

INSTITUTO DE QUÍMICA

Universidade de São Paulo

t: 18.819

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Recebido em 25/04
E. Colepicolo

ASPECTOS DA ADAPTAÇÃO BIOQUÍMICA AO ESTRESSE
METÁLICO NA ALGA UNICELULAR *Gonyaulax polyedra*:
MODULAÇÃO DE ANTIOXIDANTES CLOROPLÁSTICOS E
EXPRESSÃO DIFERENCIAL DA ENZIMA Fe-SUPERÓXIDO
DISMUTASE

OSWALDO KEITH OKAMOTO

TESE DE DOUTORADO

Orientador: Prof. Dr. Pio Colepicolo Neto

SÃO PAULO

2000

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

ASPECTOS DA ADAPTAÇÃO BIOQUÍMICA AO ESTRESSE
METÁLICO NA ALGA UNICELULAR *Gonyaulax polyedra*:
MODULAÇÃO DE ANTIOXIDANTES CLOROPLÁSTICOS E
EXPRESSÃO DIFERENCIAL DA ENZIMA Fe-SUPERÓXIDO
DISMUTASE

OSWALDO KEITH OKAMOTO

TESE DE DOUTORADO

Orientador: Prof. Dr. Pio Colepicolo Neto

SÃO PAULO

2000

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

O41a Okamoto, Oswaldo Keith
Aspectos da adaptação bioquímica ao estresse metálico na alga unicelular *Gonyaulax polyedra* : modulação de antioxidantes cloroplásticos e expressão diferencial da enzima Fe-superóxido dismutase / Oswaldo Keith Okamoto.
-- São Paulo, 2000.
122p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química. Departamento de Bioquímica.
Orientador: Colepicolo Neto, Pio

1. Dismutase : Enzima 2. Microorganismo : Bioquímica I.
T. II. Colepicolo Neto, Pio, orientador.

574.19258 CDD

"Aspectos da Adaptação Bioquímica ao Estresse Metálico na Alga Unicelular *G. polyedra*. Modulação de Antioxidantes Cloroplásticos e Expressão Diferencial da Enzima Fe-Superóxido Dismutase".

OSWALDO KEITH OKAMOTO

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências - Área: Bioquímica.

Aprovado por:

Prof. Dr. PIO COLEPICO NETO
IQ - USP
(Orientador e Presidente)

Prof. Dr. ROBERTO VICENTE SANTELLI
IQ - USP

Profa. Dra. VIRGÍNIA BERLANGA CAMPOS JUNQUEIRA
UNIFESP

Profa. Dra. ELIZABETH AIDAR
IO - USP

Prof. Dr. LUIS EDUARDO SOARES NETO
IB - USP

SÃO PAULO
05 DE MAIO DE 2000.

Dedico esta tese à minha querida noiva e eterna companheira, Ticha, por todo o seu carinho, compreensão e apoio à minha carreira científica.

AGRADECIMENTOS

Ao orientador e amigo, Dr. Pio Colepicolo, cuja confiança e estímulo constantes foram essenciais ao meu amadurecimento científico;

Aos companheiros de laboratório, Alcely E. Barroso, Ernani P. Júnior, Heloísa C. Hollnagel, Marcelo P. Barros, Patrícia F. Lopes e Teresa C. Kutner, pela amizade e convívio estimulantes;

Aos técnicos Ednailson P. Carvalho e Sandra R. Souza, pela ajuda valiosa em todos os momentos;

Aos amigos do Depto. de Bioquímica-USP, em especial à Ana Paula Loureiro, Janice Onuki e Valdemir Carvalho, pelas experiências profissionais compartilhadas;

Ao Dr. J.W. Hastings e Dr. T. Wilson, do *Dept. Molecular and Cellular Biology, Harvard University*, pela colaboração científica e incentivo ao meu aprimoramento profissional;

Ao Dr. Etelvino J. H. Bechara, pelo suporte nos experimentos com radicais de oxigênio em sistemas biológicos;

À Dra. Mariana C. Oliveira, do Depto. Botânica, IB-USP, pela colaboração nos experimentos em biologia molecular;

Ao Instituto de Química da USP, pelas excelentes condições de trabalho;

À CAPES, pela concessão da bolsa de Doutorado Sanduíche;

À Fapesp, pelo apoio financeiro essencial ao desenvolvimento deste trabalho;

Aos meus pais, irmãos e familiares, pelo carinho e apoio de sempre.

RESUMO

A ativação do oxigênio molecular em suas espécies reativas é uma constante ameaça aos organismos fotossintéticos, uma vez que os cloroplastos são compartimentos celulares altamente susceptíveis ao estresse oxidativo. Sob condições normais, a geração de ERO nestas organelas é lenta e controlada, embora possa ser exacerbada pela exposição a xenobióticos e outros fatores de estresse ambiental. Como a intoxicação por metais poluentes é uma importante fonte de estresse oxidativo em sistemas biológicos, a resistência de organismos fotossintéticos ao estresse metálico deve ser dependente de adaptações bioquímicas que previnam o insulto oxidativo em seus cloroplastos. Com o intuito de investigar esta hipótese, os níveis de antioxidantes cloroplásticos e os padrões de indução da enzima SOD foram estudados no dinoflagelado marinho *G. polyedra*, sob diferentes modelos de estresse metálico. Primeiramente, os efeitos dos metais poluentes Hg^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} e Cu^{2+} , sobre alguns aspectos fisiológicos deste dinoflagelado, foram avaliados por bioensaios de toxicidade. *G. polyedra* se mostrou altamente sensível a estes metais, os quais causaram aumentos significativos de mortalidade celular, alta frequência de *flashes* bioluminescentes e formação de cistos assexuais, em concentrações relativamente baixas. A escala de toxicidade encontrada foi $Hg^{2+} > Cu^{2+} > Cd^{2+} > Pb^{2+}$, de acordo com seus respectivos valores de CE50. O encistamento parece ser uma importante estratégia celular de resistência à toxicidade de metais, em particular a Pb^{2+} e Cu^{2+} , uma vez que as células tratadas com estes metais foram capazes de retomar, parcial ou completamente, o estado fisiológico normal quando inoculadas em meio livre de metais tóxicos.

Com base nos bioensaios de toxicidade, dois modelos de estresse metálico, crônico e agudo, foram estabelecidos e o balanço oxidativo, em cloroplastos isolados de *G. polyedra*, avaliado nestas condições experimentais. Diferentes respostas antioxidantes foram verificadas de acordo com o metal e o modelo de estresse aplicado. Em geral, células cronicamente expostas a metais exibiram aumentos de atividade das enzimas antioxidantes SOD e Apx, alto poder redutor e níveis reduzidos do carotenóide peridinina, enquanto nenhuma alteração foi observada quanto aos níveis de β -caroteno. Em contraste, células submetidas a estresse metálico agudo exibiram níveis dobrados de β -caroteno, embora nenhuma alteração significativa tenha sido observada para os demais antioxidantes. A correlação entre o tratamento agudo e a instalação de estresse oxidativo foi inferida pelo consumo de oxigênio exacerbado e menor poder redutor, observados em células expostas aos metais. Em decorrência do estado pró-oxidante, aumentos de lesões

oxidativas sobre lipídeos e proteínas cloroplásticas foram detectados predominantemente em células sob tratamento agudo.

Respostas específicas da enzima SOD também foram estudadas, observando-se um aumento dose-dependente em sua atividade, que ocorreu nas primeiras horas de exposição aos metais. Das três isoformas detectadas em *G. polyedra*, apenas FeSOD e MnSOD foram induzidas pelos metais, enquanto os níveis celulares de CuZnSOD não variaram significativamente, nas mesmas condições experimentais. Além da indução por metais, estas duas isoformas também mostraram ser sintetizadas circadianamente em *G. polyedra*. A isoforma FeSOD foi detectada em cloroplastos deste dinoflagelado e a clonagem parcial do seu *cDNA* codificador, realizada por técnicas baseadas em *PCR*. Análises preliminares de filogenia molecular com esta isoforma cloroplástica de *G. polyedra* indicaram uma alta similaridade com FeSOD cianobacteriana, corroborando a teoria endosimbiótica para a origem dos cloroplastos modernos. Induções de FeSOD, por exposição aos metais poluentes, incluíram aumentos nos seus níveis de *mRNA*, revelando um controle transcricional positivo, inédito em *G. polyedra*. Com relação à oscilação circadiana desta isoforma cloroplástica, níveis constantes de transcritos de FeSOD foram detectados ao longo de 24 h, evidenciando um controle circadiano distinto, ao nível traducional.

A partir das informações obtidas nesta tese, conclui-se que os metais poluentes avaliados são extremamente tóxicos a *G. polyedra* e capazes de induzir um estresse oxidativo em seus cloroplastos, especialmente sob condições agudas de exposição. Durante o estresse metálico crônico, entretanto, a manutenção de uma alta capacidade antioxidante, incluindo o aumento imediato da expressão da FeSOD, é uma estratégia relevante na atenuação das lesões oxidativas em lipídeos e proteínas, prevenindo possíveis danos estruturais e perda de funções cloroplásticas. Esta modulação de antioxidantes cloroplásticos sugere que a adaptação bioquímica de *G. polyedra* inclui respostas rápidas e específicas ao sítio subcelular onde o estresse oxidativo é instalado, processo este importante na resistência deste dinoflagelado à exposição a metais poluentes. As diferentes possibilidades de regulação da FeSOD, reveladas neste trabalho, salientam ainda a importância desta isoforma na manutenção do equilíbrio oxidativo cloroplástico durante adversidades ambientais e lançam novas perspectivas a respeito do controle de expressão gênica, em *G. polyedra*. O presente trabalho contribui, portanto, para o entendimento dos componentes bioquímicos e moleculares de processos adaptativos em algas.

SUMMARY

Oxygen activation to reactive species is a constant threat to photosynthetic organisms since chloroplasts are cell compartments highly susceptible to oxidative stress. Although moderate at normal conditions, the ROS generating-processes in such organelles can be highly accelerated by xenobiotics and some other environmental factors. Because the intoxication with pollutant metals is an important source of oxidative stress in biological systems, resistance of photosynthetic organisms to metal stress might be dependent on biochemical adaptations that prevent oxidative insult within their plastids. To investigate such hypothesis, the oxidative balance of chloroplasts and the induction pattern of the antioxidant enzyme SOD were evaluated in the marine dinoflagellate *G. polyedra*, under different conditions of metal stress. At first, toxicity bioassays based on survival were carried out with *G. polyedra* cells exposed to the pollutant metals Hg^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} and Cu^{2+} . Cell viability significantly decreased under exposure to these metals, which were also able to stimulate the frequency of bioluminescent flashes and induce encystment of this dinoflagellate. The toxicity scale found to *G. polyedra* was $\text{Hg}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Pb}^{2+}$, based on the EC50 values of each metal. Induction of resting cysts appears to be an important strategy for cell survival, particularly during Pb^{2+} and Cu^{2+} treatments, since cells partially or completely excysted within 96 h after metal removal from the media, respectively.

Chronic and acute models of metal stress were applied, based on the toxicity bioassays, and the oxidative balance in isolated chloroplasts of *G. polyedra* examined. Different antioxidant responses were verified according to the metal and model of stress. Cells chronically exposed to metals exhibited high activity of the antioxidant enzymes SOD and Apx, high GSH content and reduced peridinin levels, whereas no significant changes were detected in the β -carotene content. In contrast, cells subjected to acute metal stress displayed twice as much β -carotene but only slight variation in SOD, Apx and peridinin levels. The correlation of acute metal treatment and oxidative stress was inferred from the higher oxygen uptake and decreased GSH pool found in treated cells. In addition, increased oxidative damage to proteins and lipids occurred mainly in cells under acute stress.

The specific responses of SOD to pollutant metal stress were also examined. A dose-dependent induction of SOD activity was found in the first hours of metal treatment. Among the three SOD isoforms detected in crude extracts of *G. polyedra*, FeSOD and MnSOD were the inducible ones, while non-significant changes in CuZnSOD levels were

verified. Furthermore, both isoforms displayed a circadian rhythm of synthesis in this dinoflagellate. The FeSOD isoform was detected in chloroplasts of *G. polyedra*, and the partial sequence of its *cDNA* obtained by PCR-based cloning techniques. Preliminary analysis of molecular phylogeny indicated that dinoflagellate and other plastid FeSOD are highly similar to cyanobacterial FeSOD, reinforcing the theory for the endosymbiotic origin of modern chloroplasts. Induction of FeSOD by metal exposure included increases in its *mRNA* levels, revealing a novel mechanism of positive transcriptional regulation in *G. polyedra*. In contrast, the *mRNA* levels of FeSOD remained constant through out the circadian cycle, indicating a distinct circadian control at the translational level.

We described here that the pollutant metals analyzed are extremely toxic and able to induce oxidative stress in chloroplasts of *G. polyedra*, particularly under acute conditions. However, under chronic conditions of metal stress, the maintenance of a high antioxidant capacity, with increased FeSOD expression, is a relevant strategy to prevent structural damage and loss of chloroplastic functions as a consequence of oxidative insult. Such antioxidant modulation within chloroplasts suggests that biochemical adaptation in *G. polyedra* involve immediate and specific responses at the subcellular site where oxidative stress is triggered. This adaptive process could contribute to the overall resistance of this dinoflagellate to pollutant metal stress. Moreover, the distinct levels of regulation found for FeSOD indicate the important role of this isoform in the oxidative balance of chloroplasts, and provide new insight on gene regulation in *G. polyedra*. The present work provides the first steps in the elucidation of the biochemical and molecular components of adaptive processes in algae.

ABREVIATURAS

AbSOD: anticorpo policlonal contra superóxido dismutase

Amp: ampicilina

Apx: ascorbato peroxidase

BSA: albumina sérica bovina

CAT: catalase

cDNA: complementary DNA

CEM: concentração de efeito máximo

CENO: concentração máxima de efeito não observado

CE50: concentração efetiva para a redução de 50 % da sobrevivência celular

D.O: densidade óptica

dCTP: desoxi ribo citidina trifosfato

DEPC: dietil pirocarbonato

dNTP: desoxi ribo nucleotídeos trifosfatos

DTNB: 5,5'-ditiobis-2-ácido nitrobenzólico

DTT: ditioneitol

EDTA : ácido etileno diamino tetra acético

ERO: espécies reativas de oxigênio

GAPDH: gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase

GPx: glutationa peroxidase

GR: glutationa redutase

GSH: glutationa reduzida

GSSG: glutationa oxidada

h: hora

HPLC: high performance liquid chromatography

IPTG: isopropil tio β -galactosídeo

LB: Meio de Cultura Luria-Broth

min: minuto

MOPS: 3-(N-morfolino) ácido propano-sulfônico

MT: metal

NADP⁺: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (oxidada)

NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (reduzida)

PAGE: non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis

PBS: tampão fosfato salino

PCP: peridinin-chlorophyll binding protein complex

PCR: polymerase chain reaction

POD: peroxidases

PSI: fotossistema I

PSII: fotossistema II

RACE: rapid amplification of cDNA ends

RT-PCR: reverse transcriptase-polymerase chain reaction

RuBisco: ribulose 1,5 difosfato carboxilase/oxidase

s: segundo

SDS: dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE: denaturing polyacrylamide gel electrophoresis

SOD: superóxido dismutase

TEMED: N,N,N',N', tetra metil etileno diamina

TNB: 5-tio-2-nitrobenzoato

Tris: tris (hidroxi metil) amino metano

u.a: unidades arbitrárias

X-gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosídeo

ÍNDICE

1. Introdução

1.1. Processos de adaptação às variações do ambiente	1
1.2. Toxicidade do oxigênio	3
1.2.1. Espécies reativas de oxigênio e antioxidantes	4
1.2.2. Estresse oxidativo induzido por metais em cloroplastos	10
1.2.3. SOD e resistência ao estresse ambiental	14
1.3. Aspectos da biologia do dinoflagelado <i>Gonyaulax polyedra</i>	16

2. Objetivos 20

3. Materiais e Métodos

3.1. Reagentes	22
3.2. Condições de cultivo celular	23
3.3. Delineamento experimental	24
3.4. Bioensaios de toxicidade com metais poluentes	25
3.5. Preparo de extratos celulares e determinação protéica	26
3.6. Purificação de cloroplastos	26
3.7. Dosagem de antioxidantes	27
3.7.1. Atividade enzimática	27
3.7.2. Extração e análise de pigmentos	29
3.8. Determinação de lesões oxidativas	30
3.8.1. Peroxidação lipídica	30
3.8.2. Oxidação protéica	31
3.9. Índices de estresse oxidativo	31
3.9.1. Consumo de oxigênio	31
3.9.2. Poder redutor	31
3.10. Determinação dos níveis protéicos de SOD	32
3.11. Estratégia de clonagem da isoforma FeSOD	33
3.11.1. Elaboração de <i>primers</i> degenerados	33

3.11.2. Extração de <i>RNA</i> total e purificação de <i>RNA</i> mensageiro	34
3.11.3. Amplificação de segmentos de <i>cDNA</i> por <i>PCR</i>	35
3.11.4. Subclonagem de produtos de <i>PCR</i>	37
3.11.5. Identificação e análise molecular dos clones de <i>cDNA</i>	40
3.12. Análise de expressão da FeSOD	42
3.12.1. Híbridações em <i>Northern blot</i>	42
3.12.2. Quantificação por <i>RT-PCR</i>	43
3.13. Análise estatística	44
4. Resultados	
4.1. Toxicidade de metais poluentes a <i>G. polyedra</i>	45
4.1.1. Sobrevivência celular e parâmetros toxicológicos	45
4.1.2. Encistamento e bioluminescência	47
4.2. Balanço oxidativo em cloroplastos	55
4.3. Padrões de indução da enzima SOD	61
4.3.1. Efeitos do tempo de exposição e concentração de metais	61
4.3.2. Isoformas de SOD presentes em <i>G. polyedra</i>	64
4.3.3. Indução diferencial das isoformas de SOD	66
4.4. Clonagem parcial e análise de expressão da FeSOD	71
4.4.1. Caracterização molecular prévia	71
4.4.2. Padrões de expressão	87
5. Discussão	
5.1. Efeitos do estresse metálico em <i>G. polyedra</i>	92
5.2. Modulação de antioxidantes cloroplásticos	95
5.3. Isoformas de SOD e padrões de indução enzimática	99
5.4. Expressão diferencial de FeSOD: regulação redox <i>versus</i> controle circadiano	100
6. Conclusões	106
7. Referências bibliográficas	107

1. INTRODUÇÃO

1.1. Processos de adaptação às variações do ambiente

Estudos em biologia moderna têm se voltado à compreensão das estratégias adaptativas que conferem resistência aos organismos frente às adversidades do ambiente. A capacidade intrínseca de percepção, sinalização e resposta às variáveis ambientais é uma característica comum a todos os organismos, importante na manutenção de seus processos vitais, durante condições de estresse ambiental.

As diferentes formas de estresse podem decorrer tanto de variações naturais do meio, como dos impactos da atividade antrópica. Variações ditas naturais podem incluir mudanças periódicas (circadianas, sazonais, etc.) de fatores abióticos como temperatura, intensidade luminosa e pressão de oxigênio. Tais oscilações influenciam o metabolismo celular dos organismos, resultando em extensas modificações bioquímicas. Por outro lado, variações ambientais decorrentes da atividade antrópica resultam, muitas vezes, em mudanças drásticas do meio, acarretando danos severos à biota (Davison & Pearson, 1996). Um exemplo da interferência antrópica no ambiente marinho é a contaminação por metais que, nas últimas décadas, tem recebido atenção especial devido à sua grande descarga no ambiente, longa persistência e toxicidade a uma variedade de organismos. Como muitos metais são importantes nutrientes requeridos em processos biológicos, a maioria dos organismos possui a capacidade de concentrá-los. Contudo, alguns metais como o cádmio (Cd^{2+}), chumbo (Pb^{2+}) e o mercúrio (Hg^{2+}) não são essenciais ao crescimento celular e consistem em elementos extremamente tóxicos (Trevors *et al.* 1986). O acúmulo destes metais tóxicos pode ser bastante aumentado através da cadeia alimentar marinha, devido à sua rápida assimilação pelos organismos e retenção por longos períodos em seus tecidos. Assim, um dos principais problemas com relação à poluição por metais é a alta meia-vida

biológica destes elementos. Neste sentido, o fitoplâncton é, provavelmente, o mais importante vetor biológico de metais tóxicos, uma vez que estes organismos constituem a maior biomassa de produtores primários dos oceanos e representam o primeiro ponto de entrada de poluentes na cadeia alimentar marinha. Em decorrência da exposição a estes metais, vários efeitos nocivos aos organismos têm sido documentados, incluindo alterações no metabolismo oxidativo das células, que pode significar o passo inicial para a promoção de diversos danos celulares (Vangronsveld & Clijsters, 1994).

Nestas circunstâncias, a reação dos organismos contra as adversidades do ambiente pode ocorrer através de diferentes processos adaptativos. Segundo Prosser (1986), a tolerância e sincronização dos organismos às variações naturais periódicas do seu ambiente ocorrem devido a um processo particular, definido como adaptação de capacidade. Um exemplo disto é a capacidade de sincronização metabólica dos organismos, em relação às oscilações do seu meio externo, devido à manutenção de um ritmo endógeno controlado pelo relógio biológico (Rietveld, 1996). Além deste, um outro processo conhecido por adaptação de resistência é especialmente importante em condições ambientais extremas. Ambos processos adaptativos incluem respostas celulares de curto e médio prazo, dentro de limites geneticamente estabelecidos, envolvendo reorganizações de vias bioquímicas e ativação de proteínas de defesa (Huggett, *et al.* 1992). Estudos pioneiros nesta área revelaram modulações na expressão de um grupo comum de genes, codificadores de proteínas pertencentes a vias de detoxificação e/ou reparo de danos celulares (Elstner, 1988). Assim, induções de proteínas como as citocromo P450 mono-oxigenases, metalotioneínas, proteínas de choque térmico e enzimas antioxidantes, por exemplo, ocorrem perante exposição subta a xenobióticos, metais pesados, extremos de temperatura e estresse oxidativo, respectivamente (Bohnert *et al.* 1995). Esta capacidade de adaptação bioquímica é, portanto, uma importante propriedade encontrada em todos os organismos, responsável pela ampliação dos seus

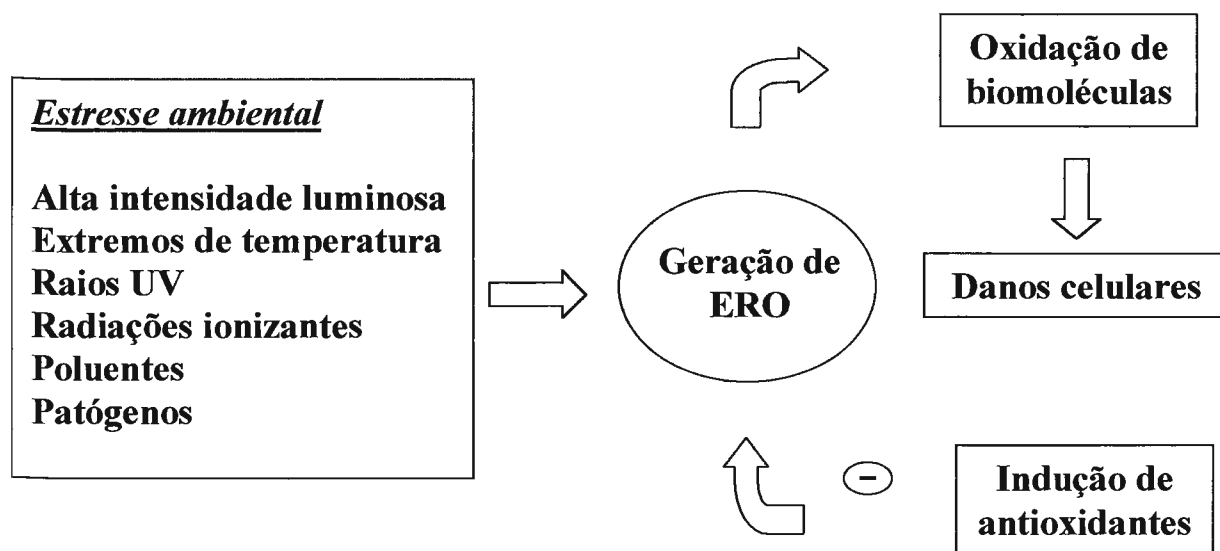
limites de resistência às adversidades do meio. A longo prazo, a plasticidade e eficácia de tais mecanismos moleculares de resistência parecem ser importantes no estabelecimento de características adaptativas que aumentem a aptidão dos organismos, ao longo do processo evolutivo.

1.2. Toxicidade do Oxigênio

Um importante componente de tais estratégias adaptativas é a transdução do sinal de estresse entre os meios extra e intracelulares, disparando as diversas respostas moleculares (Burdon, 1996). Entretanto, tal via de sinalização é complexa, com mecanismos e natureza de fatores envolvidos, bastante variáveis. Recentemente, processos de sinalização redox têm sido descritos, envolvendo diferentes moléculas redox sensíveis e espécies reativas de oxigênio (ERO) como moduladores (Suzuki *et al.* 1997). De fato, efeitos de diferentes fatores de estresse ambiental convergem a uma via bioquímica comum, caracterizada por elevações na concentração celular de ERO. Este desbalanço metabólico onde a condição pró-oxidante predomina, em relação a antioxidante, é conhecido como estresse oxidativo celular. Apesar da sua função protetora contra infecção microbiana em células fagocitárias e do seu papel enquanto moléculas sinalizadoras em diferentes processos celulares, as ERO também são conhecidas pelos seus efeitos deletérios sobre as células, devido à sua capacidade de reagir e oxidar biomoléculas fundamentais como os lipídeos de membrana, proteínas e ácidos nucleicos, provocando alterações drásticas de suas conformações nativas e, conseqüentemente, de suas funções biológicas.

Cloroplastos constituem uma importante fonte geradora de ERO em organismos fotossintetizantes. Nestas organelas, a alta concentração de oxigênio e o fluxo de elétrons requeridos no processo fotossintético, favorecem a condição pró-oxidante. Outra importante fonte de ERO em sistemas biológicos é a formação de complexos com metais de transição, uma vez que

estes são eficientes catalisadores de reações redox e indutores de estresse oxidativo celular. Assim, diferentes fatores de pressão ambiental como, por exemplo, fatores que interferem na fotossíntese ou que aumentam a disponibilidade de metais para reações químicas, podem instalar um estresse secundário nos organismos, o estresse oxidativo. Nestas condições, a ativação do sistema de defesa antioxidante celular é essencial para a sobrevivência dos organismos (Esquema 1).

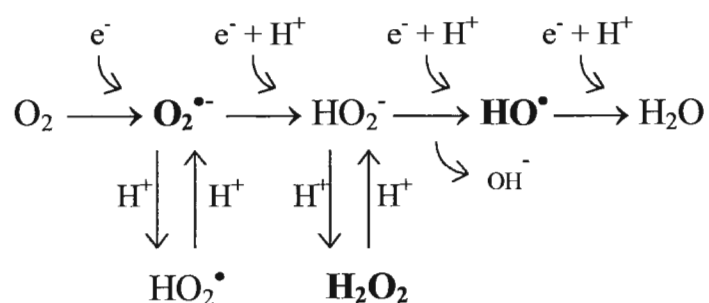


Esquema 1. **Antioxidantes e resistência ao estresse ambiental.** Diferentes fatores de estresse ambiental podem promover um estado pró-oxidante celular, através da estimulação da produção de ERO. Nestas condições, a indução de antioxidantes é um importante mecanismo de defesa, prevenindo lesões oxidativas e conseqüentes danos celulares.

