durante a biossíntese de proteínas; ou seja, os ribossomas suportam o crescimento celular (Stryer, 1999). Considerando que as dáfias são animais de crescimento rápido com elevado conteúdo em ribossomas (Elser et al., 2000), a elevada taxa de expressão diferencial de genes associados à biossíntese de proteínas (cerca de 15%) e o facto de a maior parte destes genes codificarem para proteínas ribossómicas não foram surpreendentes. A quantidade de genes deste tipo reprimidos foi muito semelhante à quantidade de genes induzidos pela exposição ao xenobiótico. Apesar de parecer contraditório, este padrão poderá reflectir uma estratégia de compensação, operada pelos organismos expostos, para manter o crescimento. Se, por um lado, o metomil poderá reprimir a expressão destes genes, por outro, o organismo poderá, em resposta, ser capaz de promover a expressão de outros genes do mesmo tipo. Este esforço para manter taxas de crescimento normais não deverá, todavia, ser bem sucedido: estudos anteriores demonstraram que a exposição crónica a concentrações de metomil ainda mais baixas do que a utilizada no presente estudo resulta na diminuição significativa das taxas de crescimento de *D. magna* (Pereira e Gonçalves, 2007).

O crescimento, como a sobrevivência, dependem da disponibilidade de energia. Os pesticidas são reconhecidos como tóxicos capazes de afectar negativamente a gestão energética dos dafnídeos (De Coen e Janssen, 2003). A indução de ATP sintetase e de enzimas envolvidas na glicólise e na cadeia respiratória sugere um aumento das necessidades energéticas para fazer face ao *stress* tóxico. A indução de α -amilase (enzima que intervém na degradação de hidratos de carbono para subsequente produção de energia) e de proteínas associadas ao metabolismo lipídico (que apoiam a mobilização de reservas lipídicas) fortalece esta hipótese. O oxigénio alimenta as necessidades metabólicas celulares, pelo que a eficiência do seu transporte até às células é fundamental para a sobrevivência e crescimento de qualquer organismo. Em *Daphnia*, o transporte de oxigénio é feito por uma molécula de hemoglobina composta por quatro sub-unidades (codificadas por quatro genes distintos) (Kimura et al., 1999; Nunes et al., 2005). Ao contrário de outros pesticidas (por exemplo, triazinas; Rider e LeBlanc, 2006), metomil parece não promover alterações importantes na expressão deste complexo proteico, ou seja, os processos de produção de energia não deverão ser condicionados pela escassez de oxigénio nas células numa situação de exposição a este tóxico.

A expressão dos genes relacionados com os mecanismos de defesa, tais como lectinas (envolvidas adesão e aglutinação celular), foi bastante estimulada em resposta à exposição ao insecticida. Os invertebrados, como *Daphnia*, possuem um sistema imunitário dito inato, ou seja, operam exclusivamente mecanismos de defesa não específica contra os antigénios (Muta e Iwanaga, 1996); a resposta imunitária geral envolverá a coagulação da hemolinfa, num processo apoiado pelas lectinas (Muta e Iwanaga, 1996). Neste estudo, a exposição ao pesticida pode ser directamente relacionada com a indução das defesas imunitárias. Estudos adicionais são naturalmente necessários para que se desvendem os mecanismos através dos quais ocorre a activação destes processos de defesa.

O processo de homeostase iónica¹² terá sido afectado pelo insecticida uma vez que aumentou a produção (indução dos genes respectivos) de vários complexos proteicos associados ao transporte activo de iões através das membranas plasmática (por exemplo, da bomba sódio-potássio ATPase e do canal de troca iónica cloreto-bicarbonato). A sulfotransferase, cuja síntese foi também induzida por metomil, é uma proteína envolvida na conjugação de vários xenobióticos com grupos sulfato (Josephy, 1997), o que geralmente diminui a sua actividade tóxica, ou seja, está envolvida nos processos generalistas de destoxificação dos organismos. Esta observação sugere que *D. magna* terá capacidade para biotransformar o insecticida, pelo que a produção de sulfotransferase terá aumentado para fazer face à exposição de que fora alvo, através de um processo generalista de destoxificação. Sendo um insecticida da família dos carbamatos, o metomil é neurotóxico, actuando ao nível das sinapses através da inibição de enzimas essenciais na transmissão nervosa (Quinn, 1987). A exposição a metomil resultou na repressão da enzima carboxilesterase, geralmente envolvida neste processo de transmissão neuronal. De alguma forma, seria de esperar que, ao contrário do observado, o insecticida promovesse a expressão deste tipo de enzimas, num processo compensatório proporcional à sua inibição nas zonas de transmissão nervosa (modo de acção de metomil).



APLICAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

O estudo da expressão genética, utilizando ferramentas de análise genómica como os *microarrays* de ADN, pode fornecer informações relevantes acerca dos mecanismos sub-celulares de toxicidade dos contaminantes ambientais. Numa visão algo simplificada, pode dizer-se que este tipo de técnicas aumentam a resolução das observações clássicas efectuadas no âmbito da ecotoxicologia, uma vez que informam sobre os mecanismos moleculares que podem explicar os efeitos dos tóxicos a níveis superiores de organização biológica (por vezes ao nível de tecidos específicos ou de mecanismos enzimáticos particulares, ao nível do indivíduo, da população, etc). A genómica assume, portanto, uma relevância cada vez maior nos estudos de ecotoxicologia sobre xenobióticos já existentes e mesmo sobre compostos novos, que se encontram em fase de licenciamento para posterior entrada no mercado. Mais ainda, a análise molecular dos efeitos de exposições potencialmente tóxicas, ao nível da transcrição genética, poderá permitir o desenvolvimento de biomarcadores de exposição novos e mais afinados, o que constituirá um avanço significativo nas ferramentas disponíveis para a análise de risco ecológico de contaminantes (Robbens et al., 2007). Existem estudos que investigam a toxicidade de metomil em espécies de dafnídeos, inclusivamente em *Daphnia magna*, ao nível do indivíduo e ao nível populacional (e.g., Pereira e Gonçalves, 2007). No entanto, a informação relativa aos efeitos do tóxico a nível sub-celular é escassa e muito específica. Este estudo pretende ser uma contribuição no traçar do perfil de toxicidade deste químico, demonstrando o potencial da análise da expressão genética com *microarrays* de ADN para este efeito.

¹² Homeostase é um termo que se aplica à capacidade de alguns animais regularem os níveis de um determinado sistema fisiológico, de um modo independente relativamente ao meio exterior. Por exemplo, o Homem e muitos outros animais possuem a capacidade de regular a sua temperatura interna (mantendo-a a um nível de cerca de 37°C), independentemente da temperatura que se faz sentir no exterior do organismo, no contexto de um processo que se designa de homeostase térmica. O mesmo se aplica à concentração de iões no organismo (e.g. Sódio, Cálcio, Potássio, etc), sendo que neste caso se aplica o termo “homeostase iónica”.

agradecimentos • Os autores agradecem a Chris Hill, Richard M. Sibly, Viacheslav Bolshakov, Lars-Henrick Heckmann e Amanda Callaghan, co-autores do estudo original de onde foi adaptada uma pequena parte desta contribuição para a revista CAPTAR. A Fundação para a Ciência e Tecnologia suportou financeiramente este trabalho no âmbito da bolsa de doutoramento de JL Pereira (SFRH/BD/13682/2003).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Antunes SC, Pereira R (2007). Os testes de toxicidade na avaliação da qualidade da água. *In*: F Gonçalves, R Pereira, U Azeiteiro, M Pereira (eds.), *Actividades Práticas em Ciência e Educação Ambiental*. Editora do Instituto Piaget, Lisboa, pp. 195-210.
- Barata C, Solayan A, Porte C (2004). Role of B-esterases in assessing toxicity of organophosphorus (chlorpyrifos, malathion) and carbamate (carbofuran) pesticides to *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology* 66: 125-139.
- Carter A (2000). How pesticides get into water – and proposed reduction measures. *Pesticide Outlook*: 149-156.
- CE (1998). Directiva 98/83/CE do Conselho relativa à qualidade da água destinada ao consumo humano. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias* L330/32 – 5.12.1998.
- Cerejeira MJ, Viana P, Batista S, Pereira T, Silva E, Valério MJ, Silva A, Ferreira M, Silva-Fernandes AM (2003). Pesticides in Portuguese surface and ground waters. *Water Research* 37: 1055-1063.
- Connon R, Hooper H, Sibly RM, Lim F-L, Heckmann L-H, Moore DJ, Watanabe H, Soetaert A, Cook K, Maund SJ, Hutchinson TH, Moggs J, De Coen W, Iguchi T, Callaghan A (2008). Linking molecular and population stress responses in *Daphnia magna* exposed to cadmium. *Environmental Science and Technology* 42: 2181-2188.
- De Coen W, Janssen CR (2003). A multivariate biomarker-based model predicting population-level responses of *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22: 2195-2201.
- Elser JJ, Sterner RW, Gorokhova E, Fagan WF, Markow TA, Cotner JB, Harrison JF, Hobbie SE, Odell GM, Weider LJ (2000). Biological stoichiometry from genes to ecosystem. *Ecology Letters* 3: 540-550.
- Finney DJ (1971). *Probit analysis*. Cambridge University Press, Cambridge, 333 pp.
- Guest RK, Ikehata K, El-Din MG, Smith DW (2006). Pesticides and Herbicides. *Water Environment Research* 78: 1755-1801.
- Heckmann L-H, Sibly RM, Connon R, Hooper HL, Hutchinson TH, Maund SJ, Hill CJ, Bouetard A, Callaghan A (2008). Systems biology meets stress ecology: Linking molecular and organismal stress responses in *Daphnia magna*. *Genome Biology* 9: R40.
- Huber A, Bach M, Frede HG (2000). Pollution of surface waters with pesticides in Germany: modelling non-point source inputs. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 80: 191-204.
- ISO (1996). Water quality-determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera: Crustacea) – acute toxicity test (ISO 66431). International Organisation for Standardisation, Geneva.
- Joseph PD (1997). *Molecular Toxicology*. Oxford University Press, New York, 336pp.
- Kimura S, Tokishita S, Ohta T, Kobayashi M, Yamagata H (1999). Heterogeneity and differential expression under hypoxia of two-domain haemoglobin chains in the water flea, *Daphnia magna*. *Journal of Biological Chemistry* 274: 10649-10653.
- Lampert W (2006). *Daphnia*: model herbivore, predator and prey. *Polish Journal of Ecology* 54: 607-620.
- Muta T, Iwanaga S (1996). The role of hemolymph coagulation in innate immunity. *Current Opinion in Immunology* 8: 41-47.
- Neumann NF, Galvez F (2002). DNA microarrays and toxicogenomics: applications for Ecotoxicology? *Biotechnology Advances* 20: 391-419.
- Nunes F, Spiering D, Wolf M, Wendler A, Pirow R, Paul RJ (2005). Sequence of Hemoglobin Gene 4 (*dmhb4*) and Southern Blot analysis provide evidence of more than four members of the *Daphnia magna* Globin family. *Bioscience, Biotechnology & Biochemistry* 69: 1193-1197.
- OECD (2004). OECD guideline for testing of chemicals 202 - *Daphnia* sp., acute immobilisation test. Organization for the Economic Cooperation and Development. Paris.
- Pereira JL, Hill CJ, Sibly RM, Bolshakov V, Gonçalves F, Heckmann L-H, Callaghan A (*in prep.*). Gene expression in *Daphnia magna*: effects of acute exposure to a carbamate insecticide and an acetanilide herbicide.
- Pereira JL, Gonçalves (2007). Effects of food availability on the acute and chronic toxicity of the insecticide Methomyl to *Daphnia* spp. *The Science of the Total Environment* 386: 9-20.
- Printes LB, Callaghan A (2004). A comparative study on the relationship between acetylcholinesterase activity and acute toxicity in *Daphnia magna* exposed to anticholinesterase insecticides. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23: 1241-1247.