1.2.1. Espécies reativas de oxigênio e antioxidantes

A utilização metabólica do oxigênio molecular (O_2) na obtenção de energia trouxe grandes vantagens aos organismos. Na fosforilação oxidativa, o O_2 atua como acceptor final de elétrons, onde é reduzido a água, sendo esta a via metabólica responsável pela manutenção do equilíbrio energético dos seres

aeróbios. Entretanto, apesar do O_2 ser essencial para a sobrevivência destes organismos, ele pode se tornar tóxico devido à formação intracelular de bioprodutos decorrentes de seu metabolismo, as ERO. Algumas destas espécies semi-reduzidas são altamente reativas, podendo provocar sérios danos celulares, inclusive letalidade. A toxicidade do O_2 provém da formação de produtos decorrentes da sua redução ou excitação a outros estados. A redução completa do O_2 a água requer quatro elétrons. Quando esta redução do O_2 se processa em passos univalentes, há a formação de intermediários reativos, entre eles o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (HO^{\bullet}), como mostra o esquema 2:



Esquema 2. **Principais vias de redução univalente do oxigênio e formação de intermediários reativos.**

O O_2 apresenta dois elétrons desemparelhados com *spins* paralelos, requerendo uma inversão de *spin* quando um par de elétrons lhe é adicionado, conforme o princípio de exclusão de Pauli. Como esta inversão de *spin* ocorre durante um período relativamente longo, o O_2 tem maior tendência em reagir com espécies que possuam elétrons desemparelhados, do que com substratos doadores de pares de elétrons (Salin, 1987). Nestas condições, forma-se o $O_2^{\bullet-}$ que também pode estar presente na forma protonada, como radical hidroperoxil

(HO_2^\bullet). O $\text{O}_2^{\bullet-}$ também pode ser produzido pela redução univalente do O_2 ou oxidação univalente do H_2O_2 . O $\text{O}_2^{\bullet-}$ pode, ainda, ser formado enzimaticamente por certas flavoproteínas desidrogenases (Freeman & Crapo, 1982, Farber *et al.* 1990) ou espontaneamente, pela auto-oxidação de substratos como ferridoxinas, hidroquinonas, tióis e heme-proteínas reduzidas (Fridovich, 1974). O H_2O_2 , assim como o $\text{O}_2^{\bullet-}$, pode agir tanto como oxidante quanto redutor, sendo a mais estável das ERO. Sua reação com substratos orgânicos não é muito eficiente, mas possui grande tendência em formar complexos com metais de transição. A mais reativa das ERO é o HO^\bullet , produto da redução univalente do H_2O_2 . Devido ao seu alto poder oxidante, o HO^\bullet reage com o primeiro substrato disponível, apresentando grande potencial destrutivo em sistemas biológicos (Halliwell & Gutteridge, 1999).

ERO eletronicamente excitadas também podem ser geradas quando elétrons são elevados ao orbital mais alto e seu *spin* é invertido. Este *spin* anti-paralelo resultante é referido como estado *singlet*. Quando energia suficiente é fornecida ao O_2 , este passa do estado fundamental *triplet* para o estado excitado *singlet* ($\text{O}_2\ ^1\Delta_g$). O $\text{O}_2\ (^1\Delta_g)$ pode ser formado em diferentes sistemas químicos, bioquímicos ou fotoquímicos. Em vegetais, um mecanismo muito comum de formação de $\text{O}_2\ (^1\Delta_g)$ é o sistema fotossensibilizante, no qual os pigmentos vegetais absorvem um fóton e o transferem para o O_2 . Neste sistema, os pigmentos carotenóides, abundantes nos tecidos vegetais, desempenham importante função antioxidante, atuando como supressores de $\text{O}_2\ (^1\Delta_g)$ (Di Mascio *et al.* 1995). Por serem altamente reativas, as ERO possuem meia vida bastante curta e são conhecidas pelos seus efeitos deletérios sobre os tecidos celulares (Halliwell & Gutteridge, 1999). Estudos recentes em mamíferos têm sugerido a participação de ERO como agentes significativos no desenvolvimento de diversas patologias pulmonares, hepáticas e cardíacas, decorrentes de lipoperoxidação e alterações histo-patológicas nestes tecidos

(Jamal & Sprowls, 1987, Salovsky *et al.* 1992, Kostic *et al.* 1993), bem como o desenvolvimento de diversas doenças como porfiria e câncer (Zhong *et al.* 1990, Monteiro *et al.* 1991). Apesar dos seus efeitos prejudiciais, as ERO também possuem papel importante na manutenção homeostática de determinados organismos como, por exemplo, certas algas marinhas, providas de radicais de haletos de alquila utilizados na proteção contra predadores e supressão do crescimento da microflora ambiental. As ERO também atuam na proteção da integridade celular contra infecção microbiana em células fagocitárias (Halliwell & Gutteridge, 1999) e possuem um papel biológico bastante importante, enquanto moléculas sinalizadoras em diferentes processos celulares, como aquisição de resistência sistêmica em plantas e apoptose (Khan & Wilson, 1995).

Apesar da alta reatividade das ERO, estas podem ser toleradas e utilizadas em determinados níveis pelos organismos. Diferentes substâncias exercem papel de fundamental importância na destruição espontânea e metabolização destas espécies (Tabela 1). Entre as substâncias que fazem parte do sistema não-enzimático de defesa antioxidante encontram-se a vitamina C, vitamina E, carotenóides, flavonóides, bilirrubina, ácido úrico, tióis e proteínas plasmáticas, como a ceruloplasmina (Rice-Evans *et al.* 1991, Rice-Evans *et al.* 1996). Quanto aos mecanismos enzimáticos da defesa antioxidante, podemos citar as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidases (POD). Estas enzimas são responsáveis pela manutenção do equilíbrio entre produção e remoção de ERO, fundamental para a sobrevivência dos seres aeróbios. As reações enzimáticas envolvidas na manutenção dos níveis intracelulares de ERO são demonstradas nas equações seguintes.

Reações catalisadas por enzimas de defesa antioxidante:

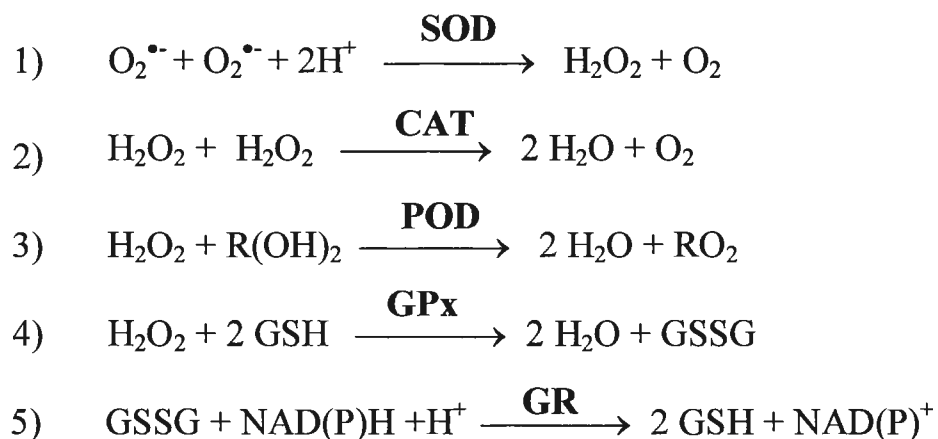


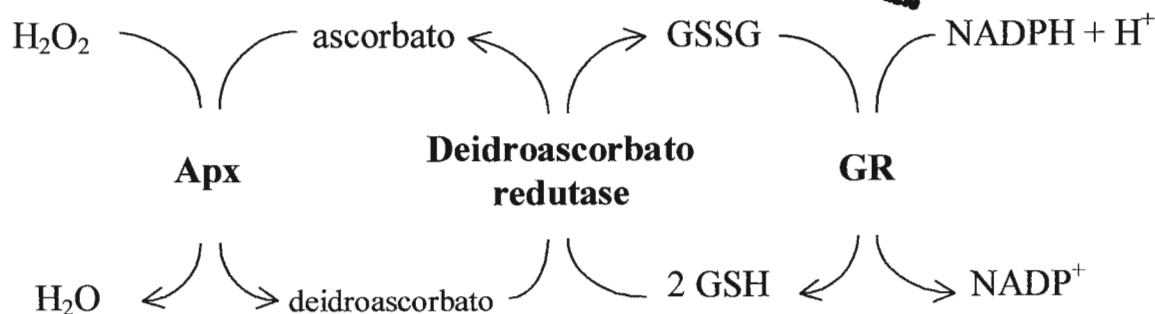
Tabela 1. Principais componentes da defesa antioxidante celular

Não-enzimática	Moléculas alvo
Ascorbato	$\text{O}_2(^1\Delta\text{g})$, HO^\bullet , $\text{O}_2^{\bullet-}$, HO_2^\bullet
Carotenóides	$\text{O}_2(^1\Delta\text{g})$, RO_2^\bullet
α -tocoferol	RO_2^\bullet , cadeia de radicais
Glutationa	inespecífica
Urato	$\text{O}_2(^1\Delta\text{g})$, metais
Fenólicos e flavonóides	inespecíficos
Enzimática	
SOD	$\text{O}_2^{\bullet-}$
POD	H_2O_2
CAT	H_2O

A CAT é uma enzima tetramérica que possui um grupo heme ligado ao seu sítio ativo, presente na maioria dos organismos aeróbios. Nos vegetais, a CAT encontra-se predominantemente nos peroxissomos e aparentemente ausente nos cloroplastos (Salin, 1987). Assim, a remoção de H_2O_2 nestas organelas é delegada às peroxidases, presentes em grandes quantidades nos tecidos vegetais. Estas enzimas, além do papel antioxidante, participam de vários outros processos fisiológicos como lignificação, desenvolvimento e crescimento vegetal. A indução da atividade de peroxidases também tem sido considerada uma resposta geral a várias condições de estresse, como contaminação por metais e processos fisiológicos que envolvam H_2O_2 (VanAssche & Clijsters, 1990).

Em animais, a enzima glutathiona peroxidase (GPx) desempenha papel de particular importância na detoxificação de H_2O_2 . Trata-se de uma seleno-enzima que utiliza o tripeptídeo tiólico glutathiona (GSH), como doador de elétrons para a redução de H_2O_2 (reação 4). A glutathiona oxidada (GSSG) pode ser novamente convertida à sua forma reduzida pela enzima glutathiona redutase (GR), a qual utiliza elétrons do NADPH para o restabelecimento dos níveis intracelulares de GSH (reação 5). Apesar da presença do substrato GSH e da enzima GR, a presença da seleno-enzima GPx em plantas é pouco freqüente (Halliwell & Gutteridge, 1999).

Um outro importante mecanismo de remoção de H_2O_2 em vegetais, particularmente nos cloroplastos, é o ciclo ascorbato-glutathiona. Nele, o ascorbato é peroxidado a deidroascorbato pela enzima ascorbato peroxidase (Apx) e este é novamente reduzido pela GSH. Os níveis de GSH são restabelecidos pela enzima GR. Neste ciclo, o H_2O_2 é removido pelo NADPH gerado na fotossíntese (esquema 3).



Esquema 3. **Ciclo ascorbato-glutationa** (extraído de Halliwell & Gutteridge, 1999).

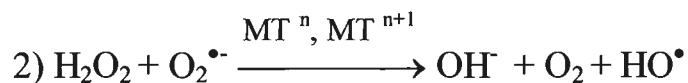
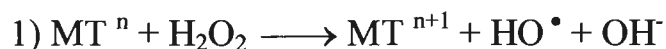
Assim, os organismos dispõem de estratégias de defesa antioxidante contra desbalanços do metabolismo oxidativo. De acordo com Sies (1993), há três etapas de defesa: **prevenção** da formação de ERO, que inclui a quelatação de íons metálicos por proteínas específicas, como as metalotioneínas em animais e peptídeos conhecidos como fitoquelatinas, nos vegetais (Grill & Winnacker, 1985). Além destes, também há a prevenção contra a formação de ERO por radiação UV, realizada por pigmentos especializados como os carotenóides; **interceptação ou inativação** das ERO que, uma vez formadas, podem causar danos aos componentes celulares. Nesta etapa, as ERO são transformadas em produtos finais não reativos e/ou transferidas para outros compartimentos celulares menos sensíveis à oxidação, pelos diversos componentes antioxidantes presentes nas células. A última etapa de defesa é o **reparo** dos danos causados pelas ERO. Quando um desbalanço oxidativo é instalado, favorecendo a condição pró-oxidante em detrimento da antioxidante, caracteriza-se o estado de estresse oxidativo celular.

1.2.2. Estresse oxidativo induzido por metais em cloroplastos

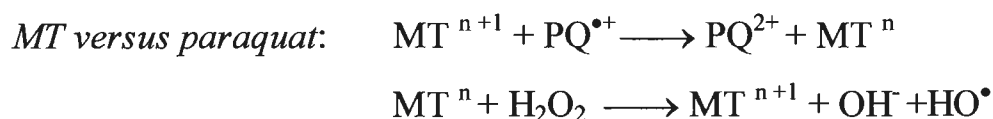
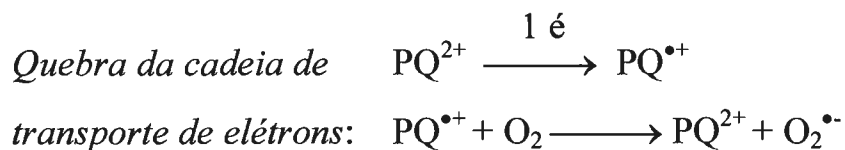
A ativação do O_2 e sua conseqüente toxicidade é uma constante ameaça aos organismos fotossintetizantes. Os cloroplastos são compartimentos

celulares extremamente susceptíveis ao estresse oxidativo, devido à alta concentração interna de O_2 , presença de fluxo de elétrons e metais, em seu microambiente. Nestas organelas, os mecanismos geradores de ERO incluem reações fotodinâmicas. Alta energia luminosa pode aumentar os níveis de moléculas excitadas como, por exemplo, clorofila *triplete* e O_2 ($^1\Delta g$). Esta última espécie é altamente eletrofílica, podendo oxidar novas moléculas. O $O_2^{\bullet-}$ também pode ser gerado pela redução do O_2 pela ferridoxina reduzida no fotossistema I (PSI), em reação conhecida como Reação de Mehler (Foyer, 1996). A difusão do $O_2^{\bullet-}$ ao estroma pode levar à sua dismutação espontânea, gerando H_2O_2 e O_2 . A reação entre H_2O_2 e metais forma o potente oxidante HO^{\bullet} , causando danos moleculares. Além disto, os lipídeos da membrana do envelope do cloroplasto e dos seus tilacóides contêm uma alta porcentagem de ácidos graxos poli-insaturados sendo, portanto, muito susceptíveis à peroxidação. Sob condições normais, estes mecanismos geradores de ERO são lentos, podendo porém ser acelerados sob exposição a xenobióticos ou altas intensidades luminosas.

Uma importante fonte de estresse oxidativo em sistemas biológicos é a intoxicação com metais, uma vez que estes são eficientes catalisadores de reações redox. Um dos metais mais importantes em sistemas biológicos é o ferro (Fe^{3+}), seguido do cobre (Cu^{2+}). A concentração iônica de Fe^{3+} no sangue humano é mantida a níveis baixos devido à sua alta reatividade com O_2 e H_2O_2 . Proteínas como a transferrina, um *scavenger* de Fe^{3+} , ferritina e hemosiderina, armazenadoras de Fe^{3+} , possuem importante papel na manutenção dos níveis séricos deste metal. A formação de HO^{\bullet} pode ocorrer pela complexação entre metais e H_2O_2 , de acordo com a Reação de Fenton (reação 1) ou pela reação entre $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 , catalisada por íons metálicos (MT), conhecida como Reação de Haber-Weiss (reação 2):



A oxidação de biomoléculas também pode ser catalisada por metais. O Fe^{3+} , por exemplo, é um conhecido catalisador de peroxidação lipídica, estando diretamente envolvido tanto na iniciação, quanto na propagação da lipoperoxidação. Além disto, os metais catalisam a oxidação de proteínas e *DNA* e podem potencializar a toxicidade de xenobióticos como o paraquat (Esquema 4).



Esquema 4. Formação de ERO mediada por metais e paraquat.

Apesar de não serem redox ativos, metais como o Cd^{2+} , Hg^{2+} e Pb^{2+} também são capazes de promover estresse oxidativo celular (Stoys & Bagchi, 1995), produzindo peroxidação lipídica e danos em *DNA*, embora os mecanismos envolvidos sejam indiretos. Sabe-se que estes metais possuem alta afinidade com grupos sulfidrílicos (-SH), podendo inativar enzimas que participam de passos metabólicos importantes ou complexar-se com a GSH, reduzindo a capacidade antioxidante celular (Halliwell & Gutteridge, 1999). Além disto, estes metais podem competir com outros metais de importância

biológica como cálcio (Ca^{2+}), alterando a sua homeostase e provocando a ativação de vários sistemas Ca^{2+} -dependentes, entre eles a ativação de endonucleases, e Fe^{3+} , alterando a sua disponibilidade a reações redox. Alguns metais pesados também são capazes de interferir no processo fotossintético, favorecendo o escoamento de elétrons ao O_2 (Asada & Takahashi, 1987, Tschiersh & Ohmann, 1993).

Assim, a exposição aos metais como consequência da poluição ambiental, pode ativar diferentes mecanismos geradores de ERO e instalar um estado de estresse oxidativo celular. Nestas condições, a sobrevivência dos organismos em ambientes contaminados deve ser altamente dependente de mecanismos de defesa capazes de prevenir o insulto oxidativo nos cloroplastos. Como descrito anteriormente, a defesa antioxidante nestas organelas é composta pelas enzimas SOD e Apx, responsáveis pela detoxificação de $\text{O}_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 , respectivamente, além de antioxidantes de baixo peso molecular. Dentre estes, GSH é um antioxidante solúvel que pode atuar diretamente como agente redutor ou indiretamente, como co-substrato de diferentes reações enzimáticas (Sies, 1999). Além destes, compostos fenólicos, abundantes em vegetais, ajudam a atenuar danos oxidativos (Rice-Evans *et al.* 1996). Pigmentos carotenóides, além de foto-receptores, também previnem danos oxidativos, principalmente por atuarem como supressores físicos de espécies eletronicamente excitadas (Krinsky, 1989).

A modulação destes antioxidantes é, portanto, uma importante estratégia para suportar adversidades ambientais. De fato, a manutenção de uma alta capacidade antioxidante tem sido relacionada ao aumento de resistência a diferentes fatores de estresse ambiental (Tsang *et al.* 1991, Van Camp *et al.* 1996). No entanto, apenas poucos estudos têm analisado esta resposta antioxidante ao nível subcelular, principalmente em cloroplastos de algas unicelulares como os dinoflagelados, os quais desempenham importante função ecológica.

1.2.3. SOD e resistência ao estresse ambiental

A defesa contra possíveis efeitos deletérios, decorrentes do estresse ambiental, pode ocorrer através de respostas localizadas envolvendo padrões alterados de expressão molecular, como a ativação de enzimas antioxidantes. Recentemente, o papel da enzima SOD em organismos sob pressões ambientais tem recebido grande atenção. A importância da SOD reside no fato desta ser a enzima antioxidante de maior distribuição entre os organismos e por ela controlar os níveis celulares de $O_2^{\bullet-}$, que apesar de não ser uma espécie altamente reativa, tem sua toxicidade atribuída à função precursora na formação de espécies mais reativas ou citotóxicas (Fridovich, 1986, Hassan, 1988) (Esquema 5). Trata-se de uma família de metalo-enzimas, classificadas de acordo com o seu cofator metálico. Até o momento, foram descritas cinco isoformas da enzima: as mais comumente encontradas são a FeSOD, MnSOD e a CuZnSOD. Recentemente, duas novas e distintas isoformas, NiSOD e FeZnSOD, foram descritas em fungos do gênero *Streptomyces*, o que sugere diferentes origens evolutivas para esta enzima, salientando a importância da sua função biológica (Youn *et al.* 1996, Kim *et al.* 1998).

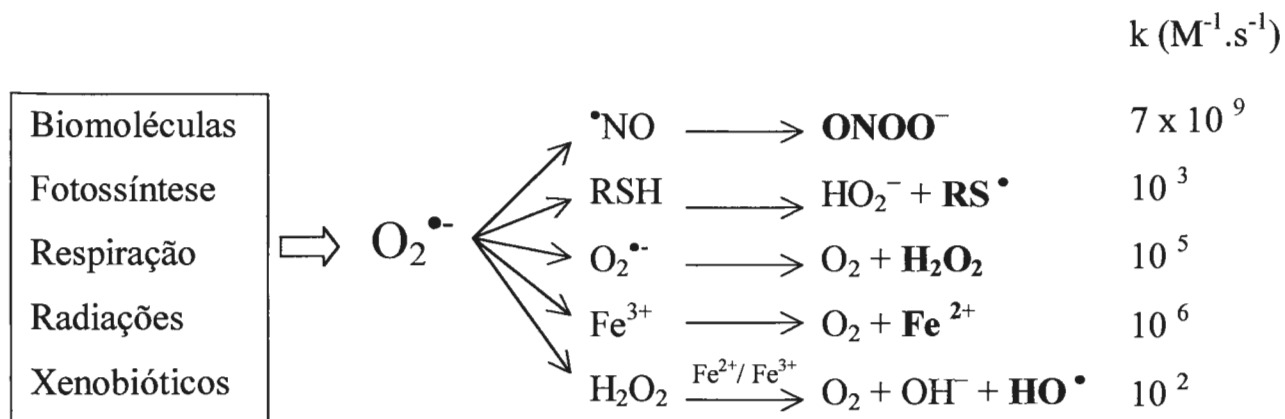
A SOD é encontrada em grandes quantidades nos organismos aeróbios, embora ausente ou em quantidades muito pequenas, em anaeróbios obrigatórios (Fridovich, 1982). As isoformas desta enzima apresentam-se diferentemente distribuídas, conforme o compartimento celular e o organismo em questão. Em geral, as isoformas predominantes em procariontes são MnSOD e FeSOD, ambas localizadas no citoplasma, enquanto eucariontes possuem uma MnSOD presente na matriz mitocondrial e uma CuZnSOD presente no citoplasma (Asada *et al.* 1980, DeJesus *et al.* 1989). As plantas superiores geralmente contêm, além das demais, uma FeSOD presente nos cloroplastos (Kwiatowski, 1987). No início, pensava-se que a CuZnSOD fosse característica apenas de eucariontes. Contudo, a presença desta isoforma foi também relatada em

bactérias como *Photobacterium leiognathi*, *Caulobacter crescentus*, *Pseudomonas diminuta* e *Pseudomonas maltophilia* (Puget & Michelson, 1974, Steinman, 1982, Steinman, 1985). Bactérias que possuem a CuZnSOD são aparentemente mais tolerantes ao estresse oxidativo extracelular que as demais bactérias, o que as permite ocupar outros nichos ecológicos. Ambas, CuZnSOD bacteriana e eucariótica, apresentam grande similaridade em sua seqüência de aminoácidos e análises da seqüência de seus genes sugerem que, em termos evolucionários, a CuZnSOD bacteriana é uma forma ancestral da CuZnSOD eucariótica (Steinman & Ely, 1990). A distribuição filogenética da SOD indica que a MnSOD e a FeSOD são formas homólogas ancestrais. Estas provavelmente surgiram antes da divergência entre procariontes e eucariontes, enquanto a CuZnSOD teve sua evolução independente das demais, em algum ponto próximo ao surgimento dos eucariontes (Bowler *et al.* 1992).

Por ser amplamente distribuída entre os organismos, a SOD tem sido utilizada como um indicador bioquímico em processos biológicos envolvendo ERO, particularmente em condições de estresse oxidativo promovido por exposição a UV, xenobióticos, extremos de temperatura e luminosidade, entre outros (Perl-Treves & Galun, 1991, Rijstenbil *et al.* 1994, Malanga & Puntarulo, 1995). Em geral, a ativação da SOD ocorre por intermédio de fatores de transcrição redox-modulados. As características bioquímicas, o papel biológico da SOD e seu substrato foram recentemente revisadas por Fridovich (1997). Apesar dos avanços nos estudos desta área, os mecanismos envolvidos na regulação da SOD ainda não estão bem esclarecidos, principalmente em organismos fotossintetizantes. Os efeitos de um estresse particular, sobre a expressão do gene para SOD, parece ser governado pelo sítio subcelular no qual o estresse oxidativo é instalado, embora não se tenha conhecimento da maneira como tal resposta seja mediada.

Desta forma, o estudo da regulação de enzimas de defesa, como a SOD, faz-se necessário ao entendimento dos mecanismos bioquímicos e moleculares

envolvidos nas respostas adaptativas que conferem resistência aos organismos às diferentes formas de estresse ambiental, sejam decorrentes dos impactos da atividade antrópica ou das variações naturais (cíclicas ou não) do ambiente.



Esquema 5. **Ânion superóxido como mediador de danos oxidativos celulares.** O $O_2^{\bullet-}$ gerado em diferentes situações pode reagir com moléculas vizinhas, gerando espécies químicas de maior potencial citotóxico.

1.3. Aspectos da biologia do dinoflagelado *Gonyaulax polyedra*

Dinoflagelados são algas unicelulares que habitam ambos ambientes, marinho e de água doce. Cerca de metade das espécies de dinoflagelados é fotossintetizante, enquanto a outra metade é composta por espécies heterotróficas ou parasitas. Desta forma, estes organismos possuem grande importância ecológica, pois atuam como produtores primários e consumidores na cadeia trófica aquática. Além disto, muitas espécies são simbiontes, como as do gênero *Symbiodinium*, sendo responsáveis pela atividade fotossintética necessária ao desenvolvimento de corais. Dinoflagelados são também economicamente importantes por produzirem neurotoxinas, cujos efeitos prejudiciais são potencializados durante eventos de marés vermelhas. Muitos dinoflagelados apresentam reprodução tanto assexuada quanto sexuada. No gênero *Gonyaulax*, a reprodução sexuada leva à formação de um cisto

(hipnozigoto). Cistos também são formados assexuadamente. Sabe-se que diferentes fatores como luz, temperatura, densidade celular e carência nutricional são capazes de induzir a formação destes cistos assexuais em *Gonyaulax* (Anderson *et al.* 1984). O encistamento em dinoflagelados desempenha importante papel na dispersão e sobrevivência destas algas sob condições ambientais desfavoráveis estando, provavelmente, relacionado ao fenômeno das marés vermelhas (White & Lewis, 1982, Steidinger, 1993).

Dinoflagelados possuem peculiaridades que tornam suas afinidades filogenéticas e história evolutiva, enigmáticas. De fato, devido a características aparentemente primitivas, estes organismos já foram considerados intermediários evolutivos entre procariontes e eucariontes (Herzog & Maroteaux, 1986). Dentre tais características, inclui-se o seu núcleo, que possui cromossomos permanentemente condensados, além de ausência de histonas e nucleossomo (Rizzo, 1991). A divisão mitótica é distinta da dos demais eucariontes, e a quantidade de *DNA* genômico, excepcionalmente grande, atingindo cerca de 200 pg por núcleo, comparado aos 3,2 pg por núcleo, encontrado em células humanas (Holm-Hansen, 1969). Entretanto, análises filogenéticas recentes têm indicado um alto grau de parentesco com ciliados, sugerindo uma divergência mais tardia dos dinoflagelados em relação aos procariontes, na escala evolutiva (Saunders *et al.* 1997).

Outra característica importante destes organismos é a presença de cloroplastos atípicos, circundados por três membranas e contendo um pigmento carotenóide distinto, chamado peridina. Este pigmento é encontrado somente em certas espécies de dinoflagelados, onde forma um complexo com a clorofila, conhecido por *PCP* (*peridinin-chlorophyll binding protein*), o qual é hidrossolúvel e de estrutura distinta (Hofmann *et al.* 1996). A origem dos cloroplastos em dinoflagelados é ainda um tema em debate, podendo ter ocorrido pela endossimbiose com um procarionte ou com um eucarionte fotossintético (Gibbs, 1981).

Certas espécies de dinoflagelados como as do gênero *Gonyaulax*, *Pyrocystis* e *Noctiluca* são ainda bioluminescentes, estando entre os 6 % dos dinoflagelados responsáveis pela “fosforescência dos oceanos”. A emissão de luz nestes organismos parece ser importante para evitar sua predação pelo zooplâncton (Abrahams & Townsend, 1993). Devido à facilidade de seu monitoramento, a bioluminescência foi um dos primeiros fenômenos fisiológicos reportados sob o controle de um relógio circadiano, em eucariontes primitivos (Hastings & Sweeney, 1958). De fato, grande parte do conhecimento sobre os mecanismos moleculares de regulação circadiana, em dinoflagelados, decorre de estudos sobre a bioluminescência de *Gonyaulax polyedra*. Trata-se de um dinoflagelado marinho de aproximadamente 40 µm de diâmetro, fotoautotrófico e bioluminescente, que exhibe dois tipos diferentes de emissão de luz espontânea: *flashes* (pulsos rápidos de luz) e *glow* (luz contínua). Nesta espécie, a bioluminescência é emitida a partir de pequenas organelas corticais denominadas *scintillons*, estimulada pela acidificação do meio (Fogel & Hastings, 1972). Estas organelas contêm apenas os componentes necessários à emissão de luz, i.e., a enzima luciferase, seu substrato (luciferina) e uma proteína reguladora conhecida por *LBP* (*luciferin binding protein*) (Wilson & Hastings, 1998). A emissão máxima de luz azul (490 nm) ocorre na fase escura do ciclo circadiano e este ritmo bioluminescente é atribuído à síntese e destruição diária de todos os seus componentes, incluindo os *scintillons* (Fritz *et al.* 1990, Morse *et al.* 1990). No caso das proteínas *LBP* e luciferase, a regulação circadiana de sua síntese é exercida pelo controle da tradução de seus respectivos transcritos (Morse *et al.* 1989, Mittag *et al.* 1998).

Além do ritmo bioluminescente, outros processos também demonstraram ser regulados circadianamente em *G. polyedra*, como divisão celular, motilidade, fotossíntese, assimilação de nitrogênio e metabolismo oxidativo (Hastings *et al.* 1961, Homma & Hastings, 1989, Roenneberg & Hastings, 1991, Ramalho *et al.* 1995, Hollnagel *et al.* 1996). O rápido aumento do

volume de pesquisas nesta área transformou os dinoflagelados em excelentes organismos modelos ao estudo de ritmos biológicos, em eucariontes. Entretanto, muitos dos aspectos biológicos dos dinoflagelados, como a sua organização genômica e o controle da expressão de seus genes, permanecem ainda incertos.

2. OBJETIVOS

A manutenção da atividade biológica dos organismos decorre de processos adaptativos que, a curto e médio prazo, requerem uma reorganização bioquímica, envolvendo a indução de diferentes proteínas de defesa. Embora a indução de antioxidantes seja freqüentemente correlacionada ao aumento de resistência a diferentes formas de estresse ambiental, poucos trabalhos têm investigado esta resposta de defesa ao nível subcelular. Como os cloroplastos são compartimentos celulares altamente susceptíveis ao estresse oxidativo e a intoxicação por metais poluentes, uma importante fonte geradora de ERO em sistemas biológicos, a resistência de organismos fotossintéticos ao estresse metálico deve ser dependente de adaptações bioquímicas que previnam o insulto oxidativo em seus cloroplastos.

Recentemente, nosso grupo de pesquisa observou variações circadianas na atividade total da enzima SOD de *G. polyedra*, cujo máximo de atividade coincide com o seu pico de atividade fotossintética, sugerindo um papel na defesa antioxidante cloroplástica (Asano *et al.* 1995). Esta enzima tem sido considerada um excelente indicador bioquímico de estresse oxidativo, por representar a primeira linha de defesa antioxidante celular na interceptação de ERO. Apesar do grande volume de estudos sobre a ativação da SOD em diferentes condições ambientais, os mecanismos envolvidos na sua regulação ainda não estão bem esclarecidos em organismos fotossintéticos, especialmente em algas. Neste sentido, o interesse deste trabalho está voltado à importância de antioxidantes cloroplásticos, particularmente da SOD, na aquisição de resistência a adversidades do ambiente e ao nível de regulação desta importante enzima de defesa antioxidante, em algas unicelulares. O estudo em dinoflagelados traz ainda, como consequência, uma contribuição para o enriquecimento das informações moleculares destes organismos.

Assim, os objetivos específicos desta tese abordam os seguintes aspectos relacionados à modulação de antioxidantes cloroplásticos e respostas específicas da enzima SOD, na adaptação bioquímica de *G. polyedra* ao estresse imposto por metais poluentes:

- i) Bioensaios de toxicidade dos metais Hg^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} e Cu^{2+} a *G. polyedra*: a) determinação das porcentagens de sobrevivência celular em concentrações crescentes de metais; b) estimativa da CE50 (concentração efetiva para a redução de 50 % da sobrevivência celular), CENO (concentração máxima de efeito não observado) e CEM (concentração de efeito máximo) de cada metal; c) efeitos de metais sobre o encistamento e bioluminescência de *G. polyedra*;
- ii) Avaliação dos efeitos de metais sobre o equilíbrio oxidativo de cloroplastos, nos modelos de tratamento, crônico e agudo;
- iii) Estudo das respostas da atividade da SOD sob exposição a metais: a) em diferentes tempos de exposição; b) em diferentes concentrações de metais;
- iv) Discriminação das isoformas FeSOD, MnSOD e CuZnSOD em *G. polyedra*;
- v) Identificação das isoformas de SOD que sofrem variações de atividade, sob estresse metálico e ao longo do ciclo circadiano;
- vi) determinação dos níveis protéicos de SOD, sob estresse metálico e ao longo do ciclo circadiano;
- vii) determinação dos níveis de transcritos da isoforma cloroplástica de SOD, sob estresse metálico e ao longo do ciclo circadiano.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Reagentes

Meio de Cultura: Nitrato de sódio, tiamina, biotina, sulfato de zinco heptahidratado, cloreto de cobalto hexahidratado, cloreto de manganês tetra hidratado, molibdato de sódio di hidratado, cloreto de ferro hexahidratado, cloreto de cádmio, cloreto de mercúrio e nitrato de chumbo (Sigma). Fosfato de sódio monobásico anidro e sulfato de cobre pentahidratado (Merck).

Tampões de Reação e de Extração: Fosfato de sódio monobásico (Vetec), fosfato de sódio dibásico (Merck), Tris-HCl, EDTA, sacarose, β -mercaptoetanol e cloreto de magnésio (Sigma).

Ensaio bioquímico: Ácido tricloro acético, 2,4-dinitro fenil hidrazina, ciclo hexano, guanidina, GSH, ácido perclórico (HClO_4), biperidina e DTNB (Sigma).

Análise de proteínas: SDS (Polyscience). Persulfato de amônio, acrilamida, bis-acrilamida, Tris, glicina, azul de bromofenol, TEMED, padrão de peso molecular *Dalton Mark VII-L*, BSA, *Ponceau Red* (Sigma). Membrana de nitrocelulose (BioRad). Papel de filtro 3 MM (Whatman). Filme fotossensível *BioMax*, soluções de Revelação e de Fixação (Kodak). [γ ^{125}I]-proteína A (Amersham). Metanol (Merck).

Ensaio enzimático: *Nitroblue tetrazolium*, riboflavina, citocromo *c*, cianeto de potássio, xantina oxidase, hipoxantina, ascorbato e H_2O_2 (Sigma). Reagente de Bradford (BioRad).

Cromatografia líquida de alta performance (HPLC): Acetonitrila, metanol, clorofórmio, diclorometano, n-hexano, acetato de etila e acetona (EM Science). β -caroteno e clorofila *a* (Sigma).

Extração e análise de ácidos nucleicos: Agarose, azida, brometo de etídeo, padrões *DNA* e *RNA ladder*, proteinase K e *RNAse* (Gibco BRL). Cloreto de

lítio, DEPC, formaldeído, MOPS, fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), acetato de sódio, hexadecil-trimetil brometo de amônio, ácido bórico, isotiocianato de guanidina, citrato de sódio, sarcosil, hidróxido de sódio, ácido clorídrico, cloreto de sódio, sódio-EDTA, SDS, formamida, azul de bromofenol e xileno cianol (Sigma). Fosfato de sódio dibásico, etanol absoluto e isopropanol (Merck). Glicerol (Nuclear). Membrana de *nylon* (Amersham). Papel de filtro 3 MM (Whatman). Filme fotossensível *BioMax*, soluções de Revelação e de Fixação (Kodak).

Amplificação e subclonagem de produtos de PCR: Síntese de oligonucleotídeos, kits 3' *RACE*, 5' *RACE* e *SuperScript*, meio LB e enzima de restrição EcoRI (Gibco BRL). Cloreto de magnésio, cloreto de potássio, triton X-100, dNTPs, enzima Taq polimerase e kit pGEM-T *vector System* (promega). Sephadex G10, ampicilina, X-gal e IPTG (Sigma).

Marcação radioativa de ácidos nucléicos: Kit *Random primers DNA labeling system*, *Concert rapid purification of PCR products* (Gibco BRL). [α ^{32}P]-dCTP (Amersham).

3.2. Condições de cultivo celular

Células de *G. polyedra*, provenientes da linhagem Gp70 do banco de algas do Instituto Oceanográfico de Woods Hole (MA, USA), foram cultivadas em meio de cultura semi-definido Guillard f/2 (Guillard & Ryther, 1962), que consiste em água do mar enriquecida com vitaminas, nitrato, fosfato e metais-traço, previamente esterilizada. A densidade celular inicial de cada cultura foi de aproximadamente 2×10^3 células/mL. Os cultivos foram mantidos em incubadoras apropriadas, à 20 ± 1 °C, sob um fotoperíodo de 12 h claro (intensidade luminosa de $150 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) e 12 h escuro (ciclo LD 12:12 h). As células expostas a metais, destinadas aos ensaios toxicológicos e bioquímicos, foram mantidas em meio f/2, acrescido de concentrações

variadas de sais de mercúrio (HgCl_2), cádmio (CdCl_2), chumbo ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$) e cobre (CuSO_4), individualmente, sob as mesmas condições de luz e temperatura.

3.3. Delineamento Experimental

Oscilações circadianas: a expressão de processos bioquímicos foi monitorada ao longo do ciclo circadiano, sob um fotoperíodo alternado de claro/escuro (ciclo LD 12:12h) ou condições constantes de luz atenuada (ciclo LL, $40 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). O início do período claro é definido como tempo zero (LD 0). Para células em condições constantes, este início do período claro subjetivo é indicado como tempo circadiano zero (CT 0).

Estresse oxidativo induzido por metais: o estudo dos efeitos dos metais sobre o metabolismo oxidativo de *G. polyedra* foi realizado seguindo modelos crônico e agudo de estresse metálico, uma vez que a concentração e o tempo de exposição aos metais são variáveis determinantes de seus efeitos, em sistemas biológicos.

No modelo crônico de curto prazo, as células foram mantidas em concentrações subletais de metais (5,0 ppb Hg^{2+} ; 0,5 ppm Cd^{2+} ; 2,0 ppm Pb^{2+} ; 0,1 ppm Cu^{2+}), inferiores aos seus respectivos valores médios de CE50, durante pelo menos 30 dias de exposição.

No modelo agudo de tratamento, as células foram mantidas em altas concentrações de metais (10 ppb Hg^{2+} ; 1 ppm Cd^{2+} ; 5 ppm Pb^{2+} ; e 0,25 ppm Cu^{2+}), durante 48 h de exposição.

As doses utilizadas em cada modelo experimental, foram escolhidas baseando-se nos resultados prévios de bioensaios de toxicidade para cada metal, conforme descrito a seguir.

3.4. Bioensaios de toxicidade com metais poluentes

Bioensaios foram realizados com o intuito de determinar o grau de toxicidade dos metais Hg^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} e Cu^{2+} , ao dinoflagelado *G. polyedra*, analisando seus efeitos sobre o crescimento, encistamento e bioluminescência desta alga. As culturas celulares foram expostas a concentrações crescentes de metais, durante um período de 48 e 96 h, sob as condições experimentais de temperatura e luminosidade. Uma das culturas foi mantida em ausência de metais, como grupo controle. O crescimento e encistamento celular, em cada tratamento experimental, foram determinados através da contagem e diferenciação celular das amostras em câmaras tipo hemocitômetro, sob o microscópio óptico (Diaphot-TMD, Nikon Corp., Japan). Os dados de crescimento celular foram convertidos em porcentagem de sobrevivência em relação ao controle e utilizados para o cálculo dos valores de CE50, CENO e CEM, para cada metal. Estes parâmetros toxicológicos foram estimados pelo programa NOEC-V2 para testes de toxicidade, baseado no método de Spearman-Kärber, descrito em Hamilton *et al.* (1978).

Os efeitos de metais sobre a bioluminescência de *G. polyedra* foram determinados em fotômetro equipado com célula foto-multiplicadora (National Instr., Austin, TX). Neste experimento, altas concentrações de metais foram injetadas às culturas celulares (concentrações finais: 10 ppb Hg^{2+} ; 1 ppm Cd^{2+} ; 5 ppm Pb^{2+} ; e 0,25 ppm Cu^{2+}) e a emissão total de luz registrada imediatamente após a adição de metais, durante 1 min. Como controles foram injetados ambos, ácido acético 0,5% (máxima emissão de luz, por estimulação química) e meio f/2 (emissão basal de luz, por estimulação mecânica).

Os efeitos agudos e crônicos de metais sobre a bioluminescência espontânea de *G. polyedra* foram determinados em fotômetro especial (Broda *et al.* 1986). Culturas celulares, sob exposição crônica a metais, foram transferidas do ciclo LD 12:12 h para condições constantes de iluminação

(ciclo LL) e a bioluminescência espontânea (*flashes* e *glow*) monitorada por aproximadamente uma semana. No tratamento agudo, os metais foram adicionados às culturas após sua transferência ao ciclo LL (concentrações finais: 10 ppb Hg²⁺; 1 ppm Cd²⁺; 5 ppm Pb²⁺; e 0,25 ppm Cu²⁺) e a bioluminescência espontânea monitorada por 5 dias.

3.5. Preparo de extratos celulares e determinação protéica

Células de *G. polyedra* foram coletadas do meio de cultura por filtração a vácuo em filtro de papel Whatman 541 (Millipore) e suspensas em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,5. Os envoltórios celulares foram rompidos através de uma bomba de N₂ (Parr Instr., USA), sob pressão de 2.000 psi, durante 20 min, à 4 °C. Este método de rompimento celular é bastante eficiente e garante a preservação de atividade enzimática. O homogenado celular foi, então, centrifugado a 10.000 g, por 10 min, à 4 °C e o sobrenadante (extrato bruto celular), separado e utilizado para os ensaios bioquímicos. Nos experimentos com metais, a amostragem foi realizada sempre no mesmo horário (LD 03), evitando assim, possíveis interferências quanto a variação circadiana de atividade enzimática, como já demonstrado no caso da SOD (Asano *et al.* 1995). A concentração de proteínas do extrato bruto foi determinada pelo método de Bradford (1976), utilizando-se albumina bovina sérica (BSA) como proteína padrão para a confecção da curva de calibração.

3.6. Purificação de cloroplastos

Os cloroplastos foram isolados segundo a metodologia descrita por Desjardins & Morse (1993), com pequenas modificações. Cerca de 2 L de cultura, com densidade celular aproximada de 10⁴ células/mL, foram utilizados por amostra. As células coletadas foram suspensas em 10 mL de tampão de extração (0,2 M Tris pH 8, 50 mM EDTA, 50 mM sacarose, 15 mM β-

mercaptoetanol, 1 mM MgCl₂ e 1 mM MnCl₂) e rompidas em bomba de N₂ a 2.000 psi, durante 5 min, à temperatura ambiente. Após centrifugação a 12.000 g, por 10 min, o sobrenadante foi separado e acrescido de 0,5 volume de percoll 90 % (v/v), seguido de nova centrifugação a 30.000 g, por 10 min. A fração de cloroplastos (densidade de 1,05 g/mL), monitorada por absorvância de clorofila a 664 nm, foi isolada com uma pipeta Pasteur, acrescida de 1 volume de percoll 30 % (v/v) e centrifugada a 30.000 g, por 10 min. A fração de cloroplastos foi isolada e lavada com 10 volumes de tampão de extração. Os cloroplastos foram suspensos em 500 µL de tampão de extração e rompidos por choque térmico. Após nova centrifugação a 30.000 g, por 5 min, o sobrenadante foi utilizado como extrato para os ensaios bioquímicos.

3.7. Dosagem de Antioxidantes

3.7.1. Atividade enzimática

Superóxido dismutase: para a determinação da atividade da SOD foram utilizadas duas metodologias distintas. O primeiro método é o descrito por McCord & Fridovich (1968), onde a SOD pode ser detectada pela sua habilidade em inibir a redução de uma molécula indicadora, pelo O₂^{•-}. Assim, sob condições aeróbias, a enzima xantina oxidase atua sobre a hipoxantina, seu substrato, gerando O₂^{•-}. Este, por sua vez, reduz o Fe³⁺ pertencente à molécula do citocromo *c* (cit. *c*) a Fe²⁺. A SOD inibe esta redução, sem interferir na atividade catalítica da xantina oxidase. A redução do cit. *c* pode ser visualizada espectrofotometricamente a 550 nm, comprimento de onda relativo ao pico de absorvância do cit.*c*-Fe²⁺. Assim, o meio de reação foi composto por 55 µM hipoxantina, 22,5 mM cit. *c* e um volume variado de extrato celular e tampão fosfato 0,1 M, pH 7,8. A reação é iniciada pela adição de xantina oxidase (0,3 U/mL). O aumento da absorvância foi seguido durante 1 min, a 550 nm. Neste

ensaio, uma unidade de atividade é definida como a quantidade de enzima que promove 50 % de inibição da redução do cit. *c*, por min, à 25 °C e em pH 7,8.

A segunda metodologia consiste na visualização das isoformas de SOD, em gel de atividade. Realizou-se uma eletroforese não desnaturante em gel de poliacrilamida 10 % (*PAGE*), corado conforme o método proposto por Beauchamp & Fridovich (1971). Este método está baseado no princípio da produção de $O_2^{\bullet-}$, através da redução fotoquímica de flavinas. O $O_2^{\bullet-}$ assim gerado, reduz o composto *nitroblue tetrazolium* (NBT), de coloração amarela, a *nitroblue formazan* (NBF), de coloração azulada. Devido à sua atividade catalítica, a SOD "seqüestra" o $O_2^{\bullet-}$, impedindo a redução do NBT a NBF. Desta forma, nas regiões do gel onde há presença de SOD formam-se bandas acromáticas, contrastando com as regiões de ausência de SOD, as quais permanecem uniformemente azuis. Cerca de 20 µg de proteínas totais foram aplicados por amostra no gel e após a corrida eletroforética (2 h a 80 V), este foi embebido em 2,45 mM NBT por 20 min, seguido de incubação em 28 µM riboflavina / 28 mM EDTA por 15 min. Após esta etapa, o gel foi exposto à luz branca, até se obter o máximo de contraste entre as bandas acromáticas e o fundo azul.

Este método permite também a discriminação das isoformas de SOD, com base em sua sensibilidade a inibidores específicos (Fridovich, 1974). A CuZnSOD é sensível ao tratamento com cianeto (CN^-) e H_2O_2 , a FeSOD é sensível somente ao tratamento com H_2O_2 , enquanto a MnSOD é resistente a ambos os tratamentos. Assim, a discriminação das isoformas presentes em *G. polyedra* foi realizada pela incubação prévia do gel em solução 10 mM KCN durante 30 min, e 0,5 mM H_2O_2 durante 60 min, antes de ser corado por atividade de SOD.

Ascorbato peroxidase: a atividade da Apx foi determinada pelo método descrito por Nakano & Asada (1981), o qual detecta a oxidação do ascorbato, seguindo

o decréscimo da sua absorvância a 290 nm ($\epsilon = 2,8 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). O meio de reação foi composto por 0,1 mM ascorbato, 0,1 mM EDTA, e 10 mM H_2O_2 , em tampão fosfato 50 mM, pH 7,0. A reação foi iniciada pela adição de extrato de cloroplastos e o decréscimo da absorvância a 290 nm, monitorado por 2 min. Os valores de absorvância foram corrigidos, descontando-se a oxidação não enzimática do ascorbato pelo H_2O_2 . Uma unidade de atividade representa a quantidade de enzima que oxida um μmol de ascorbato, por min, à 25 °C.

3.7.2. Extração e análise de pigmentos

Pigmentos carotenóides (β -caroteno e peridinina) e clorofila *a* foram extraídos a partir de 300 mL de culturas densas de *G. polyedra* (10^4 células/mL) e analisados por *HPLC* de fase reversa. Para as determinações de β -caroteno, uma etapa de saponificação foi realizada pela adição de NaOH 5% (em metanol). Esta suspensão foi mantida no escuro por 1 h, à temperatura ambiente. A extração de carotenóides foi obtida pela adição de 1 volume de clorofórmio 100 %. Após 15 min no escuro, os carotenóides foram separados e coletados através de lavagem das amostras com solução fisiológica (NaCl 0,9 %), em funil de separação. As amostras foram liofilizadas e armazenadas à - 20 °C. A fase móvel isocrática foi composta por 5 % de diclorometano, 5 % de n-hexano, 45 % de acetonitrila e 45 % de metanol e a análise realizada segundo o método de Di Mascio *et al.* (1995).

Peridinina e clorofila *a* foram extraídos com metanol e analisados de acordo com Pinto *et al.* (2000). Neste método, o pigmento exógeno bixina é utilizado como padrão interno para as análises quantitativas. A fase móvel foi composta por um gradiente linear de metanol, acetato de etila e água. Os pigmentos foram identificados pela comparação de seus tempos de retenção e espectros de absorção com os de padrões autênticos. Como padrões, foram

utilizados β -caroteno e clorofila *a* comerciais e peridinina isolada e caracterizada de *G. polyedra* (Pinto *et al.* 2000).

As análises cromatográficas foram realizadas com solventes de grau analítico apropriado, em um sistema de *HPLC* (Shimadzu), equipado com detector de foto-diodo (SPD-M10AV). Para a determinação de β -caroteno, utilizou-se uma coluna cromatográfica LC-18 (*Supelcosil*; 5 μ m; 150 x 4.6 mm; Supelco). As determinações de peridinina e clorofila *a* foram realizadas com uma coluna cromatográfica C-18 (*Hibar Lichrosorb RP-18*; 5 μ m; 250 x 4 mm; Merck). A quantidade de pigmentos extraídos foi calculada em concentração micromolar e os níveis de β -caroteno e peridinina expressos pela razão carotenóide/clorofila *a*.

3.8. Determinação de lesões oxidativas

3.8.1. Peroxidação lipídica

Os danos oxidativos em lipídeos de cloroplastos isolados foram avaliados pela detecção espectrofotométrica de dienos conjugados, formados durante o início do processo de peroxidação (Rice-Evans *et al.* 1991). Uma extração prévia com acetona 90 % foi realizada para eliminar a clorofila e minimizar sua interferência no ensaio. Após centrifugação a 1.000 g por 5 min, os lipídeos totais foram extraídos com clorofórmio/metanol (2:1 v/v). Os extratos foram centrifugados a 2.600 g por 10 min e o sobrenadante, recuperado com adição de 3 volumes de clorofórmio/metanol (2:1 v/v) e um volume de água destilada. Após nova centrifugação, a fase aquosa foi evaporada sob atmosfera de N₂. Os lipídeos foram suspensos em ciclo hexano e os dienos conjugados medidos a 233 nm. Os dados estão expressos em unidades de absorbância por mg de proteínas cloroplásticas.

3.8.2. Oxidação protéica

Os danos oxidativos sobre proteínas foram estimados pelo conteúdo de carbonilas protéicas das amostras (Rice-Evans *et al.* 1991). Extratos celulares foram incubados com 10 mM 2,4-dinitro fenil hidrazina por 1 h, à temperatura ambiente. As proteínas foram precipitadas com ácido tricloro acético 20 % (w/v), lavadas 2 vezes com etanol/acetato de etila (1:1) e dissolvidas em solução 6 M guanidina. O conteúdo de carbonilas foi avaliado por medidas de absorvância a 370 nm (ϵ : 22.000 M⁻¹.cm⁻¹). Os valores encontram-se expressos em μ mol de carbonilas por mg de proteínas cloroplásticas.

3.9. Índices de estresse oxidativo

3.9.1. Consumo de oxigênio

Aumentos do consumo de O₂ estão freqüentemente associados à formação de ERO, como O₂^{•-}, H₂O₂ e radicais peroxil, durante a redução do O₂ por componentes de cadeias transportadoras de elétrons (Halliwell & Gutteridge, 1999). Concentrações de O₂ dissolvido em culturas de *G. polyedra* foram medidas em um oxígrafo (YSI 5300, Yellow Spring Instr. Co., USA), segundo o método descrito por Robinson & Cooper (1970). Após estabilização do eletrodo, a concentração de O₂ nas culturas controles foi tomada como 100%. Metais foram adicionados ao meio nas concentrações correspondentes aos tratamentos crônico ou agudo e o consumo de O₂ monitorado durante 1 h, sob agitação constante, à 25 °C.

3.9.2. Poder redutor

Outra estimativa de estresse oxidativo é o conteúdo de GSH relativo à sua forma oxidada GSSG (Sies, 1999). A determinação de tióis totais foi realizada de acordo com o método descrito por Murphy & Kehrer (1989).

Células foram homogeneizadas em 0,5 M ácido perclórico contendo 5 mM EDTA e 0,06% biperidina. Após centrifugação a 10.000 g por 10 min, alíquotas do sobrenadante (tióis solúveis) foram misturados com 2 mM DTNB, em 50 mM KH₂PO₄/5 mM EDTA. Após 30 min de incubação à temperatura ambiente, a absorbância foi medida a 412 nm, relativa à formação do produto TNB.

A glutationa total (GSH+2GSSG) foi medida em um meio de reação contendo alíquotas das amostras e 0,6 mM DTNB, 0,2 mM NADPH e 0,1 U/mL de GR, em tampão 50 mM KH₂PO₄/5 mM EDTA. O aumento da absorbância a 412 nm foi monitorado durante 2 min. Os dados foram calculados em nmol tióis (equivalentes de GSH) por mg proteínas totais. O poder redutor é estimado pela relação GSH/(GSH+2GSSG).

3.10. Determinação dos níveis protéicos de SOD

Os níveis protéicos de SOD foram determinados por imunodeteccões em *Western blot* (Towbin *et al.* 1979), utilizando-se anticorpos policlonais contra FeSOD e MnSOD bacteriana (*E. coli*) e CuZnSOD de eritrócitos bovinos. Estes anticorpos reagem com proteínas presentes no extrato celular de *G. polyedra*, marcando bandas protéicas específicas de 20 kDa (CuZnSOD), 24 kDa (MnSOD) e 32 kDa (FeSOD) (Asano, 1998).

Realizou-se uma eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida 10%, contendo 1 % de SDS (*SDS-PAGE*) (Laemmli, 1970). Cerca de 20 µg de proteínas totais de cada amostra foram aplicadas no gel. Após a separação eletroforética a 80 V, por 1,5 h, as proteínas foram então transferidas para uma membrana de nitrocelulose, em tampão composto por 24 mM Tris, 0,19 M glicina e 20 % de metanol, por 2 h, à 250 mA e visualizadas por coloração com 0,2 % *Ponceau Red*. A membrana foi bloqueada em solução 3 % BSA, durante 1 h, à 45 °C. Após o bloqueio, a membrana foi lavada com tampão fosfato

salino 0,1 M (PBS), por 30 min e incubada com anticorpo primário diluído em 0,3 % BSA-PBS (1:100), durante aproximadamente 24 h, à 4 °C, sob agitação. A membrana foi lavada 3 vezes em 0,1 M PBS, por 30 min e incubada com 1 µCi de [γ ¹²⁵I]-proteína A, durante 6 h, à 40 °C. Após sucessivas lavagens com 0,1 M PBS, por 10 min, a membrana foi exposta durante 72 h, à -70 °C, em filme fotossensível.

3.11. Estratégia de clonagem da isoforma FeSOD

3.11.1. Elaboração de *primers* degenerados

A clonagem do gene codificador de FeSOD foi baseada na técnica de *RT-PCR* (*Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction*). Este método é bastante sensível e possibilita a obtenção de seqüências completas do *cDNA* alvo de forma rápida e eficiente, tendo sido aplicado com sucesso na clonagem de outros genes em dinoflagelados (Le, *et al.* 1997, Li & Hastings, 1998). Para isto, um estudo prévio de homologia da FeSOD foi realizado através de pesquisa no banco de dados do *GenBank* (NCBI-National Center for Biotechnology Information). Análises de similaridade estrutural e identificação de domínios conservados foram realizadas pelo alinhamento múltiplo de FeSOD de diferentes organismos, pelos programas *Clustal W* e *PileUp*. Os domínios mais conservados e constituídos por aminoácidos codificados por no máximo 3 *codons* foram selecionados e transformados em seqüência de nucleotídeos, seguindo o *codon usage* para *G. polyedra*. Tais seqüências foram então utilizadas para a elaboração de *primers* degenerados, tendo como critérios alta temperatura de fusão, cerca de 50 % de pirimidinas e 50 % purinas e baixa freqüência de auto-pareamentos.

3.11.2. Extração de *RNA* total e purificação de *RNA* mensageiro (*mRNA*)

Células foram coletadas por filtração a vácuo, a partir de 1,5 L de cultura (10^4 células/mL) e rompidas por maceração em nitrogênio líquido. O homogenado foi transferido para um tubo de vidro (corex), acrescido de 10 mL de tampão GIT (4 M isotiocianato de guanidina, 25 mM citrato de sódio pH 7,0, 0,5% sarcosil e 0,1 M β -mercaptoetanol), 1 mL de solução 2 M NaCO_2CH_3 pH 4,0, 10 mL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e mantido à 4°C, por 15 min. Após centrifugação a 10.000 g, por 20 min, à 4 °C, a fase aquosa foi recuperada, acrescida de 1 volume de isopropanol e incubada à -20 °C, por 2 h. Após nova centrifugação a 10.000 g, por 30 min, à 4 °C, o precipitado foi lavado em 3 mL de tampão GIT e 3 mL de isopropanol. O *RNA* foi precipitado em solução 2 M LiCl, à 4 °C, durante cerca de 16 h. O *RNA* foi recuperado por centrifugação, lavado em 2 M LiCl e novamente precipitado com 1 volume de isopropanol e 0,1 volume de 2M NaCO_2CH_3 , pH 4,0. Após centrifugação, o *RNA* foi lavado com 1 mL de etanol 70 %, seco à temperatura ambiente por 20 min e dissolvido em água tratada com 0,1 % DEPC. A quantificação de ácidos nucléicos foi realizada por espectrofotometria a 260 nm.