- Quinn DM (1987). Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states. *Chemical Reviews* 87: 955-979.
- Rider CV, LeBlanc GA (2006). Atrazine stimulated haemoglobin accumulation in *Daphnia magna*: is it hormonal or hypoxic? *Toxicological Sciences* 93: 443-449.
- Robbens J, Van der Ven K, Maras M, Blust R, De Coen W (2007). Ecotoxicological risk assessment using DNA chips and cellular reporters. *TRENDS in Biotechnology* 25: 460-466.
- Ruppert EE, Barnes RD (1996). Invertebrate Zoology, 6th ed. Saunders College Publishing, Fort Worth, 1056pp.
- Saeed AI, Sharov V, White J, Li J, Liang W, Bhagabati N, Braisted J, Klapa M, Currier T, Thiagarajan M, Sturn A, Snuffin M, Rezantsev A, Popov D, Ryltsov A, Kostukovich E, Borisovsky I, Liu Z, Vinsavich A, Trush V, Quackenbush J (2003). TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques* 34(2): 374-378.
- Snape JR, Maund SJ, Pickford DB, Hutchinson TH (2004). Ecotoxicogenomics: the challenge of integrating genomics into aquatic and terrestrial Ecotoxicology. *Aquatic Toxicology* 67: 143-154.
- Soetaert A, Moens LN, Van der Ven K, Van Leemput K, Naudts B, Blust R, De Coen WM (2006). Molecular impact of propiconazole on *Daphnia magna* using a reproduction-related cDNA array. *Comparative Biochemistry and Physiology C* 142: 66-76.
- Soetaert A, Vandenbroucke T, Van der Ven K, Maras M, Van Remortel P, Blust R, De Coen WM (2007). Molecular responses during Cadmium-induced stress in *Daphnia magna*: integration of differential gene expression with higher-level effects. *Aquatic Toxicology* 83: 212-222.
- Stryer L (1999). Biochemistry, 4th ed. WH Freeman, New York, 1064pp.
- Timbrell JA (2009). Principles of Biochemical Toxicology, 4th ed. Informa Healthcare, New York, 466pp.
- Tomlin CDS (2001). The pesticide manual. British Crop Protection Council, Surrey, 1260pp.
- Van Straalen NM, Roelofs D (2006). An introduction to ecological genomics. Oxford University Press, Oxford, 307pp.
- Watanabe H, Takahashi E, Nakamura Y, Oda S, Tatarazako N, Iguchi T (2007). Development of a *Daphnia magna* DNA microarray for evaluating the toxicity of environmental chemicals. *Environmental Toxicology and Chemistry* 26: 669-676.
- Yang YH, Dudoit S, Luu P, Lin DM, Peng V, Ngai J, Speed TP (2002). Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. *Nucleic Acids Research* 30: e15.
- Wilson PC, Foos JF (2006). Survey of carbamate and organophosphorous pesticide export from a South Florida (USA) agricultural watershed: implications of sampling frequency on ecological risk estimation. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25: 2847-2852.