O *mRNA* (*RNA* poli-A) foi purificado do *RNA* total, em coluna de oligo-dT celulose, suspensa em tampão (0,1 g/mL) composto por 0,5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7,5, e 0,05 % azida. A amostra de *RNA* total (1 a 2 mg) foi desnaturada por 5 min à 65 °C, incubada em gelo e aplicada à coluna previamente lavada com tampão A (0,5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7,5). A amostra foi lavada com 5 mL de tampão A, seguida de nova lavagem em tampão B (0,1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7,5). O *mRNA* foi eluído da coluna com 2 mL de água-DEPC, previamente aquecida à 65 °C e purificado por precipitação com 2 volumes de etanol e 0,1 volume de 3 M NaCO_2CH_3 , pH 5,2. Após centrifugação a 2.500 g, por 5 min, o *mRNA* foi suspenso em 20 μL de

água-DEPC e a concentração da amostra determinada por absorvância a 260 nm.

3.11.3. Amplificação de segmentos de *cDNA* por *PCR*:

Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) é uma técnica derivada do *RT-PCR*, onde a amplificação de segmentos de *DNA* ocorre a partir de *mRNA* molde, utilizando-se *primers* específicos para o gene de interesse e *primers* complementares a seqüências específicas nas extremidades 3' ou 5' do *mRNA*. No 3' *RACE*, o *primer* utilizado é um oligo-dT que reconhece a cauda poliadenilada presente na extremidade 3' do *mRNA* eucariótico. No 5' *RACE*, um oligonucleotídeo específico, rico em guanina e inosina, tem seqüência complementar a outro oligonucleotídeo artificialmente inserido na extremidade 5' do *mRNA*. As amplificações por *RACE* foram realizadas com *mRNA* de células de *G. polyedra* tratadas com Cd^{2+} (1 ppm, 4 h) e *primers* degenerados específicos para FeSOD (tabela 2).

A síntese de *cDNA* foi realizada em reação de amplificação contendo: tampão (20 mM Tris-HCl pH 8,4, 50 mM KCl, 10 mM DTT), 2,5 mM MgCl_2 , 2 mM dNTPs, 500 nM *primer*, 100 ng *RNA* poli-A de *G. polyedra* e 200 U de transcriptase reversa (*Superscript II*), em volume total de 50 μL . O ciclo térmico utilizado na síntese de *cDNA* foi: 70 °C, 10' / 50 °C, 50' / 70 °C, 15'.

Após a síntese, o *RNA* molde foi digerido com *RNAse H*, por 20 min, à 37°C. As amplificações subsequentes foram realizadas por *PCR* convencional, tendo como *template* o *cDNA* sintetizado por *RACE*. Todas as amplificações por *PCR* foram realizadas em um termociclador automático (*GeneAmp PCR system 2400*, PE Biosystems, USA).

As reações de *PCR* continham os seguintes componentes e respectivas concentrações finais: tampão (10 mM tris-HCl pH 9, 50 mM KCl, 0,1 % Triton X-100), 2 mM MgCl_2 , 0,2 mM dNTPs, 2,5 U de Taq *DNA* polimerase, 0,2 μM

de cada *primer* e cerca de 50 - 250 ng de *DNA template*, em volume final de 50 μ L. Como *DNA template* foram utilizadas alíquotas (1:10 a 1:20 do volume total) da reação de síntese de *cDNA* por *RACE*. O ciclo básico de amplificação utilizado foi o seguinte:

Ciclo I (utilizando-se *primers* degenerados):

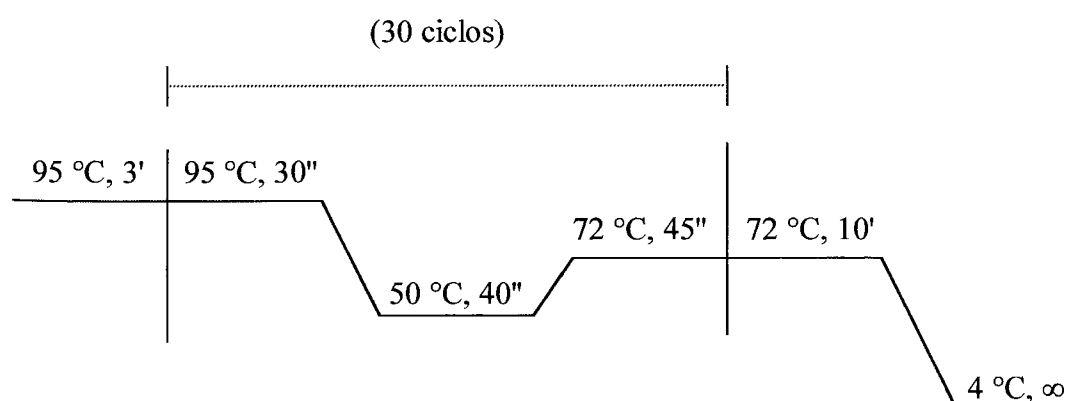


Tabela 2. *Primers* degenerados utilizados nas amplificações por *RACE/PCR*

<i>Primer</i>	(5' → 3')
FSD1	CAYTAYGGHAARCAYCAY
FSD1r	RTGRTGYTTDCCRTARTG
FSD2	GCVCARGTBTGGAAAYCAYAC
FSD2r	GTRTGRTTCCAVACYTGBGC
FSD3	GAYGTBTGGGARCA YGC
FSD3r	GCRTGYTCCCAVACRTC

* **Y**= C ou T; **H**= A, C ou T; **R**= A ou G; **D**= A, G ou T;
V= A, C, ou G; **B**= C, G ou T).

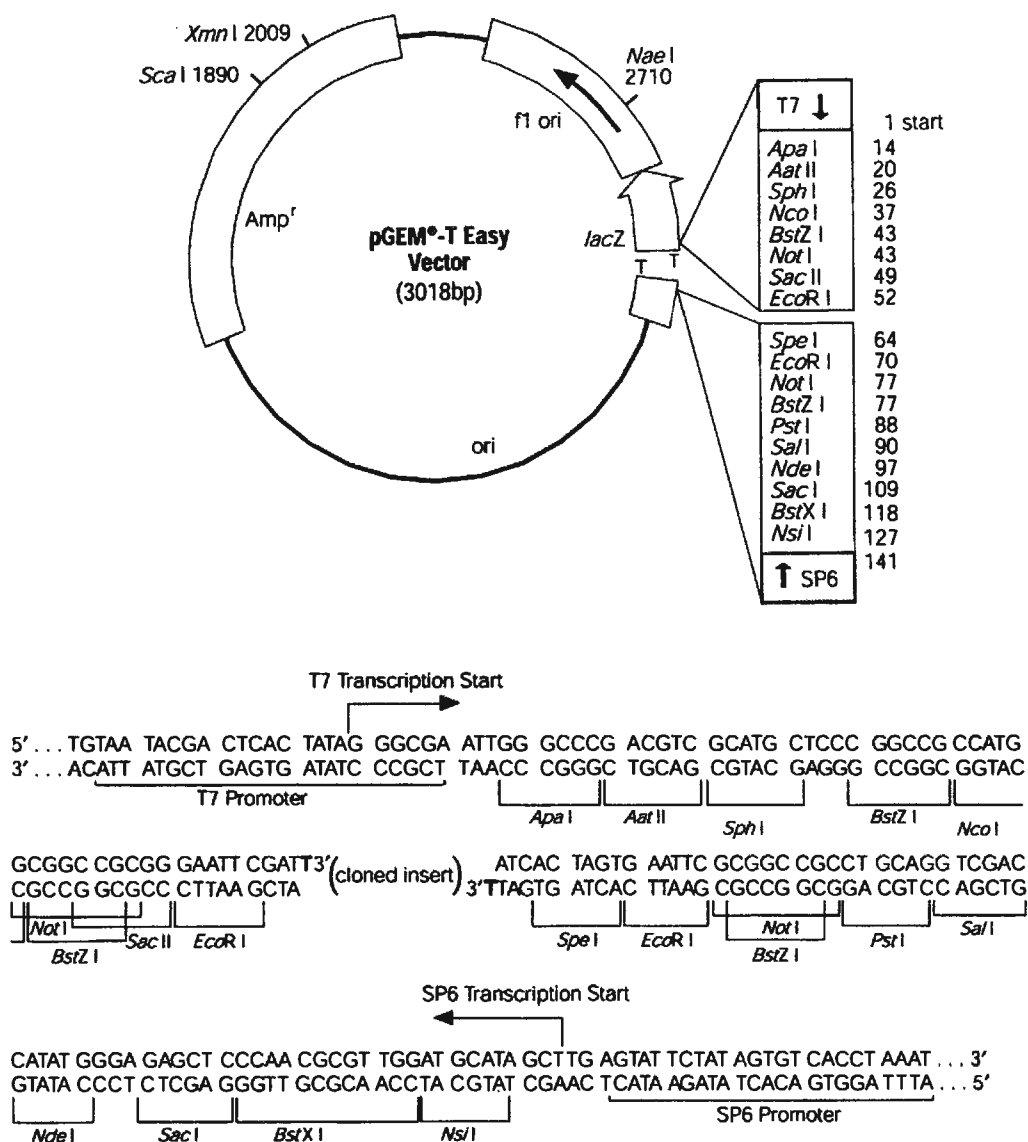
3.11.4. Subclonagem de produtos de *PCR*

Os produtos das ampliações por *PCR* foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5 %, contendo brometo de etídeo (10 mg/mL) e visualizadas sob luz UV. As bandas de interesse foram isoladas de acordo com a pureza dos produtos das reações. Em caso de ampliações de bandas únicas, o *DNA* foi purificado diretamente da reação de *PCR*, por precipitação com 2 volumes de etanol, para eliminar excesso de sais e nucleotídeos não incorporados. Em caso de alta frequência de ampliações secundárias, os fragmentos de interesse foram submetidos à eletroforese, recuperados dos géis de agarose e purificados por cromatografia de exclusão molecular. Neste caso, o fragmento foi cortado do gel e transferido para uma microcoluna cromatográfica. Esta coluna foi previamente preenchida com 800 µL de resina sephadex G10 (ativada com água destilada, 1:1 v/v) e empacotada por centrifugação a 13.000 g, por 2 min. A eluição do *DNA* foi obtida por centrifugação a 13.000 g, por 10 min. Ao eluído, adicionaram-se 0,1 volume de 3 M NaCO₂CH₃, pH 5,2 e 1 volume de isopropanol gelado. Após nova centrifugação a 13.000 g, por 15 min, o precipitado foi lavado com etanol absoluto e suspenso em 10 µL de água destilada. A concentração *DNA* foi determinada por espectrofotometria a 260 nm.

Os segmentos de *DNA* amplificados por *PCR* foram subclonados no vetor plasmideal *pGEM-T* (Promega), apresentado no esquema 6. Cerca de 10 ng de *DNA* foram ligados a 30 ng do vetor, em presença da enzima *DNA* ligase (4 U) por aproximadamente 12 h, à 14 °C. Desta reação de ligação, 2 µL foram diretamente adicionados a 200 µL de células competentes de *E. coli*, linhagem DH5α, em presença de 20 mM β-mercaptoetanol. Após 30 min em gelo, as bactérias foram transformadas por choque térmico (40 s à 42 °C, 2 min à 0 °C). Adicionaram-se 250 µL de meio LB líquido e as bactérias foram cultivadas à 37 °C, por 45 min. Cerca de 50 a 100 µL desta transformação foram plaqueados

em meio sólido LB/amp (100mg/ml), contendo Xgal (35 μ L de solução 50 mg/mL) e IPTG (50 μ l de solução 100 mM).

Bactérias transformadas com plasmídeos contendo os insertos formam colônias brancas (não utilizam galactose pois o gene para β -galactosidase não pode ser transcrito), enquanto bactérias transformadas com plasmídeos sem os insertos formam colônias azuis (utilizam galactose pois possuem o gene para β -galactosidase intacto). Bactérias não transformadas não contêm gene de resistência à ampicilina e, portanto, não crescem na presença do antibiótico. Assim, colônias brancas foram selecionadas e cultivadas em meio LB/amp líquido, à 37 °C, sob agitação constante (250 rpm), por 12 h ($OD_{600} \sim 0,8$).

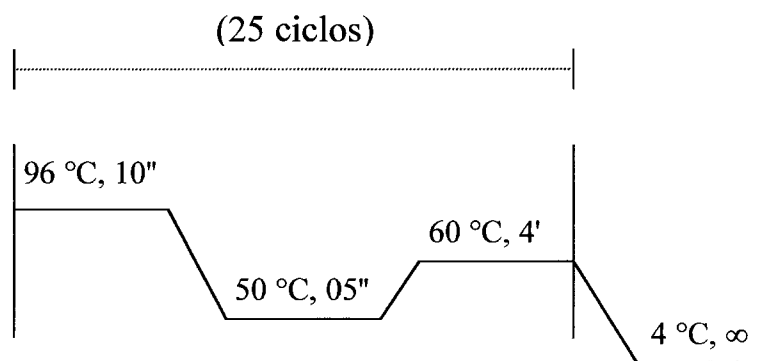


Esquema 6. Mapa do vetor de clonagem *pGEM-T*. A seqüência do sítio de clonagem e o local de inserção do produto de *PCR* são mostrados. O fragmento inserido é flanqueado por sítios de restrição para *EcoRI*, em ambos os lados. As setas indicam o início da transcrição para as *RNA* polimerases T7 e Sp6. (Extraído do manual *pGEM-T vector System*, Promega).

Em seguida, uma preparação de plasmídeo em pequena escala foi realizada a partir de 1,5 mL de cultura de bactérias transformadas. As bactérias foram coletadas por centrifugação a 13.000 g, por 2 min e suspensas em 700 µL de tampão *stet* (8 % sacarose, 5 % triton x-100, 50 mM Tris-HCl pH:8,0, 50 mM EDTA), sob leve agitação. A ruptura celular ocorreu pela adição de 50 µL de solução lisozima (15 mg/mL), seguida de incubação à 95 °C, por 90 s. Após centrifugação por 10 min a 13.000 g, o *DNA* foi extraído do sobrenadante com 1 volume de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e precipitado com 0,1 volume de 3 M NaOAc pH 5,2 e 1 volume de isopropanol. Após 30 min à -20 °C, centrifugou-se a amostra por 30 min a 13.000 g. O precipitado (plasmídeos) foi lavado em etanol 70 % e seco à temperatura ambiente. Os plasmídeos foram dissolvidos em 100 µL de tampão TE (10 mM tris, 1 mM EDTA, pH: 8,0), juntamente com 5 µL de *RNase* (10 mg/mL). Os plasmídeos foram digeridos com a enzima de restrição EcoRI (2U/µg de *DNA*), para liberação dos segmentos clonados.

3.11.5. Identificação e análise molecular dos clones de *cDNA*

As seqüências de bases dos produtos de *PCR* subclonados foram determinadas em um sequenciador automático (*ABI Prism Genetic Analyser*, PE Biosystems, USA) utilizando-se o kit de sequenciamento *ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* (PE Biosystems, USA). Brevemente, cerca de 200 a 500 ng de plasmídeos, contendo os segmentos de interesse, foram adicionados a 1,5 pmoles de um dos *primers* universais T7 ou SP6 (as duas fitas de *DNA* foram sequenciadas), 4 µL do reagente *Terminator Ready Reaction Mix* (contendo desoxinucleosídeos trifosfatos, uma polimerase termoestável e d-Rodamina, em tampão apropriado) e água totalizando volume final de 10 µL. Realizou-se uma amplificação por *PCR* com o seguinte ciclo:



Os produtos deste *PCR* foram purificados por precipitação com 0,1 volume de 3 M NaCO_2CH_3 pH 5,2 e 2,5 volumes de etanol 95 %. Após centrifugação a 12.000 *g* por 20 min, o precipitado foi lavado em etanol 70 % e seco a vácuo (*Speed Vac* SC110, Savant Inc., USA), por 10 min. Ao *DNA*, 20 μL do reagente *Template Supression Reagent* foram adicionados. A mistura foi aquecida à 95°C, por 5 min, resfriada à 4 °C, por 2 min e transferida a um microtubo de sequenciamento apropriado (PE/ABI 0,5 mL / 0,5 mL *tube septa*). A reação de sequenciamento foi realizada durante 120 min, tempo suficiente para sequenciar fragmentos de *DNA* de até 500 pb.

O processamento e a análise das seqüências gênicas foram realizados através do software *GCG (Genetics Computer Group) Wisconsin package 9.1*, amplamente utilizado para estudos moleculares. Inicialmente, as novas seqüências gênicas geradas foram identificadas por buscas de similaridade no banco de dados do *GenBank*, através do programa *BlastX*. Em seguida, análises estruturais foram realizadas pelo alinhamento protéico múltiplo, utilizando o programa *PileUp*. Os estudos de filogenia molecular foram baseados nas informações obtidas neste alinhamento múltiplo, complementados por análises de matrizes de distância evolutiva, descritas por Kimura (1980), através do programa *PAUP version 3.1.1*. A partir destas análises, uma árvore filogenética foi construída pelo programa *PHYLP (Phylogeny Inference package 3.572*, Felsenstein, Washington Univ., 1995), utilizando-se o método algorítmico de *Neighbor-joining* (Saitou & Nei, 1987).

3.12. Análise de expressão da FeSOD

Padrões de expressão gênica foram avaliados pela extração de *RNA* de *G. polyedra* e análise por duas metodologias distintas:

3.12.1. Híbridações em *Northern Blot*

A análise do *RNA* (1 - 10 µg) foi realizada por eletroforese em gel de agarose 1,2 % contendo formaldeído (Sambrook *et al.* 1989). As amostras de *RNA* foram diluídas em uma solução composta de 50 % formamida, 17,5 % formaldeído e 10 % de tampão 10 x MOPS (0,18 M MOPS, 40 mM NaCO₂CH₃, 7,6 % v/v 1 N NaOH, 2 % v/v 0,5 M EDTA pH 7,5), aquecidas à 65 °C, por 15 min e resfriadas em gelo. Uma pré-corrída de 10 min a 40 V foi realizada e antes de serem aplicadas no gel, as amostras foram acrescidas de 10% v/v tampão de amostra (1 mM EDTA, 0,1 % DEPC, 0,25 % azul de bromofenol, 0,25 % xileno cianol, 50 % glicerol) e 1 % v/v brometo de etídeo (10 mg/mL). A corrida foi realizada a 5 V/cm de gel, por 3 h, em tampão 1 x MOPS. O *RNA* foi visualizado sob luz UV e documentado com o aparelho *Image Master VDS* (Pharmacia Biotech, USA).

O gel foi embebido em solução 0,05 N NaOH, por 20 min e em solução 10 x SSC (1,5 M NaCl, 0,15 M citrato de sódio), por 40 min. O *RNA* foi transferido por capilaridade à uma membrana de *nylon* (Hybond-N+, Amersham), por 12 h em solução 10 x SSC. A membrana foi lavada em solução 6 x SSC, por 5 min e o *RNA* fixado à membrana por exposição à luz UV, durante 3 min.

Realizou-se uma pré-hibridação da membrana em solução de hibridação (0,25 M NaCl, 0,25 M Na₂HPO₄ pH 7,2, 1 mM EDTA pH 8, e 7 % SDS), em presença de 50 % formamida, por 1 h, à 40 °C. A membrana foi hibridada com sondas marcadas radioativamente com [α ³²P]-dCTP (atividade específica das sondas em torno de 10⁸ cpm/µg, concentração em torno de 10⁵ - 10⁶ cpm/mL de

solução de hibridação), por cerca de 16 h, à 40 °C. A lavagem da membrana foi feita nas seguintes soluções: 2 x SSC (2 x 20 min, à temperatura ambiente), tampão PSE (0,25 M Na₂HPO₄ pH 7,2, 1 mM EDTA pH 8, e 2 % SDS) (20 min, à 50 °C). Após as lavagens, a membrana foi exposta em filme fotossensível, à -70 °C, por até 5 dias. Como sondas moleculares, foram utilizados os segmentos de *cDNA* de FeSOD, isolados neste trabalho e de LBP de *G. polyedra*. Por ser expressa constitutivamente, a LBP foi utilizada como controle da concentração de *RNA* aplicada em ambos, *Northern blot* e *RT-PCR*.

3.12.2. Quantificação por *RT-PCR*

Como a quantidade de moléculas de *DNA* amplificadas por *PCR* está diretamente relacionada ao número inicial de moléculas-alvo (*template*), a quantificação de transcritos de *mRNA* por *RT-PCR* é uma forma rápida e extremamente sensível de se avaliar a expressão gênica, em diferentes condições experimentais, podendo detectar transcritos presentes em baixo número de cópias.

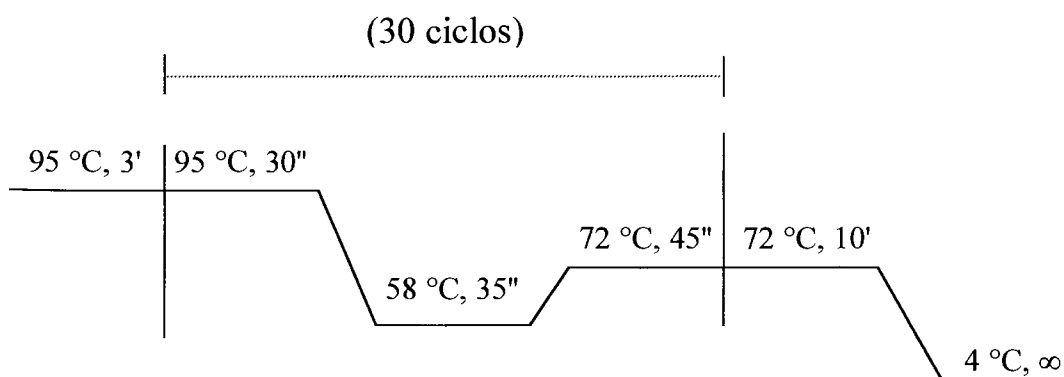
As ampliações foram realizadas a partir de *mRNA*, extraídos durante os diferentes tratamentos experimentais e *primers* específicos para os genes codificadores de FeSOD e LBP (controle) de *G. polyedra* (tabela 3). A síntese de *cDNA* foi realizada em reação de amplificação contendo: tampão (10 mM tris-HCl pH 9,0, 50 mM KCl, 0,1 % Triton X-100), 2 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, 0,2 µM de cada *primer*, 250 ng *RNA* poli-A de *G. polyedra* e 200 U de transcriptase reversa (*Superscript II*), em volume total de 50 µL. O ciclo térmico utilizado na síntese de *cDNA* foi: 70 °C, 10' / 50 °C, 50' / 70 °C, 15'. Após a síntese, o *RNA* molde foi digerido com *RNAse H*, por 20 min, à 37°C. Uma nova amplificação por *PCR* foi realizada, contendo 2 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, 2,5 U de Taq *DNA* polimerase, 0,2 µM de cada *primer* e como *template*, 5 µL da reação de síntese de *cDNA*, em volume final de 50 µL.

Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5 %, contendo brometo de etídeo (10 mg/mL) e visualizadas sob luz UV. A quantificação foi estimada pela análise comparativa dos rendimentos de amplificação, refletidos nas intensidades das bandas amplificadas, por densitometria automatizada (*Image Master VDS 2.0*, Pharmacia Biotech, USA).

Tabela 3. *Primers* utilizados nas ampliações por RT-PCR

(5' → 3')	FeSOD	LBP
Seqüência <i>sense</i>	(FS1) CATTACGGTAAACATCACAAACG	(LBPf) TGTCTGACAATGGCGTCGCG
Seqüência <i>antisense</i>	(FS2r) CGTTGTGATGTTTACCGTAATG	(LBPr) CGTTGGTGGAAGCTCGAGCTGC
Tamanho do segmento amplificado	170 pb	1000 pb

Ciclo II (utilizando-se *primers* não degenerados)



3.13. Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada pela técnica da Análise de Variância para Experimentos Inteiramente Casualizados (ANOVA), complementada pelo Teste de Comparações Múltiplas *t* de *Student*. No presente trabalho, adotamos o nível de 5 % de significância ($p < 0.05$), para todas as conclusões abordadas.

4. RESULTADOS

4.1. Toxicidade de metais poluentes a *G. polyedra*

4.1.1. Sobrevivência celular e parâmetros toxicológicos

Os resultados dos bioensaios demonstram que *G. polyedra* é bastante sensível à exposição aguda aos metais avaliados. O crescimento celular, refletido em termos de sobrevivência em relação ao controle, foi significativamente inibido em função do aumento da concentração de metais no meio (fig. 1). Os decréscimos de sobrevivência celular ocorreram à concentrações de metais relativamente baixas, indicando uma alta toxicidade destes elementos poluentes ao dinoflagelado *G. polyedra*. Os valores dos parâmetros toxicológicos, estimados com base nestes dados de sobrevivência, encontram-se descritos na tabela 4. De acordo com os respectivos valores de CE50, a escala de toxicidade encontrada para *G. polyedra* foi $Hg^{2+} > Cu^{2+} > Cd^{2+} > Pb^{2+}$.

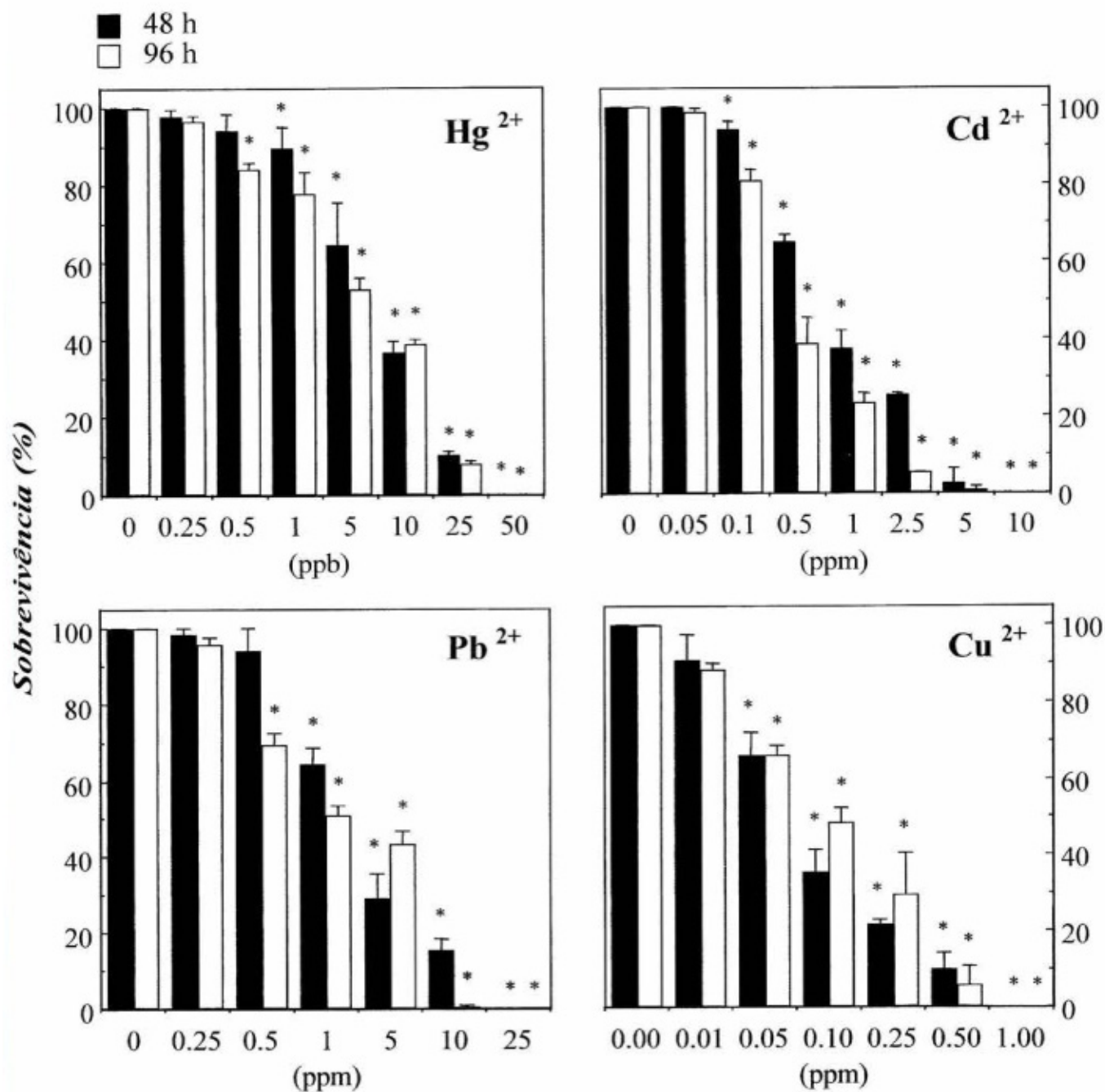


Fig.1. Sobrevivência celular relativa, após 48 e 96 h de exposição, a concentrações crescentes de metais. Altas concentrações dos quatro metais poluentes aumentaram a mortalidade celular em ambos os períodos analisados. Os dados representam a média de três experimentos independentes, mais o desvio padrão. *Significativamente diferente do grupo controle (p < 0,05).

Tabela 4 . Toxicidade de metais poluentes ao dinoflagelado *G. polyedra*

Metal	* Parâmetros toxicológicos					
	CENO		CE50		CEM	
	48 h	96 h	48 h	96 h	48 h	96 h
Hg ²⁺	5×10^{-4}	$2,5 \times 10^{-4}$	$5,8 \times 10^{-3}$	4×10^{-3}	5×10^{-2}	5×10^{-2}
Cu ²⁺	0,01	0,01	0,10	0,12	1,00	1,00
Cd ²⁺	0,05	0,05	0,80	0,30	10,00	10,00
Pb ²⁺	0,50	0,25	2,50	1,75	25,00	25,00

* Concentrações de metais em ppm (mg.L^{-1}); 1 ppm de Hg = $3,68 \times 10^{-3}$ μM ; 1 ppm de Cu = 6,26 μM ; 1 ppm de Cd = 4,79 μM ; 1 ppm de Pb = 3,59 μM .

4.1.2. Encistamento e bioluminescência

Encistamento: Todos os metais estimularam o encistamento de *G. polyedra* de forma dose-dependente, sendo Cu²⁺ o mais efetivo (fig. 2). Nos tratamentos com este metal, o encistamento ocorreu imediatamente, sendo completo 4 h após sua adição no meio (fig. 3). Quando células mantidas sob exposição aguda a metais foram transferidas a um meio de cultura novo, livre de metais tóxicos, a porcentagem de cistos na população permaneceu alta, com exceção das células tratadas com Pb²⁺ e Cu²⁺, as quais excistaram parcialmente ou por completo, após 96 h de cultivo, respectivamente (fig. 4). A queda da proporção de cistos assexuais na população indica uma habilidade de recuperação após o estresse metálico agudo, sugerindo efeitos algistáticos para Pb²⁺ e Cu²⁺. Nestas condições, o encistamento de *G. polyedra* parece ser uma importante estratégia para tolerar os efeitos tóxicos de metais poluentes.

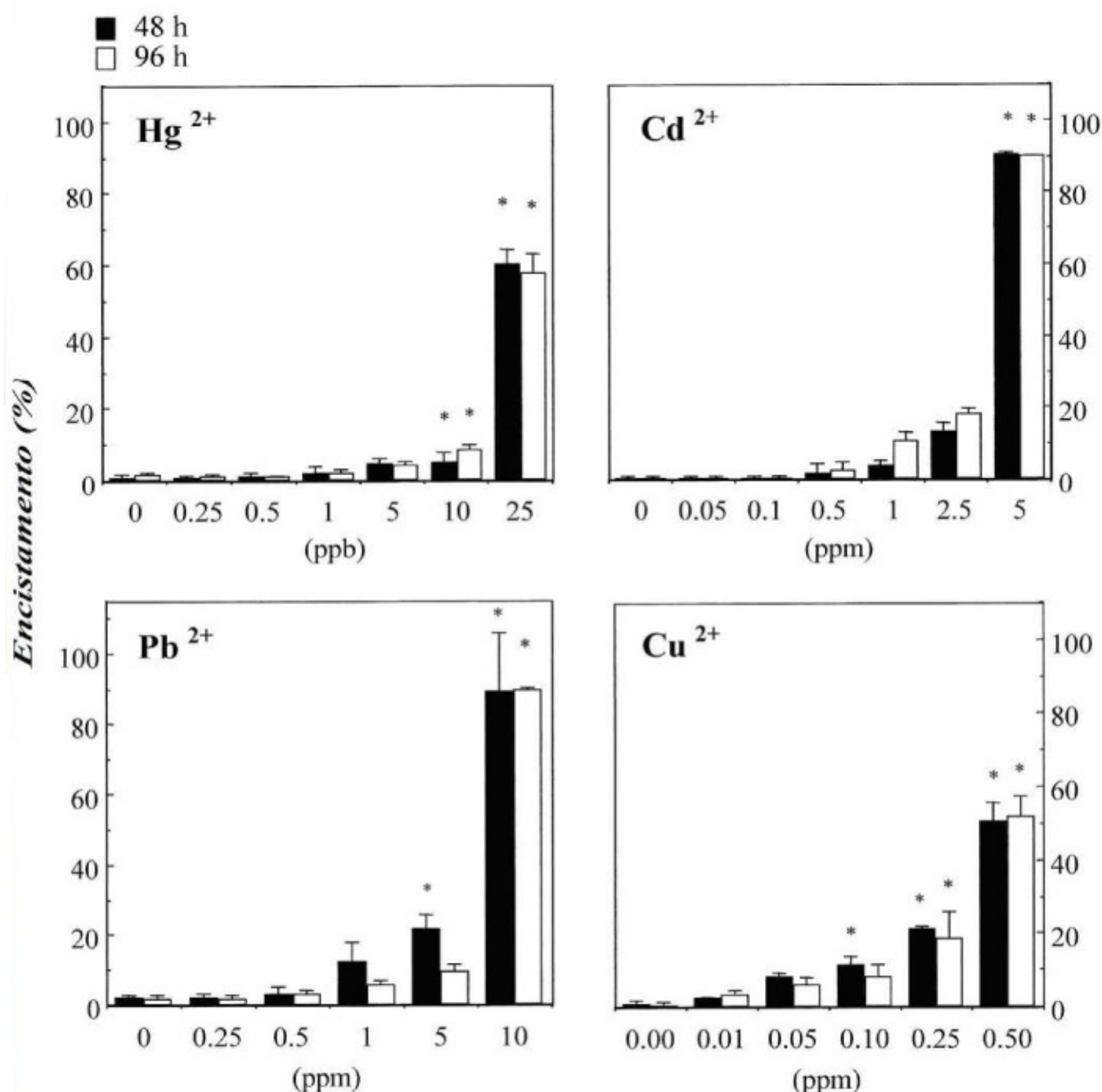


Fig. 2. Estimulação do encistamento de *G. polyedra*, após 48 e 96 h de exposição, a concentrações crescentes de metais. Os dados estão expressos como porcentagem de cistos assexuais na população celular total e representam a média de três experimentos independentes, mais o desvio padrão. *Significativamente diferente do grupo controle ($p < 0,05$).

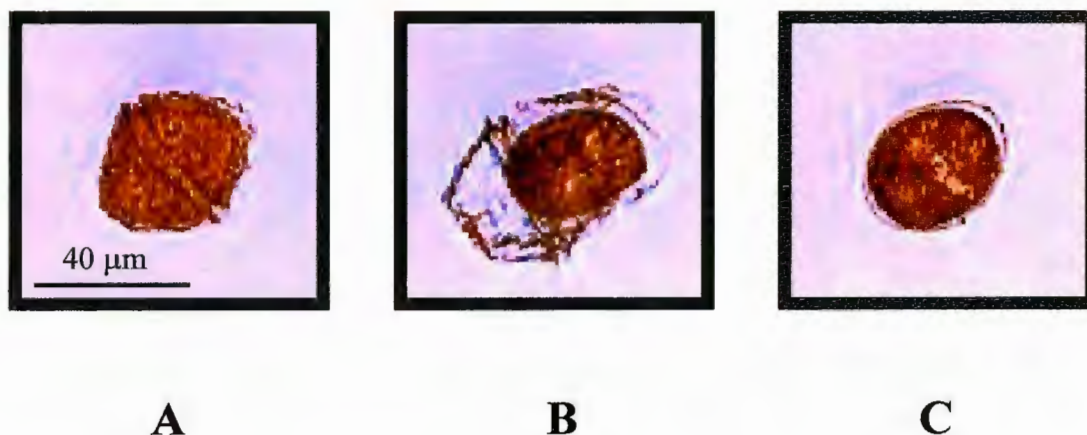


Fig. 3. Morfologias celulares de *G. polyedra* durante o encistamento induzido por Cu^{2+} (0,1 ppm). A. Célula mastigota normal, em meio livre de metais tóxicos. B. Célula liberando sua teca após 1 h de exposição a Cu^{2+} . C. Célula encistada após 4 h de exposição a Cu^{2+} . Os cistos assexuais de *G. polyedra* são caracterizados pela retração do citoplasma, ausência de teca e flagelos e síntese de parede celular cística.

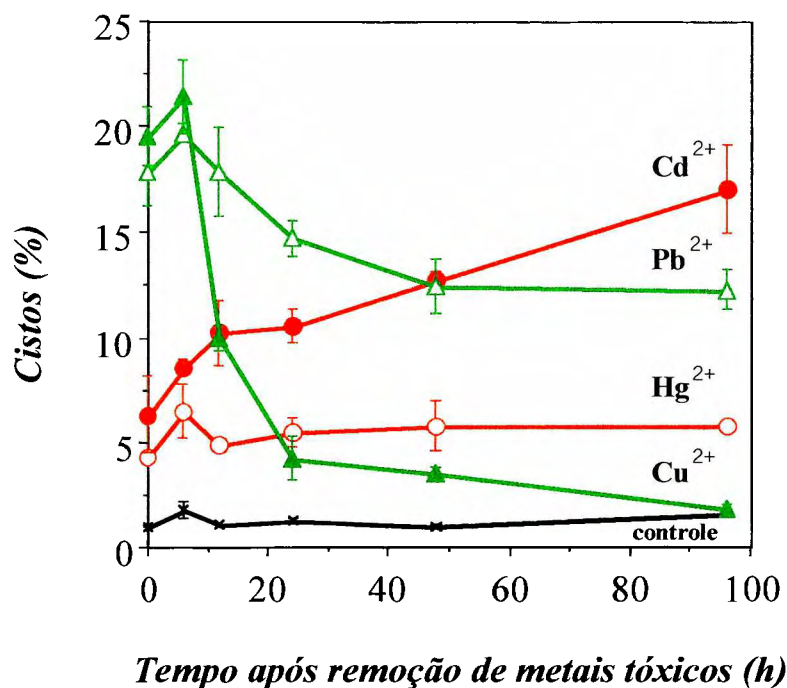


Fig. 4. Excistamento de *G. polyedra* após remoção de metais tóxicos do meio de cultura. Células previamente expostas por 48 h a altas concentrações de metais (10 ppb Hg²⁺, 1 ppm Cd²⁺, 5 ppm Pb²⁺ e 0,25 ppm Cu²⁺), foram concentradas por filtração, lavadas em meio de cultura f/2 e inoculadas para cultivo em meio f/2 novo (tempo zero). A porcentagem de cistos assexuais na população foi então monitorada ao longo de 96 h de cultivo. Os dados representam a média de três experimentos independentes, mais o desvio padrão.

Bioluminescência: A adição de altas concentrações de metais (10,0 ppb Hg^{2+} ; 1,0 ppm Cd^{2+} ; 5,0 ppm Pb^{2+} ; e 0,25 ppm Cu^{2+}) à cultura também estimula a bioluminescência de *G. polyedra*, medida como luz total emitida no primeiro minuto após o tratamento (fig. 5). Esta emissão foi 4 a 8 vezes maior que a proporcionada por estímulo mecânico apenas, medido pela adição de meio de cultura f/2 (controle de emissão basal). Como um segundo controle, a emissão máxima de luz, induzida por estímulo químico, foi medida pela injeção de uma solução de ácido acético 0,5%, a qual causou um aumento de emissão de luz 10 vezes maior que o proporcionado pelo estímulo mecânico.

Com o intuito de avaliar os efeitos prolongados da exposição a metais, sobre a bioluminescência espontânea de *G. polyedra*, as culturas mantidas em ciclo LD 12:12 h foram transferidas para condições constantes (ciclo LL) e os efeitos do estresse metálico medidos durante pelo menos 5 dias. A médio prazo, o efeito mais visível da exposição aguda a metais é o aumento da frequência de *flashes* bioluminescentes. Estes são medidos como número de pulsos luminosos espontâneos (i.e. não mecanicamente estimulados), por unidade de tempo. Este efeito persiste por cerca de 2 dias, onde a intensidade do *glow* permanece similar ao controle sob tratamento com Hg^{2+} e Cd^{2+} , porém muito alterado sob tratamento com Pb^{2+} e Cu^{2+} (fig. 6). Os efeitos da exposição crônica a metais sobre a bioluminescência também foram analisados. Células mantidas em tratamento crônico com Hg^{2+} e Cu^{2+} tiveram a intensidade do *glow* luminoso aumentado, enquanto células tratadas com Pb^{2+} e Cd^{2+} tiveram a intensidade do *glow* diminuída. Além disto, a frequência de *flashes* também aumentou drasticamente sob exposição a Cu^{2+} (Fig. 7A). Com relação aos efeitos sobre a ritmicidade bioluminescente, células cronicamente expostas a Hg^{2+} e Cu^{2+} apresentaram um período ligeiramente diminuído do seu ritmo circadiano de *glow* luminoso, ao contrário do pequeno aumento do mesmo, observado em células cronicamente expostas a Pb^{2+} e Cd^{2+} (fig. 7B). Como ilustrado, o ritmo circadiano dos *flashes* não foi alterado nas mesmas condições experimentais,

indicando que ambos, *flash* e *glow*, representam medidas diferentes dos efeitos do estresse metálico.

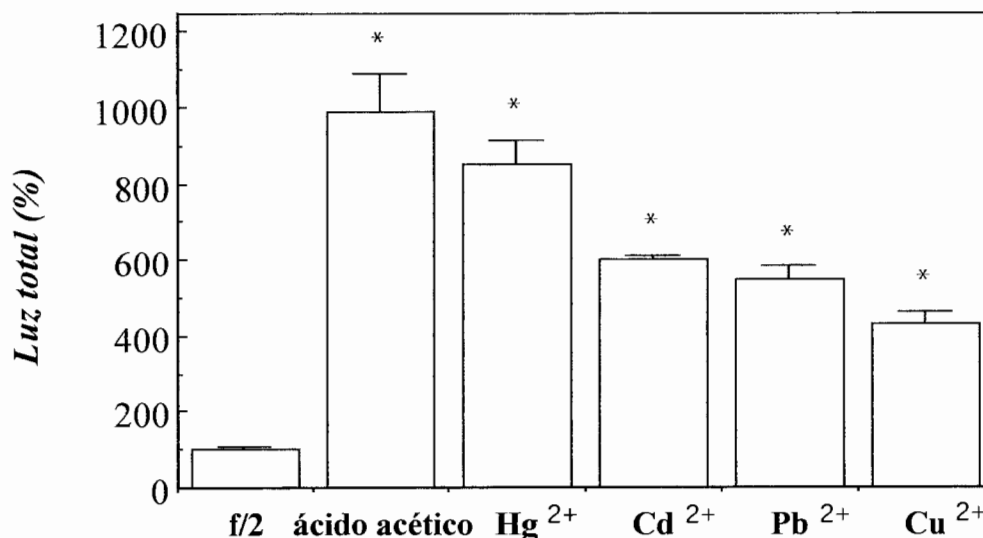


Fig. 5. Efeitos imediatos de altas concentrações de metais sobre a bioluminescência de *G. polyedra*. Os metais foram injetados no meio de cultura (concentrações finais: 10 ppb Hg²⁺, 1 ppm Cd²⁺, 5 ppm Pb²⁺ e 0,25 ppm Cu²⁺) e a emissão de luz total medida durante 1 min. Como controles, meio f/2 (emissão basal de luz) e ácido acético 0,5% (emissão máxima de luz) também foram injetados. Os dados encontram-se expressos como porcentagem em relação à emissão basal (100%) e representam a média de três experimentos independentes, mais o desvio padrão. *Significativamente diferente do grupo controle ($p < 0,05$).

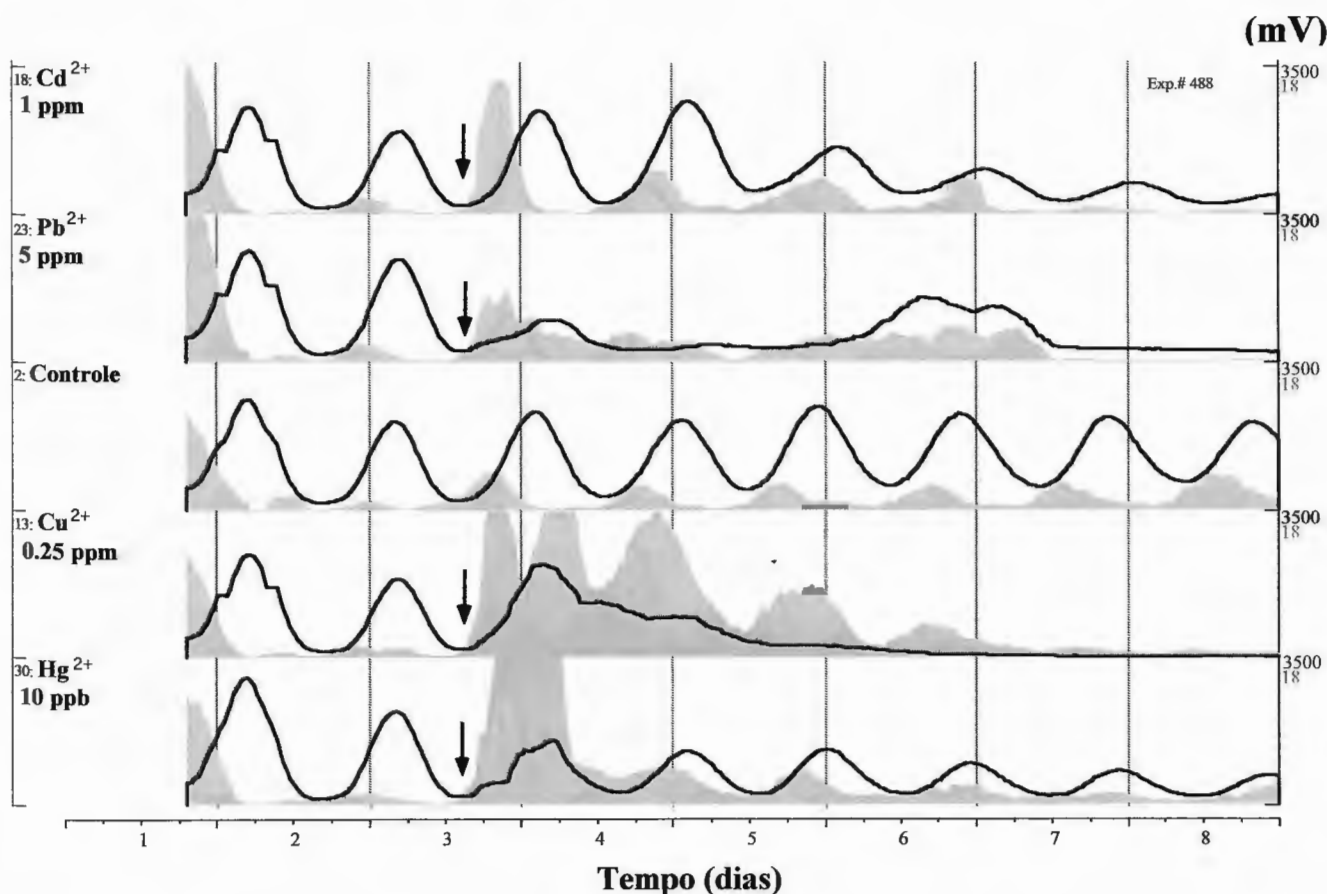


Fig. 6. Efeitos de altas concentrações de metais sobre a amplitude e ritmicidade de *glow* (linhas) e *flashes* (curvas preenchidas) bioluminescentes de *G. polyedra*. Culturas celulares foram transferidas para condições constantes de iluminação (ciclo LL) e acrescidas de altas concentrações de metais (concentrações finais: 10 ppb Hg^{2+} , 1 ppm Cd^{2+} , 5 ppm Pb^{2+} e 0,25 ppm Cu^{2+}). Os efeitos sobre o *glow* e *flashes* bioluminescentes foram monitorados durante 5 dias de tratamento, à $20 \pm 1^\circ\text{C}$. As setas indicam o momento da adição de metais no meio.

A

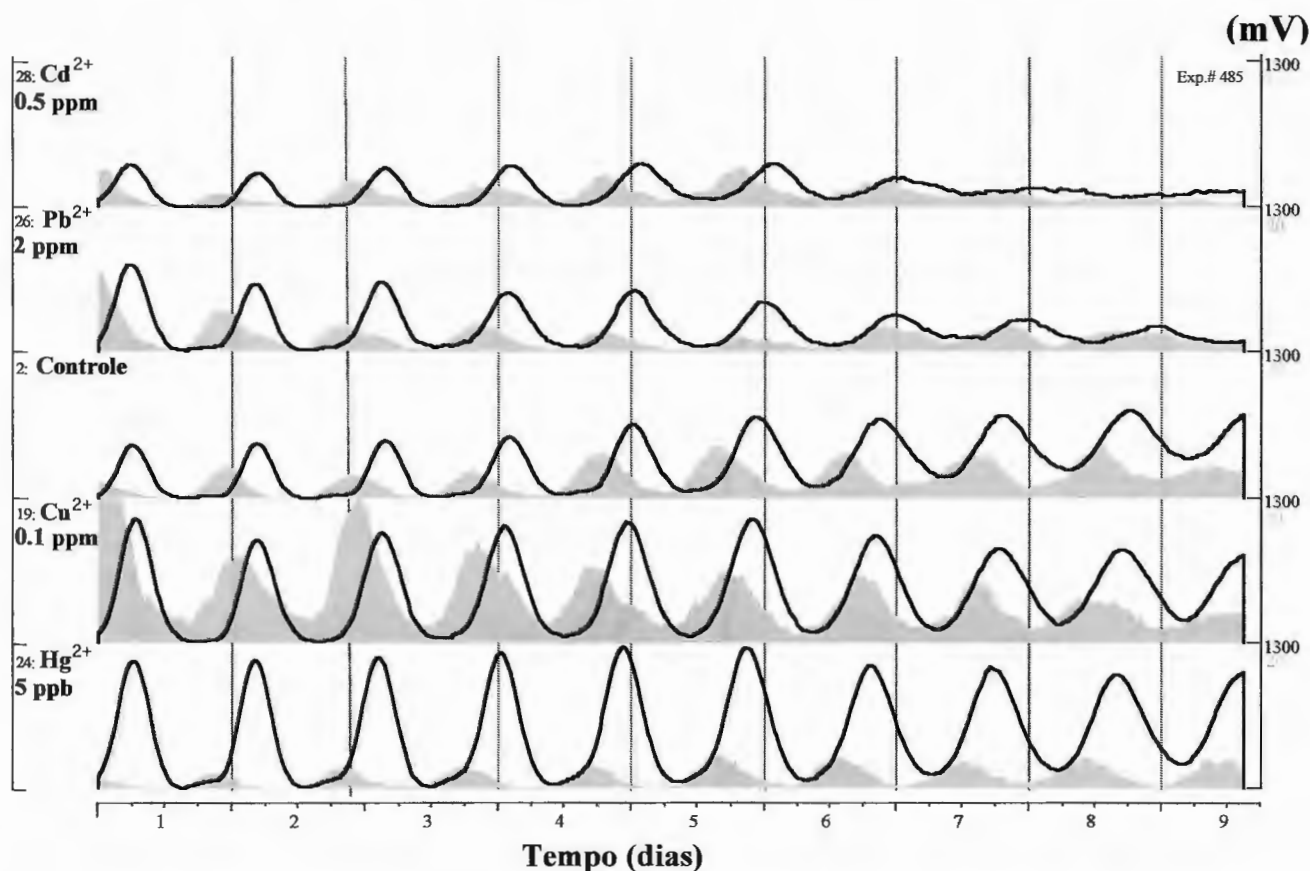


Fig. 7A. Efeitos do estresse metálico crônico sobre a intensidade de *glow* (linhas) e *flashes* (curvas preenchidas) bioluminescentes de *G. polyedra*. Culturas celulares expostas a concentrações subletais de metais (5 ppb Hg^{2+} , 0,5 ppm Cd^{2+} , 2 ppm Pb^{2+} e 0,1 ppm Cu^{2+}), por 30 dias, foram transferidas para condições constantes de iluminação (ciclo LL) e os efeitos sobre a amplitude de *glow* e frequência de *flashes* bioluminescentes, monitorados durante uma semana, à $20 \pm 1^\circ\text{C}$.

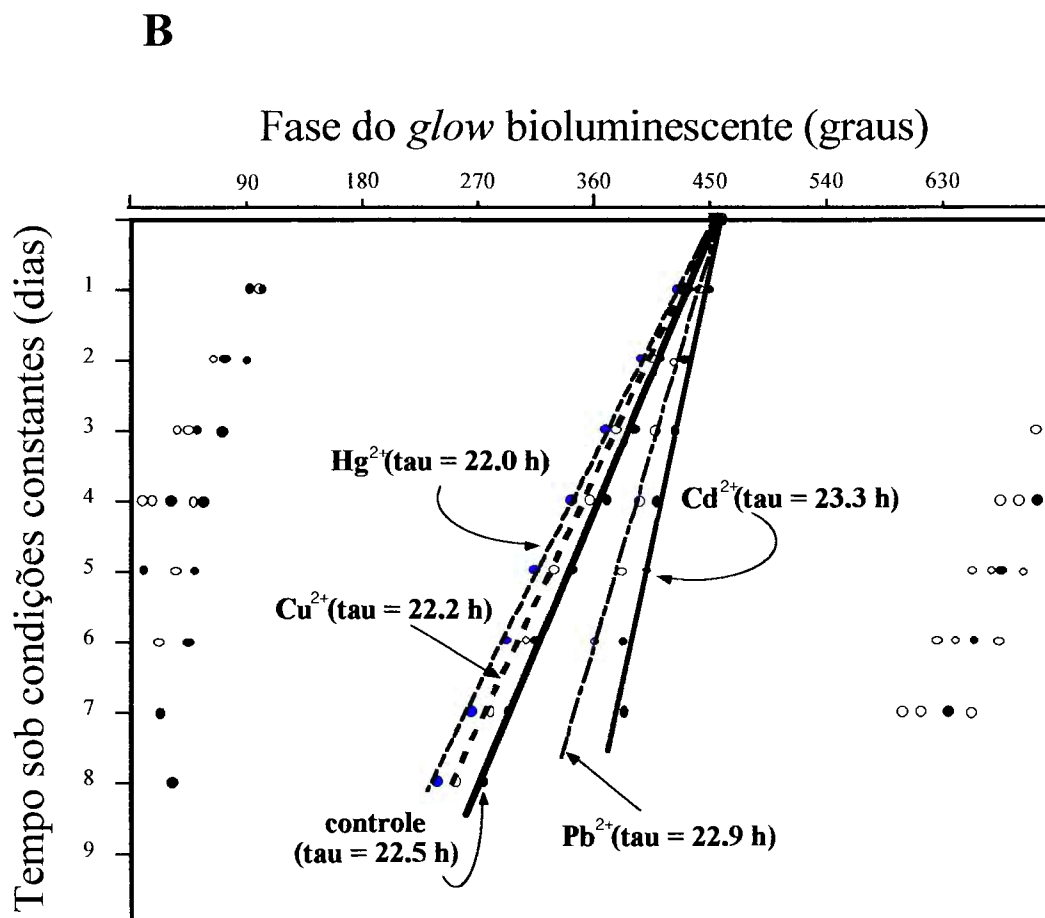


Fig. 7B. Efeitos do estresse metálico crônico sobre a ritmicidade do *glow* bioluminescentes de *G. polyedra*. Os dados do experimento na fig. 7A foram plotados de forma a evidenciar os efeitos crônicos dos metais, sobre o período do ritmo circadiano do *glow* bioluminescente. Os metais Hg^{2+} e Cu^{2+} encurtaram ligeiramente o período bioluminescente, enquanto um pequeno prolongamento deste período foi observado sob tratamento com Cd^{2+} e Pb^{2+} .

4.2. Balanço oxidativo em cloroplastos

Antioxidantes: Cloroplastos foram isolados de células mantidas sob tratamento crônico ou agudo a metais e as atividades de enzimas antioxidantes determinadas (fig. 8). Sob tratamento crônico, aumentos significativos na atividade das enzimas SOD (Hg^{2+} , 10 %; Cd^{2+} , 70 %; Pb^{2+} , 56 %; Cu^{2+} , 30 %) e

Apx (Hg^{2+} , 80 %; Cd^{2+} , 171 %; Pb^{2+} , 232 %; Cu^{2+} , 317 %) foram observadas. A resposta da enzima Apx foi maior que a da SOD, com aumentos de até 5 vezes em sua atividade. Esta alta indução da Apx poderia estar relacionada aos níveis elevados de H_2O_2 , provenientes não apenas da sua produção não enzimática, mas também do aumento das reações catalisadas pela SOD, no tratamento crônico. De fato, induções semelhantes de Apx em decorrência de alta atividade de SOD foram observadas em tabaco e na alga unicelular *Selenastrum capricornutum*, sob condições de estresse metálico (Van Camp *et al.* 1996, Sauser *et al.* 1997). Contudo, sob tratamento agudo com metais, nenhuma alteração significativa foi detectada na atividade de ambas enzimas, com exceção da SOD (35 %) em células de *G. polyedra* tratadas com Cd^{2+} .

Quanto à análise de pigmentos, diferentes respostas foram observadas para dois importantes carotenóides de *G. polyedra*, dependendo do modelo de estresse metálico aplicado (Fig. 9). Células submetidas a tratamento crônico com metais apresentaram poucas alterações nos níveis de β -caroteno, embora, em geral, os níveis de peridinina tenham diminuído significativamente (Hg^{2+} , 14 %; Cd^{2+} , 12 %; Pb^{2+} , 16 %). Inversamente, sob exposição aguda a metais, um aumento de cerca de 2 vezes foi observado nos níveis de β -caroteno, enquanto nenhuma alteração significativa foi detectada nos níveis de peridinina, nas mesmas condições experimentais.

Como o β -caroteno é considerado um eficiente supressor de moléculas eletronicamente excitadas (e.g. O_2 ($^1\Delta_g$) e carbonilas *triplet*), esta alta razão β -caroteno/clorofila *a* encontrada sob estresse metálico agudo sugere uma maior necessidade de fotoproteção. Do mesmo modo, baixos níveis de peridinina/clorofila *a* observados sob tratamento crônico indicam uma menor capacidade de captação de energia luminosa, uma vez que a peridinina é um dos principais pigmentos antenas em *G. polyedra*.

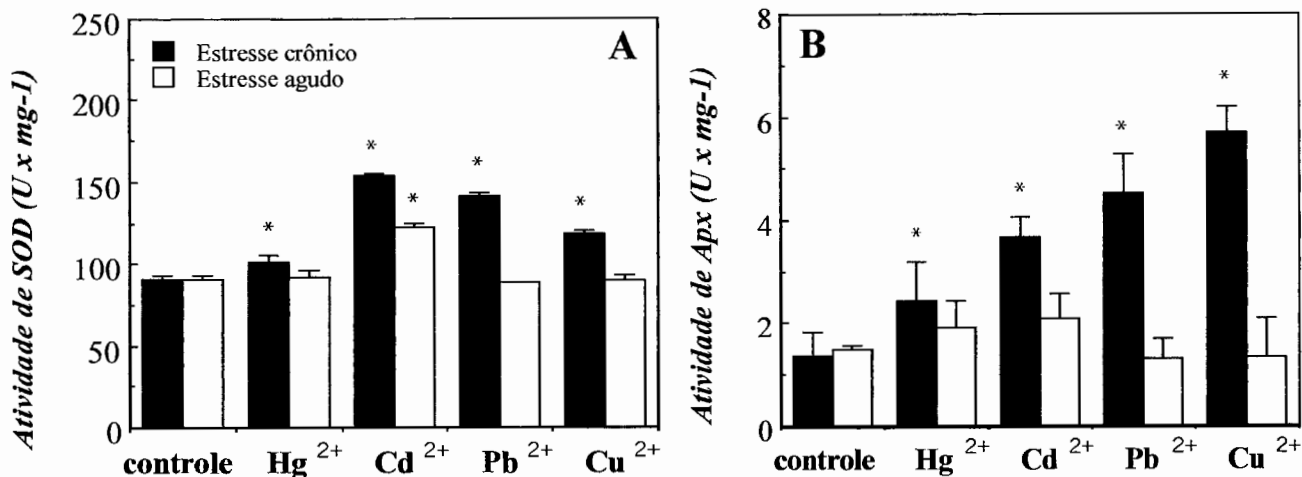


Fig. 8. Atividades das enzimas SOD (A) e Apx (B), em cloroplastos de células de *G. polyedra*, mantidas sob estresse metálico crônico ou agudo. Os dados representam a média de três experimentos independentes, mais o desvio padrão. *Significativamente diferente do grupo controle ($p < 0,05$).

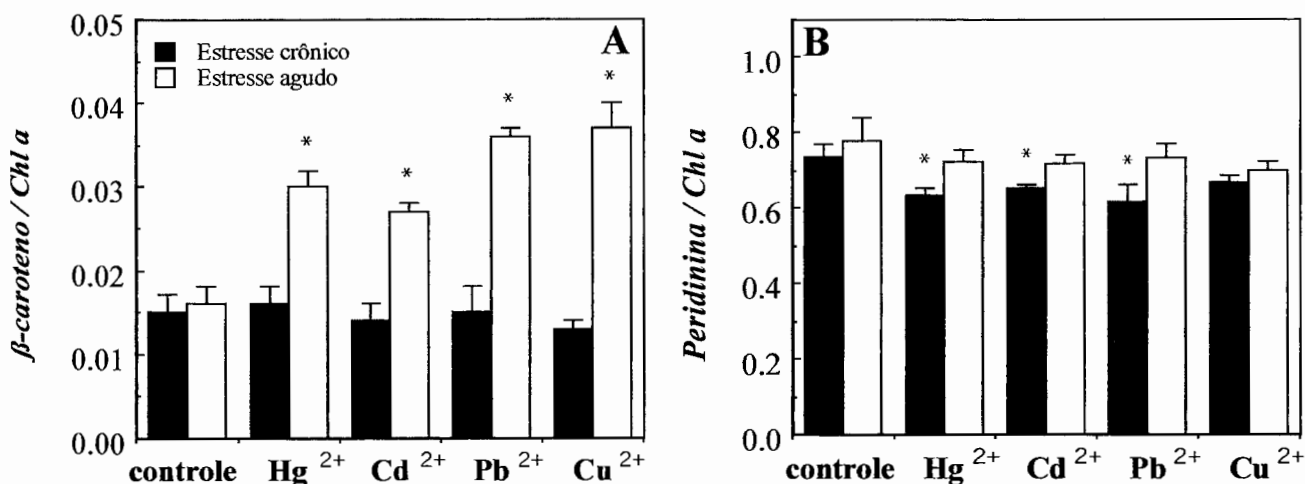


Fig. 9. Pigmentos carotenóides em cloroplastos de células de *G. polyedra*, mantidas sob estresse metálico crônico ou agudo. As concentrações de β-caroteno (A) e peridina (B) foram normalizadas pelo conteúdo de clorofila *a* (Chl *a*). Os dados representam a média de três experimentos independentes, mais o desvio padrão. *Significativamente diferente do grupo controle ($p < 0,05$).

Índices de estresse oxidativo: Como a indução de antioxidantes contra a produção exacerbada de ERO difere de acordo com a severidade do estresse, as diferentes respostas antioxidantes, encontradas nos tratamentos crônico e agudo, sugerem a indução de estados oxidativos distintos, por cada modelo de estresse metálico. Para investigar esta hipótese, o consumo de O_2 e o poder redutor das células expostas a metais foram monitorados. Embora moderados, aumentos no consumo de O_2 (8 – 15 %) foram observados após a adição de metais à cultura celular (fig. 10). Altas doses de metais resultaram em um consumo de O_2 mais acentuado quando comparado com a adição de doses subletais, indicando que a produção de ERO é mais exacerbada durante o modelo agudo de estresse metálico. Nestas mesmas condições agudas, diminuições no poder redutor celular foram encontradas (Hg^{2+} , 16 %; Cd^{2+} , 24 %; Pb^{2+} , 18 %), com exceção das células tratadas com Cu^{2+} , indicando um estado celular pró-oxidativo (fig. 11). Inversamente, com exceção do tratamento com Pb^{2+} , aumentos no poder redutor foram detectados em células submetidas ao modelo crônico de estresse metálico (Hg^{2+} , 122 %; Cd^{2+} , 192 %; Cu^{2+} , 66 %), indicando uma alta capacidade antioxidante celular.

Lesões oxidativas: Uma vez que estados oxidativos celulares distintos parecem ser instalados de acordo com o tratamento metálico, uma possível correlação entre danos oxidativos e modelo de estresse metálico foi examinada. Este estudo foi focalizado sobre proteínas e lipídeos, por serem estes as principais moléculas estruturais dos cloroplastos. O conteúdo de carbonilas protéicas foi utilizado como índice de oxidação de proteínas (fig. 12A), enquanto os níveis de dienos conjugados foram avaliados para se estimar os primeiros estágios de peroxidação lipídica (fig. 12B). Sob exposição crônica a metais, estimulações de oxidação protéica (81 %) e peroxidação lipídica (58 %) ocorreram somente em células tratadas com Pb^{2+} . Entretanto, grandes aumentos nos níveis de carbonilas protéicas (Hg^{2+} , 92 %; Cd^{2+} , 50 %; Pb^{2+} , 161 %; Cu^{2+} , 56 %) e

dienos conjugados (Hg^{2+} , 137 %; Cd^{2+} , 125 %; Pb^{2+} , 255 %; Cu^{2+} , 278 %) foram detectados em células sob tratamento agudo a metais, indicando um estado celular pró-oxidativo. Nestas condições, constituintes das membranas interna e externa dos cloroplastos, bem como componentes dos tilacóides, são considerados os principais alvos para danos oxidativos (Asada & Takahashi, 1987).

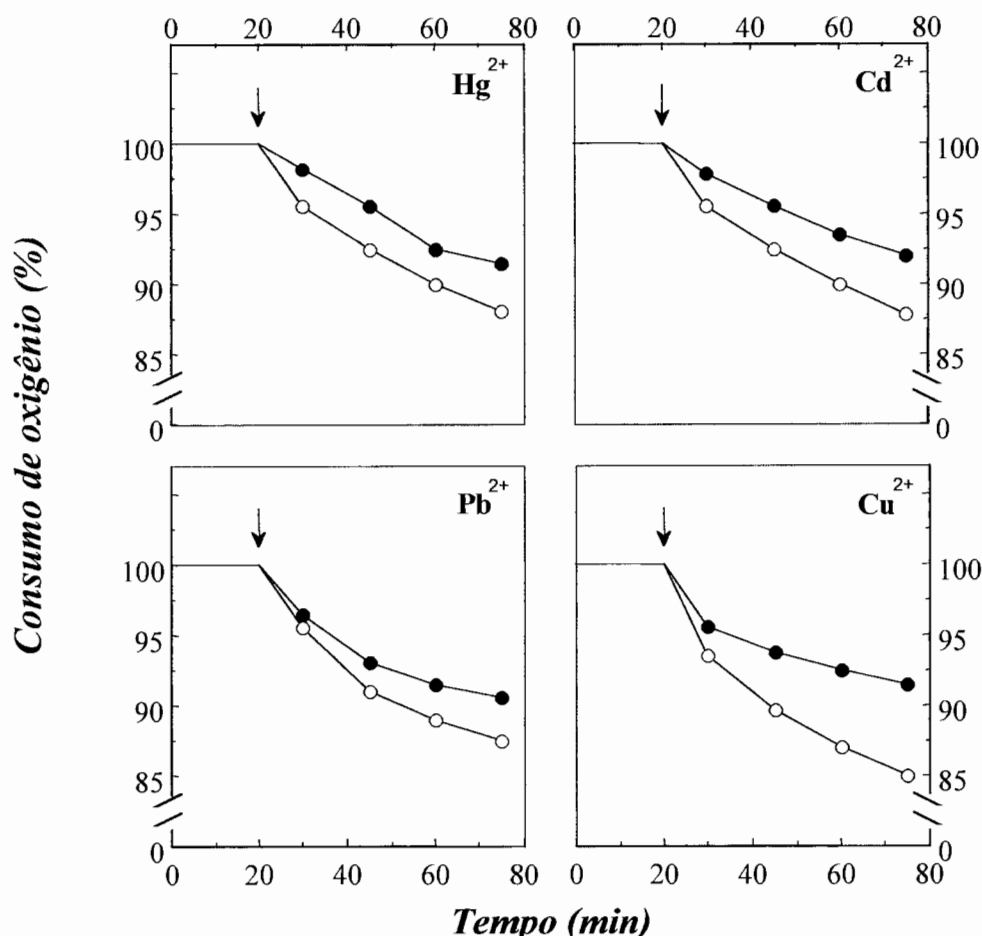


Fig. 10. Consumo de O_2 por células expostas a diferentes concentrações de metais. Altas concentrações (10 ppb Hg^{2+} , 1 ppm Cd^{2+} , 5 ppm Pb^{2+} e 0,25 ppm Cu^{2+} ; círculos abertos) ou concentrações subletais (5 ppb Hg^{2+} , 0,5 ppm Cd^{2+} , 2 ppm Pb^{2+} e 0,1 ppm Cu^{2+} ; círculos preenchidos) de metais foram adicionadas às culturas celulares, nos tempos indicados pelas setas. O consumo de O_2 foi monitorado durante 60 min, imediatamente após a adição de metais no meio. Os dados estão expressos em porcentagem em relação à concentração inicial (100%) de O_2 no meio. A concentração de O_2 nas culturas controles, mantidas em ausência de metais, não variou significativamente em 60 min.

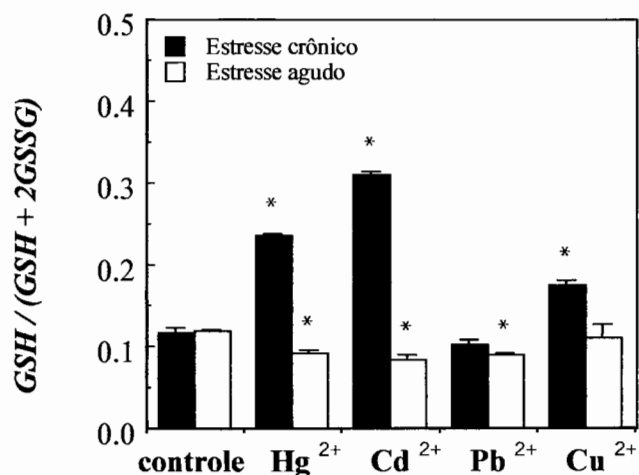


Fig. 11. Poder redutor em células de *G. polyedra* mantidas sob estresse metálico crônico ou agudo. Os dados estão expressos como conteúdo de glutathiona reduzida em relação à glutathiona total (reduzida + oxidada) e representam a média de três experimentos independentes, mais o desvio padrão. *Significativamente diferente do grupo controle ($p < 0,05$).

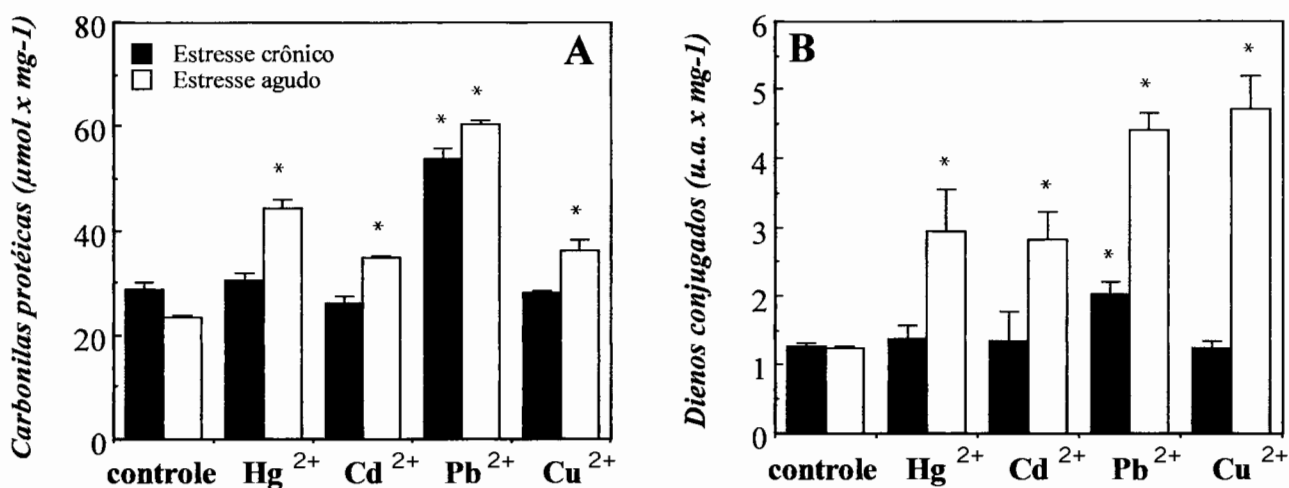


Fig. 12. Lesões oxidativas sobre proteínas (A) e lipídeos (B) de cloroplastos de células de *G. polyedra*, mantidas sob estresse metálico crônico ou agudo. Os dados representam a média de três experimentos independentes, mais o desvio padrão. *Significativamente diferente do grupo controle ($p < 0,05$).

4.3. Padrões de indução da enzima SOD

Com o intuito de avaliar a importância da enzima SOD na resistência de *G. polyedra* ao estresse metálico, respostas específicas desta enzima foram estudadas sob diferentes tratamentos experimentais com metais.

4.3.1. Efeitos do tempo de exposição e concentração de metais

Curso temporal: A figura 13 mostra a indução de atividade total da SOD por concentrações fixas de metais, ao longo do tempo. Células expostas a concentrações subletais de Hg^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} e Cu^{2+} apresentaram um aumento gradual na atividade da SOD até 12 h após a adição destes metais às culturas celulares. Os valores máximos de atividade, atingidos após este período, mantiveram-se até o final do experimento (96 h). Entretanto, quando as células foram expostas a altas concentrações de metais, rápidos aumentos na atividade da SOD, seguidos de declínios acentuados da mesma, foram observados. Células tratadas com Hg^{2+} e Cd^{2+} apresentaram máximo de atividade de SOD 6h após a adição destes metais na cultura, enquanto a exposição aos metais Pb^{2+} e Cu^{2+} promoveram um máximo de indução após cerca de 1 – 2 h de tratamento.

Dose-dependência: Com base nos dados de indução temporal, os efeitos de diferentes concentrações de metais sobre a atividade total da SOD foram analisados por meio de curvas dose-resposta, durante um tempo de exposição fixo de 6 h (fig. 14). Após este curto período, aumentos na atividade da SOD foram observados conforme o aumento da concentração de metais no meio. Esta indução dose-dependente foi observada para todos os metais analisados. O declínio de atividade encontrado nas concentrações mais altas de cada metal correspondem, provavelmente, ao aumento da taxa de mortalidade celular, nestas condições.

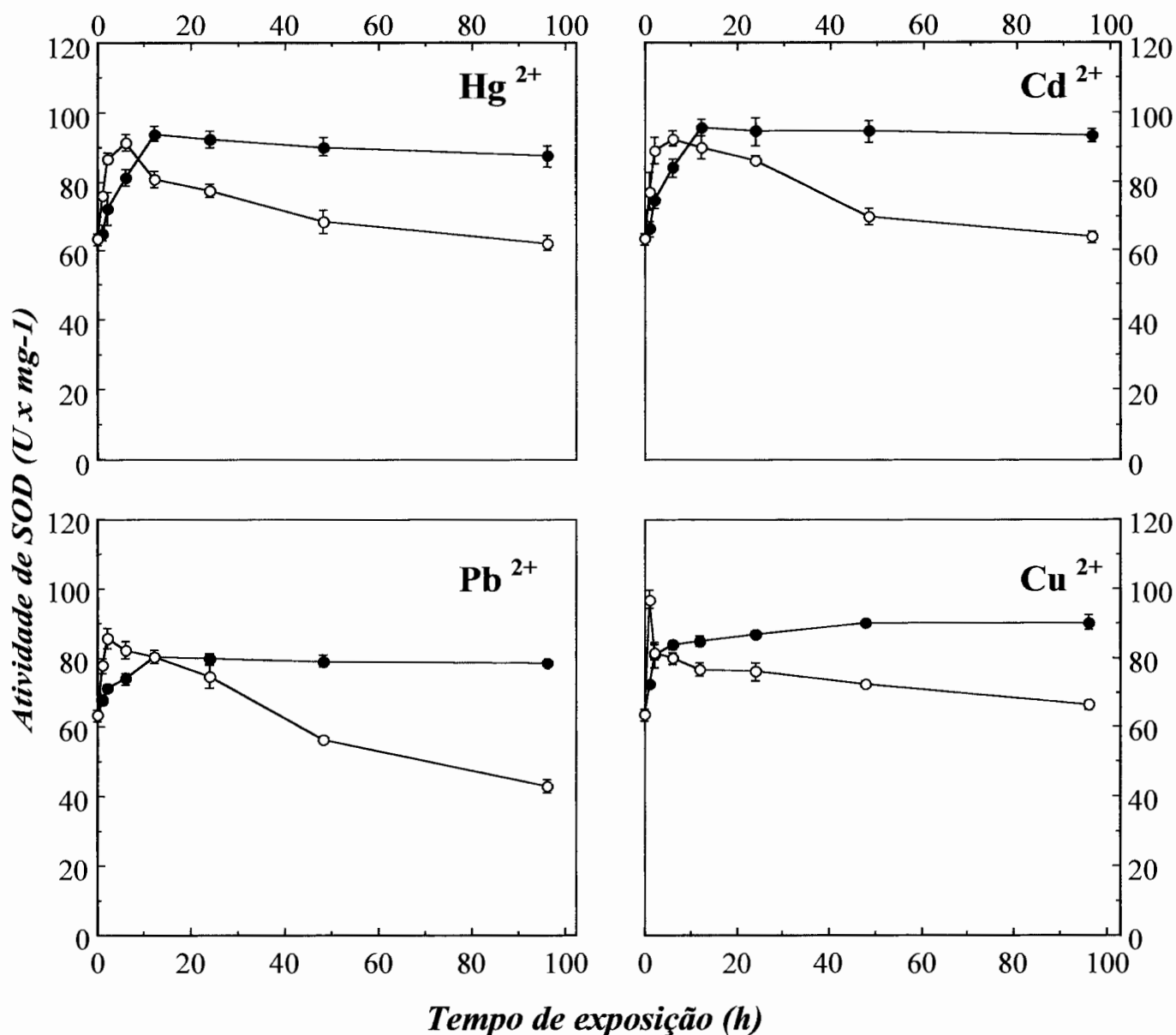


Fig. 13. Curso temporal da indução da atividade total da SOD. Células de *G. polyedra* foram expostas a altas concentrações (10 ppb Hg²⁺, 1 ppm Cd²⁺, 5 ppm Pb²⁺ e 0,25 ppm Cu²⁺; círculos abertos), ou concentrações subletais (5 ppb Hg²⁺, 0,5 ppm Cd²⁺, 2 ppm Pb²⁺ e 0,1 ppm Cu²⁺; círculos preenchidos) de metais e a atividade da SOD medida em intervalos de tempo regulares. Os dados representam a média de três experimentos independentes, mais o desvio padrão.

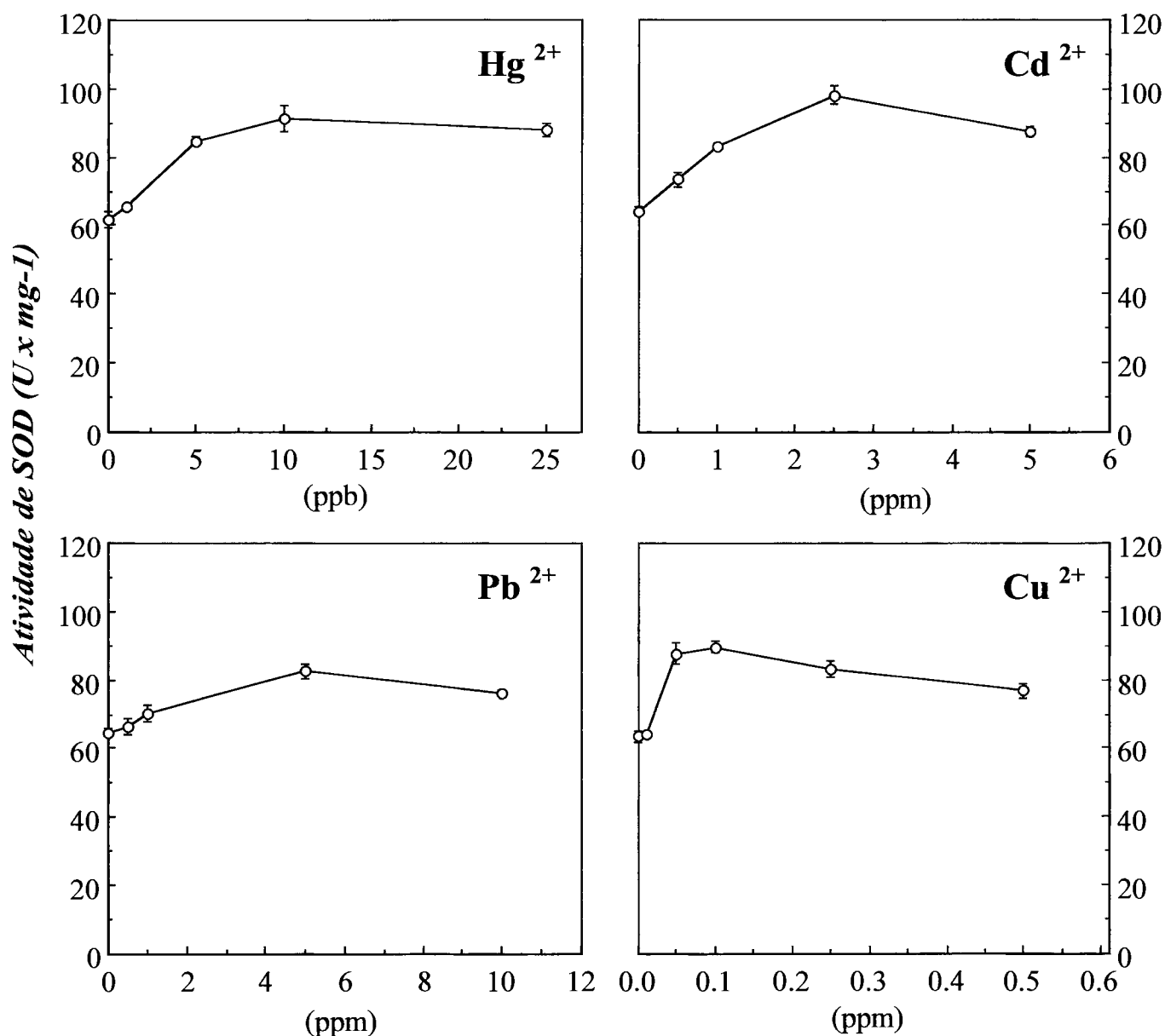


Fig. 14. **Indução dose-dependente da atividade total da SOD.** Células de *G. polyedra* foram expostas à diferentes concentrações de metais e a atividade da SOD medida após 6 h de exposição. Os dados representam a média de três experimentos independentes, mais o desvio padrão.

4.3.2. Isoformas de SOD presentes em *G. polyedra*

O perfil eletroforético das diferentes isoformas de SOD, presentes no extrato bruto celular de *G. polyedra*, é mostrado na figura 15. A discriminação das isoformas foi baseada no tratamento com inibidores específicos, previamente à coloração do gel por atividade de SOD. Sete bandas acromáticas podem ser observadas no perfil eletroforético. Duas destas bandas desapareceram do gel após tratamento com CN^- e H_2O_2 , sendo assim, atribuídas à atividade da CuZnSOD. Outras três bandas, resistentes ao tratamento com cianeto, mas inibidas por H_2O_2 , foram identificadas como referentes à atividade da FeSOD. Por fim, as bandas resistentes a ambos os tratamentos foram atribuídas à atividade da MnSOD.

A isoforma responsável pela atividade de SOD nos cloroplastos foi identificada pela análise comparativa dos perfis eletroforéticos obtidos com o extrato bruto celular e o extrato de cloroplastos, isolados por gradiente de densidade. Neste experimento, as bandas visualizadas com maior nitidez foram as correspondentes à atividade da FeSOD (Fig. 16A). A migração das bandas parece ser de certa forma influenciada pela grande quantidade de pigmentos presente nos extratos de cloroplastos, principalmente pelo complexo *PCP*, presente em grande abundância no lúmen dos tilacóides (Le *et al.* 1997).

Análises em *Western blot*, utilizando-se anticorpos policlonais contra FeSOD, marcaram uma banda protéica específica de cerca de 32 kDa, confirmando a presença desta isoforma nos cloroplastos de *G. polyedra* (Fig. 16B). Imunodeteccões, utilizando anticorpos policlonais contra MnSOD e CuZnSOD, não resultaram em marcações específicas com proteínas presentes no extrato de cloroplastos deste dinoflagelado (dado não mostrado).

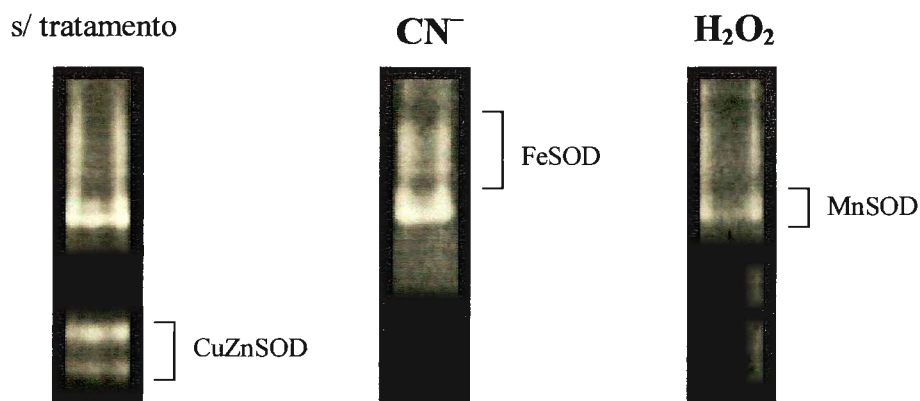


Fig. 15. Isoformas de SOD detectadas no extrato bruto celular de *G. polyedra*. São mostrados perfis eletroforéticos em géis de atividade de SOD. A discriminação das isoformas de SOD foi baseada na sensibilidade característica aos inibidores CN^- (CuZnSOD) e H_2O_2 (CuZnSOD e FeSOD).

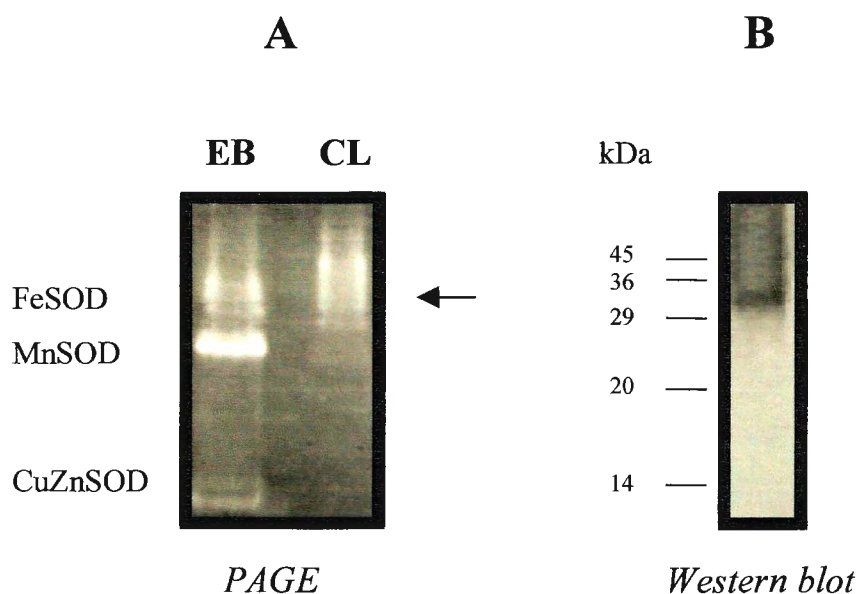


Fig.16. Detecção de FeSOD em extratos de cloroplastos de *G. polyedra*. **A.** Perfis eletroforéticos em gel de atividade de SOD. EB: extrato bruto celular, CL: extrato de cloroplastos. **B.** Imunodeteção por *Western blot*, com extrato de cloroplastos e anticorpo policlonal contra FeSOD. Padrão de peso molecular: albumina bovina (45 kDa), GAPDH (36 kDa), anidrase carbônica (29 kDa), inibidor de tripsina (20 kDa) e α -lacto albumina (14 kDa).

4.3.3. Indução diferencial das isoformas de SOD

Estresse metálico: Análises dos perfis eletroforéticos das isoformas de SOD, em extratos de células expostas a altas concentrações de metais, revelaram padrões distintos de indução enzimática. Neste experimento, aumentos significativos de atividade, refletidos na maior intensidade das bandas acromáticas, foram detectados apenas para as isoformas FeSOD e MnSOD, conforme evidenciado pela análise densitométrica do gel (Fig. 17). Imunodeteccões em *Western blot*, com anticorpos policlonais contra cada isoforma de SOD, também mostraram diferenças quanto aos níveis protéicos desta enzima, em células mantidas em presença ou ausência de metais (fig. 18). A análise densitométrica da auto-radiografia apontou quantidades cerca de 2 a 5 vezes maiores de FeSOD e até 10 vezes maiores de MnSOD em células tratadas com metais, ao passo que os níveis de CuZnSOD não variaram significativamente, em relação ao controle.

Oscilação circadiana: Apesar da variação circadiana da atividade da SOD ter sido descrita há cerca de dez anos em *G. polyedra* (Colepicolo *et al.* 1992), pouco é sabido sobre a natureza desta ritmicidade. Com o intuito de investigar as isoformas responsáveis pela oscilação diária de atividade da SOD, análises dos perfis eletroforéticos, em géis de atividade, foram realizadas com extratos celulares coletados ao longo de 24 h. A coloração específica para SOD revelou bandas acromáticas de maior intensidade em extratos de células coletadas nas primeiras horas do período claro, corroborando com os dados obtidos pelo método do cit.c, onde o pico máximo de atividade é encontrado em torno do LD03 (fig. 19). A análise densitométrica do respectivo gel indicou aumentos significativos, apenas para a atividade das isoformas FeSOD e MnSOD, enquanto a atividade da CuZnSOD apresentou poucas variações, com relação à fase do dia. Estas oscilações diárias de atividade também são acompanhadas de variações nos níveis protéicos de FeSOD e MnSOD, conforme indicado pelas

imunodeteccões em *Western blot* (fig. 20). Os níveis celulares de CuZnSOD mostraram-se bastante similares ao longo do período de 24 h.

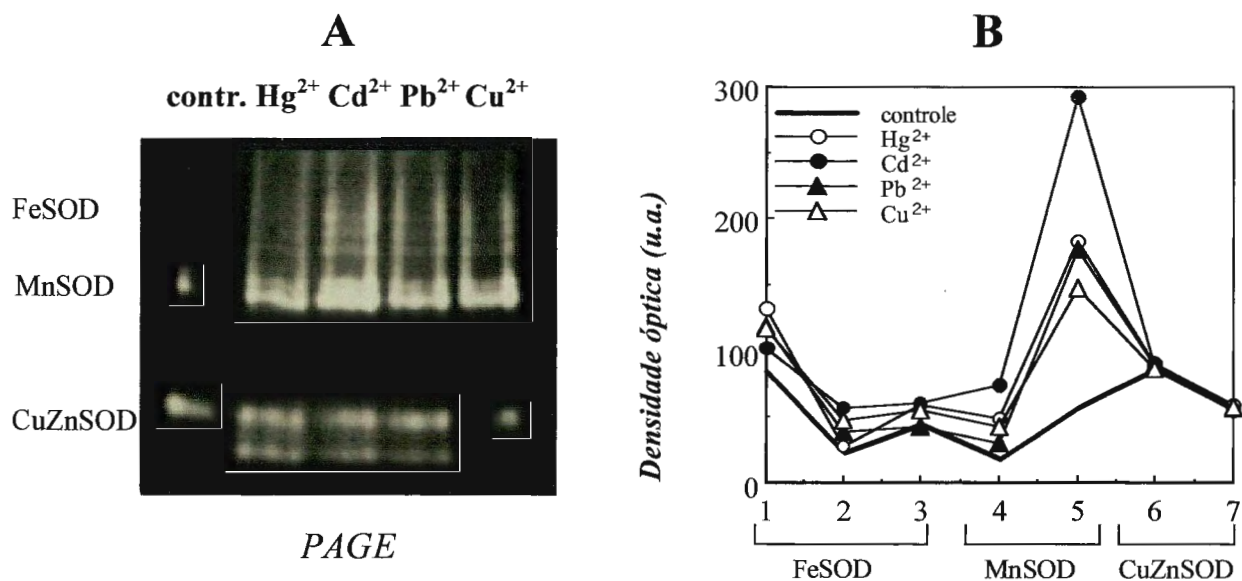


Fig. 17. **Aumentos das atividades de FeSOD e MnSOD por exposição a metais.** **A.** Perfil eletroforético em gel de atividade de SOD, de extratos de células expostas a altas concentrações de metais (10 ppb Hg²⁺, 1 ppm Cd²⁺, 5 ppm Pb²⁺ e 0,25 ppm Cu²⁺), por 6 h. Quantidades protéicas iguais de cada extrato (20 µg) foram aplicadas no gel. **B.** Análise densitométrica do respectivo gel, revelando aumentos específicos das atividades das isoformas FeSOD e MnSOD.

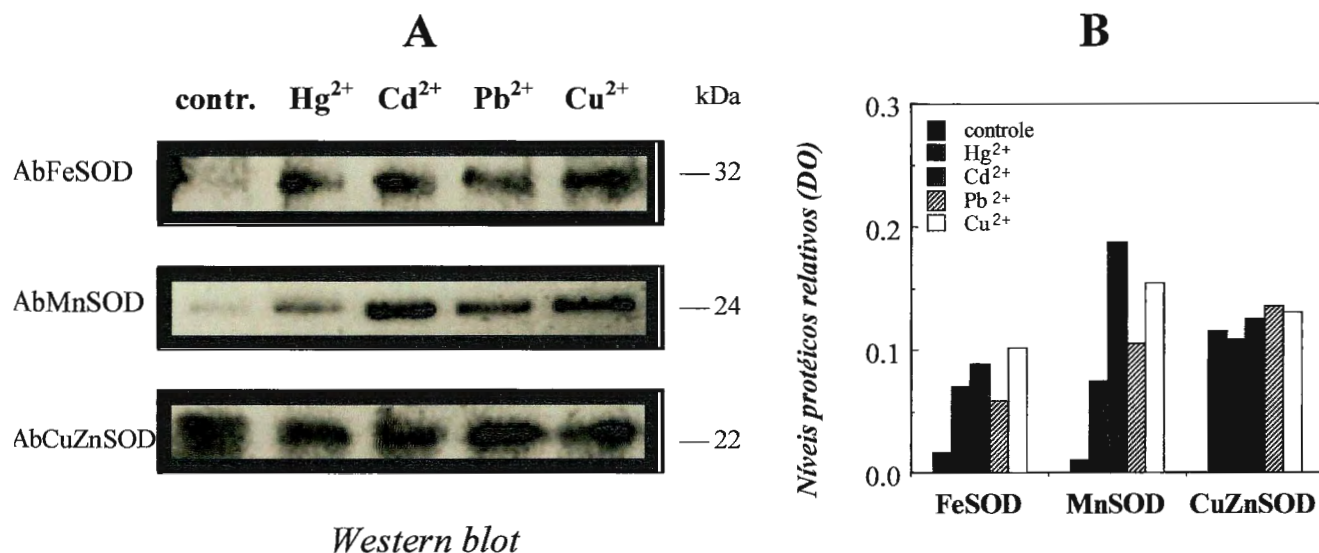


Fig 18. Aumentos dos níveis protéicos de FeSOD e MnSOD por exposição a metais. **A.** Imunodeteccção por *Western blot*, com extratos de células expostas a altas concentrações de metais (10 ppb Hg²⁺, 1 ppm Cd²⁺, 5 ppm Pb²⁺ e 0,25 ppm Cu²⁺), por 6 h. Quantidades protéicas iguais de cada extrato (20 µg) foram aplicadas no gel. **B.** Análise densitométrica respectiva, revelando aumentos específicos dos níveis protéicos das isoformas FeSOD e MnSOD.

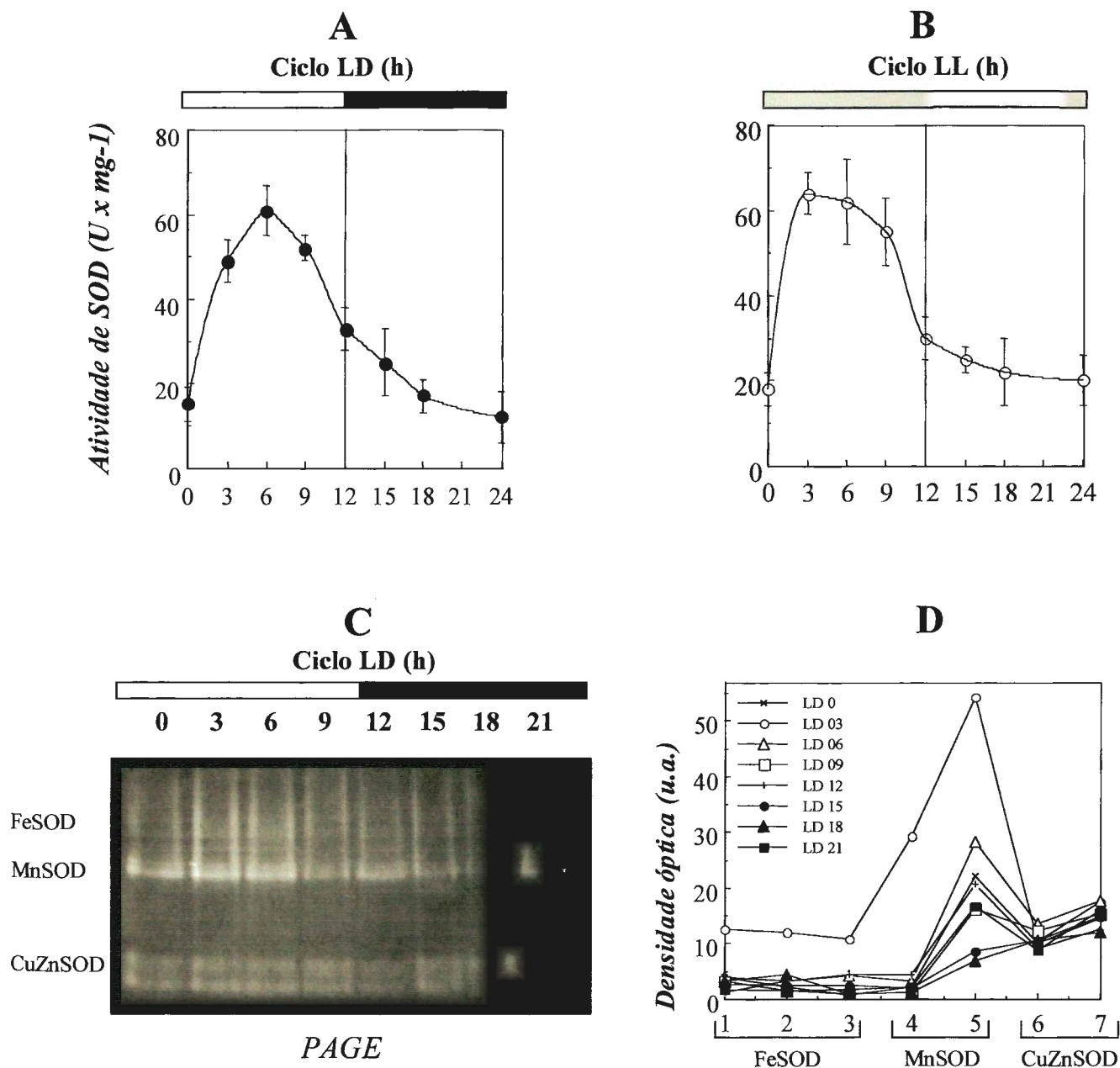


Fig. 19. **Oscilações circadianas das atividades de FeSOD e MnSOD.** Ritmicidade circadiana da atividade total da SOD, em células cultivadas sob (A) ciclo claro/escuro (LD 12:12 h) ou (B) claro constante (LL, sob luz atenuada). C. Perfil eletroforético em gel de atividade de SOD, de extratos de células coletadas ao longo de 24 h, cultivadas sob ciclo LD 12:12 h. Quantidades protéicas iguais de cada extrato (20 μ g) foram aplicadas no gel. D. Análise densitométrica do respectivo gel, revelando maiores atividades das isoformas FeSOD e MnSOD, durante a fase clara.

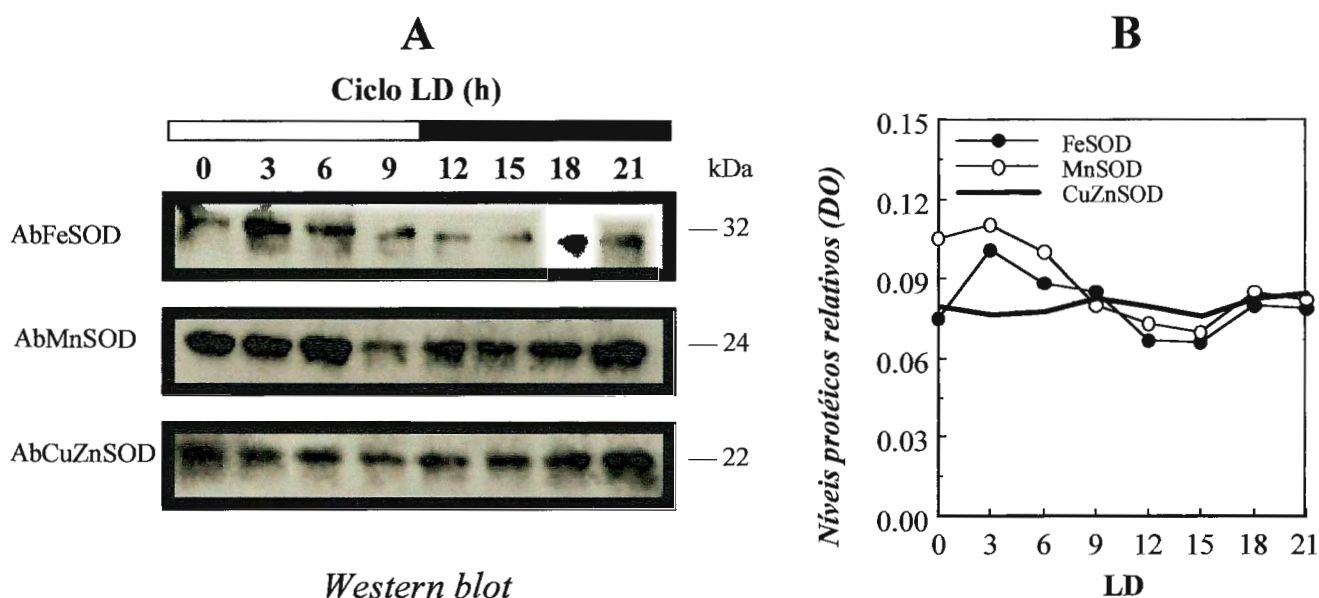


Fig 20. Oscilações circadianas dos níveis protéicos de FeSOD e MnSOD. A. Imunodeteccões por *Western blot*, com extratos de células coletadas ao longo de 24 h, cultivadas sob ciclo LD 12:12 h. Quantidades protéicas iguais de cada extrato (20 μ g) foram aplicadas no gel. **B.** Análise densitométrica respectiva, revelando maiores níveis protéicos de FeSOD e MnSOD, durante a fase clara .

4.4. Clonagem parcial e análise de expressão da FeSOD

Os experimentos anteriores indicam que, sob estresse metálico, as isoformas de SOD que sofrem variações em sua atividade são a FeSOD e a MnSOD. Estas mesmas isoformas também oscilam circadianamente, com máximo de atividade no início do período diurno. Em ambos os casos, as variações de atividade enzimática são acompanhadas de variações também nos níveis de proteína. Como a exposição a metais poluentes promove distúrbios no metabolismo oxidativo em cloroplastos de *G. polyedra* e pela FeSOD ser a isoforma responsável pela detoxificação de $O_2^{\bullet-}$ nestas organelas, os estudos moleculares foram focalizados sobre a expressão da FeSOD, nas diferentes condições experimentais propostas.

4.4.1. Caracterização molecular prévia

Estudo de similaridade e elaboração de primers degenerados: Realizou-se uma breve pesquisa no *GeneBank* a respeito das seqüências de FeSOD descritas até o momento. O alinhamento de algumas destas seqüências revelou um alto grau de similaridade, encontrando-se pelo menos 3 domínios altamente conservados, relacionados ao sítio catalítico desta enzima (fig. 21).

Fig. 21. Estudo comparativo de similaridade entre FeSOD de diferentes organismos. Seqüências protéicas extraídas do *GenBank* foram alinhadas pelo programa *Clustal W* e a análise de similaridade realizada através do programa *Box shade*. Os resíduos conservados estão destacados em negrito, ao longo das seqüências de aminoácidos e representados por letras maiúsculas na seqüência *consensus*, em caso de 100% de identidade.

FeSOD

N. plumbaginifolia chloroplast (tobacco) 1MTMITNSSSVPGDPLESTCRGGGGAKF...LQPP...PM...AE
 A. thaliana 1SLHSSLKLELQQRMAASSAVTANV...KPP...EAL...AE
 Glycine max 1MASLGGGLQNVSGINFLIKEGPKVNAK...LQPP...PLNG...E
 P. boryanum 1MA...TQ...P...FPK...AE
 L. pneumophila 1MT...T...H...Q...A...A...A
 P. leiognathi 1MS...E...A...A...A...A
 E. coli 1MS...E...A...A...A...A
 P. putida 1A...F...P...A...H...A...Q
 T. cruzi 1MV...S...I...P...W...G...Y...G...A
 L. chagasi 1 MFRRVSMKAATATAPVGF AFLCYHTLPLLRYP...A...E...T...G...ENYKDIGI
 Monocercomonas sp. 1
 H. acosta 1
 T. vaginalis 1
 C. jejuni 1M...E...L...R...K...A...N...D...T...N...A...F...G
 T. pyriformis 1N...E...Y...S...D...E
consensus 1 felp lpy dal

N. plumbaginifolia chloroplast (tobacco) 41 ...M...S...R...E...F...W...K...H...R...A...N...D...K...O...I...D...S...E...I...D...G...T...L...E...D...L...V...T...Y...N...K...G
 A. thaliana 39 ...M...S...R...E...F...W...K...H...R...A...N...D...K...O...I...D...S...E...I...D...G...T...L...E...D...L...V...T...Y...N...K...G
 Glycine max 41 ...V...M...S...Q...O...Q...E...F...W...K...H...K...T...V...E...K...K...O...V...V...I...D...R...S...I...E...E...V...T...S...Y...N...K...G
 P. boryanum 17 ...Y...G...M...K...A...E...F...D...Y...Y...K...H...A...A...V...T...K...V...E...P...M...S...I...S...T...F...D...V...K...O...S...F...D...S
 L. pneumophila 17 ...H...V...S...K...E...L...E...Y...Y...K...H...P...O...T...V...T...N...I...K...E...A...F...E...G...S...L...E...R...R...S...S...E...E...
 P. leiognathi 17 ...H...I...S...A...E...L...E...Y...Y...K...H...P...O...T...V...T...N...I...K...E...A...F...E...G...S...L...E...R...R...S...S...E...E...
 E. coli 17 ...H...I...S...A...E...L...E...Y...Y...K...H...P...O...T...V...T...N...I...K...E...A...F...E...G...S...L...E...R...R...S...S...E...E...
 P. putida 16 ...H...I...S...K...E...L...E...Y...H...D...A...N...T...V...V...N...V...P...P...F...E...G...T...L...E...V...K...S...S...S...
 T. cruzi 48 A...P...V...F...P...R...O...M...E...L...Y...T...K...K...A...N...D...K...A...A...G...T...Y...D...K...S...I...E...E...L...A...V...A...N...D...A
 L. chagasi 47 Q...P...V...M...S...R...O...Q...E...L...Y...K...H...S...A...N...D...K...A...N...T...G...K...G...C...E...A...T...I...E...E...L...A...T...S...T...T
 Monocercomonas sp. 1Q...A...V...D...M...T...K...V...P...E...S...E...F...E...G...T...I...E...D...V...K...T...S...S...P...
 H. acosta 1Q...A...V...D...T...A...K...V...P...E...S...P...E...N...E...K...S...I...E...E...Q...N...A...Q...S...P...
 T. vaginalis 1Q...A...V...I...D...T...A...K...I...V...S...G...L...E...K...S...I...E...E...V...Q...K...A...Q...S...P...
 C. jejuni 16 D...F...L...S...A...E...L...F...S...Y...H...H...K...H...N...T...V...T...N...I...K...D...E...F...A...N...D...V...S...I...K...T...S...N...S...
 T. pyriformis 10 E...V...L...S...A...H...L...S...F...H...G...K...H...Q...A...V...N...M...L...A...T...Y...E...Q...I...A...A...T...K...E...N...D...A...H...K...A...L...Q...S...
consensus 51 ph ms tlefhygkhhnaYv nln li gt e egktleeiikst g

N. plumbaginifolia chloroplast (tobacco) 89 A...P...L...P...A...E...N...N...A...A...Q...A...N...H...O...F...E...S...M...K...E...N...G...S...E...S...G...E...L...L...E...L...E...N...R
 A. thaliana 87 D...L...L...P...A...E...N...N...A...A...Q...A...N...H...O...F...E...S...M...K...E...N...G...S...E...S...G...E...L...L...E...L...E...R
 Glycine max 89 D...I...L...P...A...E...N...N...A...A...Q...A...N...H...O...F...E...S...M...K...E...N...G...S...E...S...G...E...L...L...E...L...E...R
 P. boryanum 66 S...K...V...E...N...N...A...A...Q...A...N...H...O...F...E...S...M...K...E...N...G...S...E...S...G...E...L...L...E...L...E...R
 L. pneumophila 63 ...G...I...E...N...N...A...A...Q...A...N...H...O...F...E...S...M...S...E...N...G...S...E...K...E...R...I...E...R...A...N...K
 P. leiognathi 63 ...G...V...E...N...N...A...A...Q...A...N...H...O...F...E...S...M...S...E...N...G...S...E...T...S...K...V...A...E...A...A
 E. coli 63 ...G...V...E...N...N...A...A...Q...A...N...H...O...F...E...S...M...S...E...N...G...S...E...T...S...K...V...A...E...A...A
 P. putida 63 ...G...I...E...N...N...A...A...Q...A...N...H...O...F...E...S...M...S...E...N...G...S...E...T...S...K...V...A...E...A...A
 T. cruzi 96 E...K...K...L...E...N...Q...A...A...C...H...E...N...T...F...R...O...I...T...E...N...K...A...M...K...S...L...E...S...V...T...A
 L. chagasi 94 E...S...K...V...M...N...Q...A...A...C...H...E...N...S...E...F...K...O...L...S...E...G...E...K...K...I...E...K...T...L...E...N...A...A...N
 Monocercomonas sp. 32 ...L...E...N...N...I...A...C...H...Y...N...S...E...F...D...L...T...A...Q...K...Q...D...I...E...A...P...V...Q...E...F...L...T...Y
 H. acosta 32 ...L...E...N...N...V...A...C...H...E...N...S...E...F...K...O...L...T...N...T...K...Q...E...I...P...A...P...V...A...F...L...T...Y
 T. vaginalis 32 ...L...E...N...N...V...A...C...H...E...N...S...E...F...K...O...L...S...A...E...K...V...A...V...E...A...K...V...A...D...A...L...T...K
 C. jejuni 62 ...G...V...E...N...N...A...A...Q...Y...H...D...E...F...D...I...K...E...S...T...C...G...C...G...G...S...C...S...I...D...A...N...Q...A...L...E...K
 T. pyriformis 57 ...A...L...R...E...N...L...G...G...H...V...E...W...I...D...N...L...A...V...K...S...G...E...V...L...D...E...H...S...P...T...K...A...I...K...E
consensus 101 gvfnnaaqvWNHtfyw cl p ggg pt g laeai k

N. plumbaginifolia	129	DFGSYDAVVKERKAA-ATQFGSSTAVL	AYKPEEK.....K
chloroplast (tobacco)	104	DFGSYDAVVKERKAA-ATQFGSSTAVL	AYKPEEK.....K
A. thaliana	127	DETSYEKYESEFNAA-ATQFGA	AVLAYSNE.....K
Glycine max	129	DFGSYVKELDDEKAA-ATQFGSSTAVL	AYRARKFDGENVANPPSPDEDNK
P. boryanum	106	AFGSLDKEREESNA-ATQFGSSTAVL	ADDGG.....T
L. pneumophila	100	SFGSFAAEKREQSQT-ATTFGSS	STAVLQD.QSG.....A
P. leiognathi	100	SFGSFADKNAQETDA-IKNFGSS	STAVLKN.SDG.....K
E. coli	100	SEGSFADKNAQETDA-IKNFGSS	STAVLKN.SDG.....K
P. putida	100	AFGSFDKEREETKTSVGT	FGSSSTAVLKN..ADG.....S
T. cruzi	135	QFGSVEQREDAVQAGVNEGSS	STAVLTCVDPNSKN.....Q
L. chagasi	133	EFGSVDDDETVEQQAGVNEGSS	STAVLTCVDPRTK.....E
Monocercomonas sp.	67	HEQSVLDKERTDVAKSTVFGS	STAVLAQNADKS.....
H. acosta	67	HEKSVDDDKDVAKSTVFGS	STAVLAANKDGS.....
T. vaginalis	67	EFGSVEKEQETETAKSTVFGS	STAVLYKNKESK.....
C. jejuni	106	EFGSLENTAAEIKGTGVTGSS	STAVLYNTKNQ.....K
T. pyriformis	99	KWGSYENITLNTRTAAIQSS	STAVLGYDTSVK.....S
consensus	151	fgSyd Fk eF aa qfGsgwawlv	

N. plumbaginifolia	164	LALVKPPEENFVLS.YTELLI	AVWEHAYLDFQARRSD	ISIFMEKL
chloroplast (tobacco)	139	LALVKPPEENFVLS.YTELLI	AVWEHAYLDFQARRSD	ISIFMEKL
A. thaliana	168	LKVVKPPEAVNFVLS.SFELL	IVWEHAYLDFQARRSD	IKTFMTNL
Glycine max	179	LVLKSPPEAVNFVLS.GYYELL	IVWEHAYLDFQARRSD	ISVEMDKL
P. boryanum	139	LKVTKPPEENFVHS.QKELL	LVWEHAYLDFQARRSD	AFIKNELDNL
L. pneumophila	134	LKLINSPGTEMES.LNALL	CVWEHAYLYRRRRED	IEAFES.L
P. leiognathi	134	LALVSPSPGTEETD.ATELL	VNWEHAYLYRRRAG	LEHENA.L
E. coli	134	LALVSPSPGTEETD.ATELL	VNWEHAYLYRRRAG	LEHENA.L
P. putida	133	LALCSIGGAPES.DTELL	CVWEHAYLYRRRSL	KVEAFEN.L
T. cruzi	171	LVIDNSPAGCETES.LR	VAVWEHAYLKFETAGRIT
L. chagasi	168	LRIDNSPAGCETES.LR	PIFAVWEHAYLKFETAGRIT
Monocercomonas sp.	101	ISINQYSFANVVDN.GF	IVT.....	
H. acosta	101	ISINQYSFANVVDQ.GF	IVT.....	
T. vaginalis	101	IELGQYSFANVVDK.HKEV	IVT.....	
C. jejuni	141	IEFVGSFATLIED.KVGL	VVWEHAYLVHRRARA	LEKRYA.H
T. pyriformis	134	IRFELGQDMSEWSS.IV	LLIIVWEHAYLYQLR	LEKRYA.H
consensus	201	l iv t nag Plt g plltiDvwehayldf n rp yi fw l		

N. plumbaginifolia	213	VSFEASSRLKAATA.....	
chloroplast (tobacco)	188	VSFEASSRLKAATA.....	
A. thaliana	209	VSFEASARLEAAKASA.....	
Glycine max	229	VSFEASSRLEQAKLITSA.....	
P. boryanum	188	VNDFEAQNLA.....	
L. pneumophila	182	VNDFEAS...SNLK.....	
P. leiognathi	182	VNDFEAS...KNLAF.....	
E. coli	182	VNDFEAS...KNLAF.....	
P. putida	181	VNDFEAAEEGKTFKA.....	
T. cruzi		
L. chagasi	216	VDFEFCQMYEKATK.....	
Monocercomonas sp.		
H. acosta		
T. vaginalis		
C. jejuni	189	VNDFEAKAYEWALKEGMGSVSFYANELHPVK	
T. pyriformis	182	VNDFEAKRYLQAIE.....	
consensus	251	vnwefv a	

Amplificações de segmentos do cDNA de FeSOD de *G. polyedra* por RACE / PCR: *Primers* degenerados foram construídos com base nas seqüências de aminoácidos dos domínios conservados em FeSOD de diferentes organismos, presumindo-se que os mesmos também ocorram em *G. polyedra*. A posição relativa destes domínios conservados e dos *primers* para FeSOD encontram-se descritos na figura 22. Estes *primers* foram utilizados em amplificações por PCR, tendo como *template* moléculas de *cDNA* sintetizadas por RACE, a partir de *mRNA* de *G. polyedra*. Optou-se por utilizar células tratadas com Cd²⁺ (1 ppm, 4h) devido aos altos níveis de atividade de SOD encontrados sob tal tratamento, presumindo-se um nível igualmente alto de transcritos de FeSOD.

Apesar das amplificações controles da técnica terem sido satisfatórias, os produtos das primeiras reações de PCR, utilizando-se combinações mistas de *primers* “adaptadores” e *primers* específicos a FeSOD, em geral, não foram ideais, contendo muitas amplificações secundárias ou ausência de bandas (fig. 23). Entretanto, re-amplificações destas reações, utilizando-se somente *primers* específicos à FeSOD, produziram bandas mais definidas e de tamanho esperado (fig. 24). Ambas as técnicas de 3'RACE e 5'RACE produziram segmentos de *cDNA* de 280 e 170 pb, amplificados com as combinações de *primers* FSD2 x FSD3r e FSD1 x FSD2r, respectivamente.

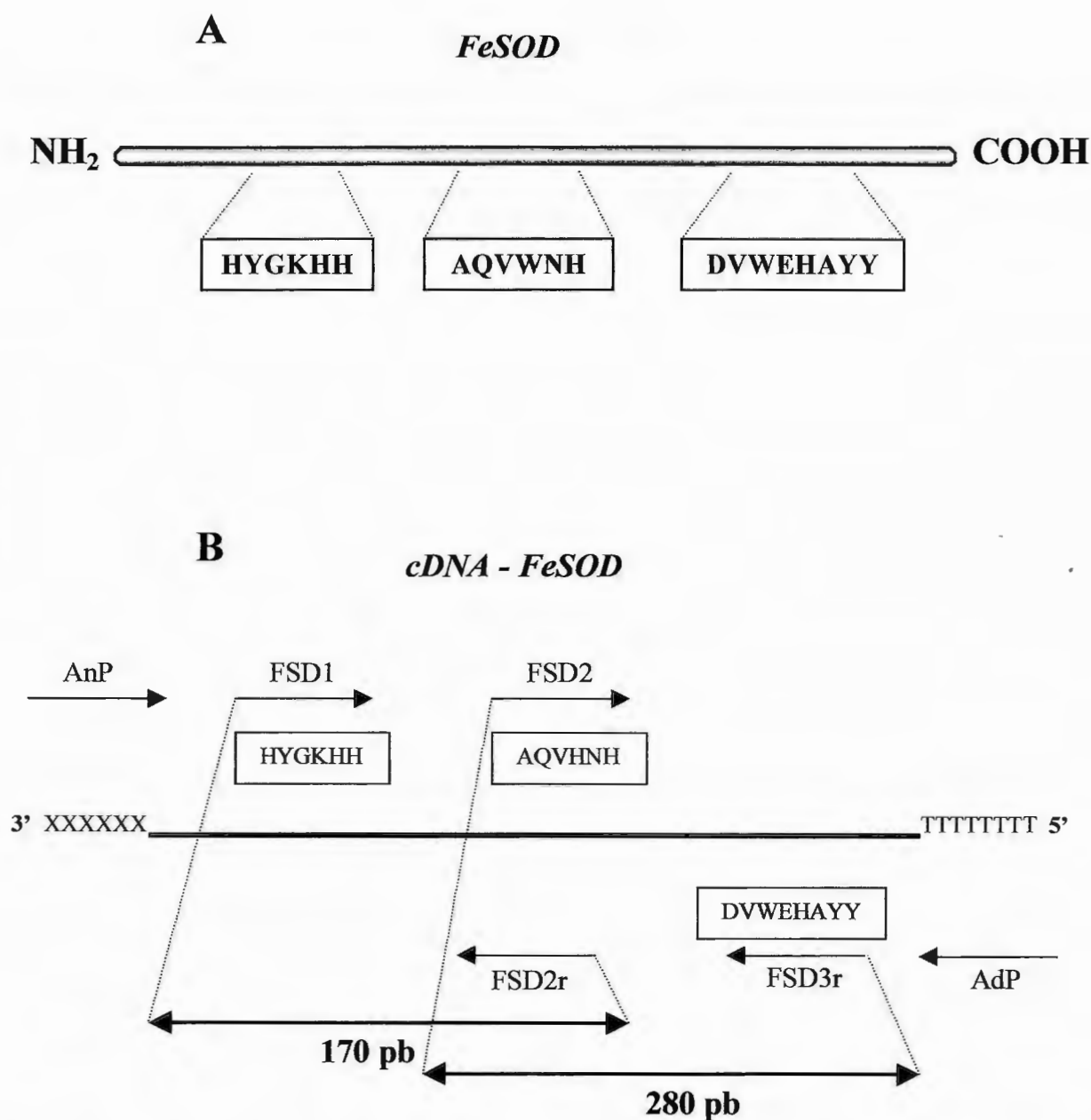


Fig. 22. Estratégia de clonagem do *cDNA* codificador de FeSOD em *G. polyedra*. **A.** Representação da estrutura primária da FeSOD, destacando os principais domínios conservados. **B.** Esquema do *cDNA* da FeSOD, sintetizado a partir de *mRNA* de *G. polyedra* por técnicas de *PCR*, mostrando a posição relativa dos domínios conservados e dos *primers* utilizados nas ampliações dos segmentos de 170 e 280 pb. AnP: *Anchor primer*; AdP: *Adapter primer* (*primers* inespecíficos, complementares às extremidades 5' e 3' do *cDNA*).

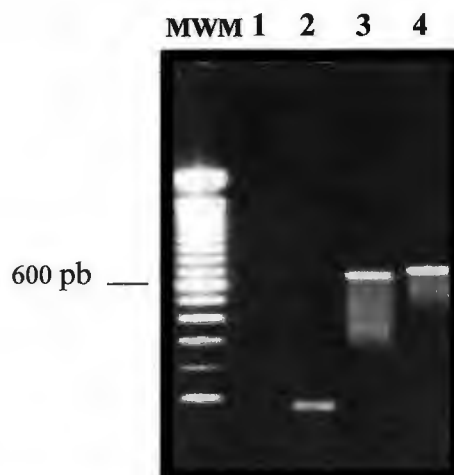


Fig. 23. Amplificações em *PCR* utilizando-se *primers* construídos para **FeSOD** e *primers* inespecíficos. Combinações utilizadas: 1: (*3'RACE*) FSD1 x AdP, 2: (*5'RACE*) AnP x FSD3R, 3: controle *3'RACE*, 4: controle *5'RACE*. MWM = padrão molecular (100 *bp DNA ladder*).

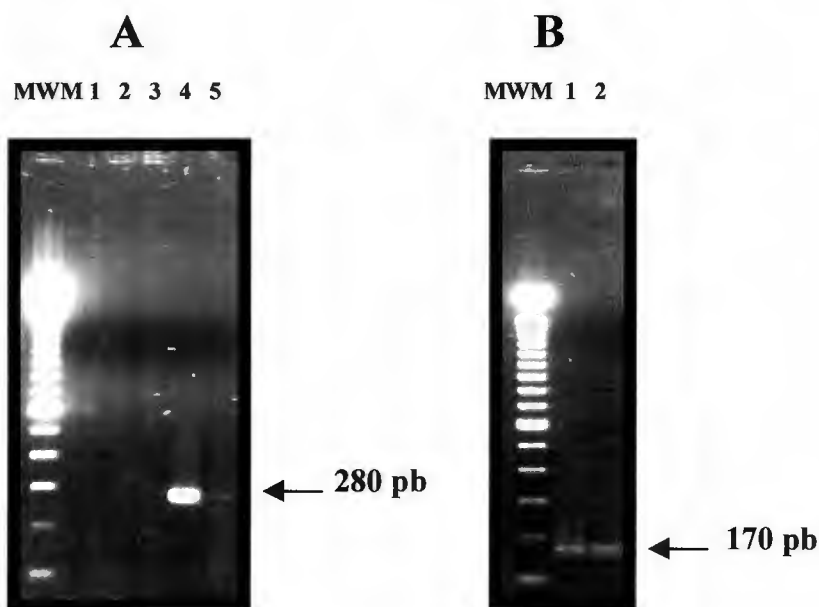


Fig. 24. Re-amplificações em *PCR*, utilizando-se apenas *primers* construídos para **FeSOD**. Combinações utilizadas: **A.** (*3'RACE*) 1: FSD1 x AdP, 2: FSD1 x FSD3r, 3: FSD2 x AdP, 4: FSD2 x FSD3r, 5: (*5'RACE*) FSD2 x FSD3r. **B.** 1: (*3'RACE*) FSD1 x FSD2r, 2: (*5'RACE*): FSD1 x FSD2r. MWM = padrão molecular (100 *bp DNA ladder*).

Subclonagem e sequenciamento: Os segmentos de FeSOD amplificados por *RACE/PCR* foram subclonados no vetor plasmideal *pGEM-T* e introduzidos em células de *E. coli*, da linhagem DH5 α . A eficiência de transformação esteve sempre em torno de 50 - 80%. A confirmação da inserção dos segmentos ao vetor e subsequente transformação bacteriana, foi obtida pela digestão de plasmídeos com a enzima de restrição EcoRI. Em geral, as digestões produziram duas bandas, uma referente ao vetor (3 kb) e outra ao segmento de DNA inserido, quando submetidas a eletroforese em gel de agarose 1,5 % (fig. 25).

Alguns clones produziram mais de um fragmento quando digeridos com EcoRI, cuja somatória dos tamanhos condiz com o tamanho do fragmento original, indicando a presença de sítios adicionais para EcoRI. Assim, com base nas diferenças de tamanho e número de fragmentos, oito clones contendo o fragmento de 280 pb e quatro clones contendo o de 170 pb foram selecionados para sequenciamento e análise.

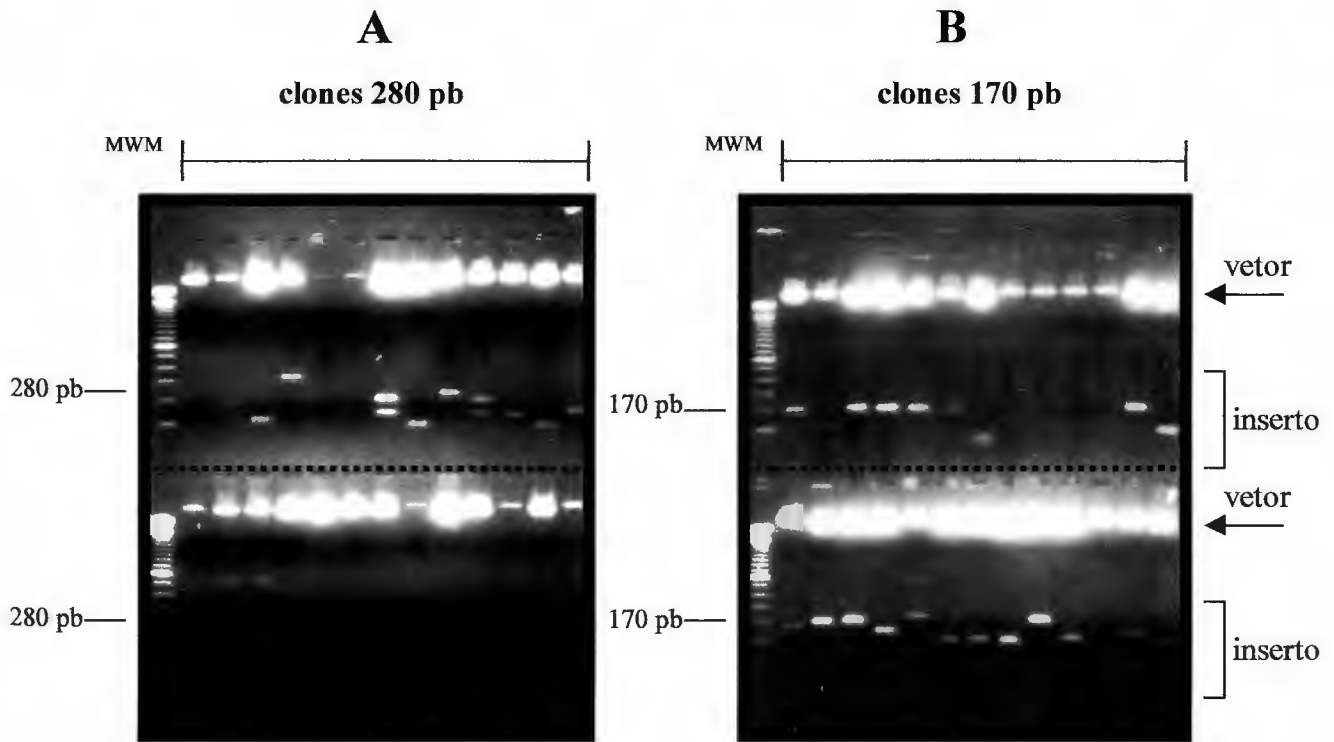


Fig. 25. **Subclonagem de produtos de PCR.** Clones contendo os segmentos de 280 pb (A) e 170 pb (B) foram submetidos a digestão com a enzima de restrição EcoRI, para liberação dos insertos do vetor e conseqüente confirmação da clonagem. MWM = padrão molecular (100 bp DNA ladder).

Estudo comparativo da seqüência parcial do cDNA de FeSOD de *G. polyedra*:

As seqüências dos segmentos clonados foram comparadas com seqüências protéicas catalogadas no *GeneBank*. Esta pesquisa foi realizada por uma busca de similaridade no banco de dados do *NCBI*, utilizando-se o programa *BlastX*. Este, traduz automaticamente a seqüência nucleotídica nas 6 fases de leitura e as compara com diferentes seqüências protéicas, indicando com quais proteínas o segmento gênico de interesse possui maior similaridade.

Dos clones contendo o segmento de 280 pb, quatro deles possuem seqüências idênticas, apresentando maior similaridade com FeSOD de uma cianobactéria, *Synechococcus sp* (76 %). O único gene clonado de FeSOD em algas, descrito até o momento, diz respeito à *Chlamydomonas reinhardtii*, uma alga verde unicelular. A similaridade encontrada entre os segmentos clonados de 280 pb e a FeSOD desta alga é de 77 %. Além disto, três dos quatro diferentes clones de 170 pb também apresentaram similaridade com FeSOD de uma cianobactéria, *P. boryanum* (83 %). A similaridade destes segmentos com a FeSOD de *C. reinhardtii* é de 70 % (fig. 26).

A seqüência deduzida de aminoácidos foi obtida pela tradução da seqüência *consensus* dos clones correlatos (fig. 27). Os segmentos de 170 e 280 pb representam seqüências adjacentes do gene de FeSOD, possuindo um segmento curto de *DNA* em comum. Desta forma, a somatória de ambos originou uma seqüência nucleotídica de 429 pb, cerca de 70 % da região codificadora (*ORF*) do gene para FeSOD. O estudo preliminar de homologia protéica, por análise filogenética, indica que a FeSOD de *G. polyedra* pode ter se originado a partir do mesmo ancestral das demais FeSOD cianobacterianas (fig. 28).

Fig. 26. Estudo de similaridade dos segmentos clonados de 280 e 170 pb com proteínas catalogadas no banco de dados do *GenBank*. Uma pesquisa foi realizada através do programa *BlastX*, encontrando-se uma alta similaridade com a proteína FeSOD, de cianobactérias.

Segmento de 280 pb:

sp|P18655|SODF_SYN7 **SUPEROXIDE DISMUTASE (FE)** >gi|79688|pir||S04423 superoxide dismutase (EC 1.15.1.1) (Fe) - ***Synechococcus sp*** Length = 201

Score = 137 bits (342), Expect = 2e-32
Identities = 62/93 (66%), **Positives = 72/93 (76%)**
Frame = +1

Query: 1 AQVWNHTFYWHSMKPGGGGAPHGKVAELIERDFGSYEEFATQFKAAGGGQFGSGWAWLV 180
AQ WNH+ FYW+ S+ KP GGGAP G +A+ 1 DFGS+ EF T+FK A QFGSGWAWLV
Sbjct: 74 AQAWNHS FYWNS 1 KPNGGGAPT GALADKIAADFGSFENFVTEFKQAAA TQFGSGWAWLV 133

Query: 181 KDGKLAITKTPNAETPLTEAGVTPLLTIDVWEH 279
+G L ITKT NA+TP+ G TPLLTIDVWEH
Sbjct: 134 DNGTLKITKTGNADTPIA H- GQTPLLTIDVWEH 165

pir||JC4611 superoxide dismutase (EC 1.15.1.1) (Fe) - *Chlamydomonas reinhardtii* >gi|726293 (U22416) **superoxide dismutase precursor** [***Chlamydomonas reinhardtii***] Length = 234

Score = 132 bits (330), Expect = 5e-31
Identities = 62/93 (66%), **Positives = 73/93 (77%)**, Gaps = 1/93 (1%)
Frame = +1

Query: 1 AQVWNHTFYWHSMKPGGGGAPHGKVAELIERDFGSYEEFATQFKAAGGGQFGSGWAWL-V 177
AQVWNHTF+W S MKP GGGAP G +AE I RDFGS ++F +FK AG QFGSGWAWL
Sbjct: 106 AQVWNHTF FWESMKPNGGGAPT GALAEAITRDFGSLDKFKKEFKQAGMTQFGSGWAWLNA 165

Query: 178 LKDGKLAITKTPNAET PLTEAGVTPLLTIDVWEH 279
K GKL+I+K+PNA P+ E G TP+LT+DVWEH
Sbjct: 166 DKTGKLSI SKSPNAVN PVVE GKIPILTVDVWEH 198

Segmento de 170 pb:

sp|P50061|SODF_PLEBO SUPEROXIDE DISMUTASE (FE) >gi|608558 (U17612) superoxide dismutase
[Plectonema boryanum] Length = 199

Score = 86.6 bits (211), Expect = 2e-17
 Identities = 35/56 (62%), **Positives = 47/56 (83%)**
 Frame = +1

Query: 1 EFHYGKHHNAYVTNLNKLIEGTDLANA PLEEIVKAAASNASKAGLFNNAQVWNHT 168
 ++HYGKHH AYVTNLNKL+EGT + + LE+++K + ++SK G+FNNAQVWNHT
 Sbjct: 26 DYHYGKHHAAYVTNLNKLVEGTPMESLSLEDVIKQSFG DSSKVGVFNNAQVWNHT 81

pir|JC4611 superoxide dismutase (EC 1.15.1.1) (Fe) - Chlamydomonas reinhardtii >gi|726293 (U22416)
superoxide dismutase precursor [Chlamydomonas reinhardtii] Length = 234

Score = 75.7 bits (183), Expect = 4e-14
 Identities = 34/56 (60%), **Positives = 40/56 (70%)**
 Frame = +1

Query: 1 EFH YGKHHNAYVT NLNKLIEGT DL ANAPLEEIVKAAASNASKAGLFNNAQVWNHT 168
 EFH +GKHH AYV N+NK + GT L LEEIV A+ +N +FNNAQVWNHT
 Sbjct: 57 EFHWGKHHRAYVDNMNKQVAGTPLDGKSLEEIVLASWNNQPTPVFNNAQVWNHT 112

Fig. 27. **Alinhamento das seqüências nucleotídicas dos segmentos clonados de 280 e 170 pb, referentes ao *cDNA* da FeSOD de *G. polyedra*.** As seqüências *consensus* dos respectivos clones encontram-se sublinhadas.

Clones de 280 pb:

Name: fs3280_5t7trim	Len: 280	Check: 9291	Weight: 1.00
Name: fs3280_d2t7trim	Len: 280	Check: 1580	Weight: 1.00
Name: fs3280_a2t7trim	Len: 280	Check: 8775	Weight: 1.00
Name: fs3280_2t7trim	Len: 280	Check: 9110	Weight: 1.00

	1	50
fs3280_5t7tr	GCCCAAGTCT GGAACCACAC CTTCTACTGG CATTTCGATGA AACCGGGCGG	
fs3280_d2t7tr	GCCCAAGTCT GGAACCACAC CTTCTACTGG CATTTCGATGA AACCGGGCGG	
fs3280_a2t7tr	GCCCAAGTCT GGAACCACAC CTTCTACTGG CATTTCGATGA AACCGGGCGG	
fs3280_2t7tr	GCCCAAGTCT GGAACCACAC CTTCTACTGG CATTTCGATGA AACCGGGCGG	
280 consensus	<u>GCCCAAGTCT GGAACCACAC CTTCTACTGG CATTTCGATGA AACCGGGCGG</u>	

	51	100
fs3280_5t7tr	CGGCGGCGCG CCGCACGGCA AAGTTGCCGA ACTGATCGAA CGTGATTTCG	
fs3280_d2t7tr	TGGCGGCGCG CCGCACGGCA AAGTTGCCGA ACTGATCGAA CGTGATTTCG	
fs3280_a2t7tr	CGGCGGCGCG CCGCACGGCA AAGTTGCCGA ACTGATCGAA CGTGATTTCG	
fs3280_2t7tr	CGGCGGCGCG CCGCACGGTA AAGTTGCCGA ACTGATCGAA CGTGATTTCG	
280 consensus	<u>CGGCGGCGCG CCGCACGGCA AAGTTGCCGA ACTGATCGAA CGTGATTTCG</u>	

	101	150
fs3280_5t7tr	GCTCTTACGA GGAATTCGCA ACTCAGTTCA AAGCGGCCGG CGGTGGCCAG	
fs3280_d2t7tr	GCTCTTACGA GGAATTCGCA ACTCAGTTCA AAGCGGCCGG CGGTGGCCAG	
fs3280_a2t7tr	GCTCTTGC GA GGAATTCGCA ACTCAGTTCA AAGCGGCCGG CGGTGGCCAG	
fs3280_2t7tr	GCTCTTACGA GGAATTCGCA ACTCAGTTCA AAGCGGCCGG CGGTGGCCAG	
280 consensus	<u>GCTCTTACGA GGAATTCGCA ACTCAGTTCA AAGCGGCCGG CGGTGGCCAG</u>	

	151	200
fs3280_5t7tr	TTCGGTTCTG GTTGGGCTTG GCTGGTCCTG AAAGATGGCA AGCTCGCCAT	
fs3280_d2t7tr	TTCGGTTCTG GTTGGGCTTG GCTGGTCCTG AAAGATGGCA AGCTCGCCAT	
fs3280_a2t7tr	TTCGGTTCTG GCTGGGCTTG GCTGGTCCTG AAAGATGGCA AGCTCGCCAT	
fs3280_2t7tr	TTCGGTTCTG GTTAGGCTTG GCTGGCCCTG AAAGATGGCA AGCTCGCCAT	
280 consensus	<u>TTCGGTTCTG GTTGGGCTTG GCTGGTCCTG AAAGATGGCA AGCTCGCCAT</u>	

	201	250
fs3280_5t7tr	CACAAAGACT CCGAATGCCG AGACCCCGCT GACGGAAGCT GGCGTGACGC	
fs3280_d2t7tr	CACAAAGACT CCGAATGCCG AGACCCCGCT GACGGAAGCT GGCGTGACGC	
fs3280_a2t7tr	CACAAAGACT CCGAATGCCG AGACCCCGCT GACGGAAGCT GGCGTGACGC	
fs3280_2t7tr	CACAAAGACT CCGAATGCCG AGACCCCGCT GACGGAAGCT GGCGTGACGC	
280 consensus	<u>CACAAAGACT CCGAATGCCG AGACCCCGCT GACGGAAGCT GGCGTGACGC</u>	

	251	280
fs3280_5t7tr	CGTTCTGAC GATTGATGTC TGGGAGCACGCA	
fs3280_d2t7tr	CGTTCTGAC GATTGATGTC TGGGAGCACGCA	
fs3280_a2t7tr	CGTTCTGAC GATTGATGTC TGGGAGCACGCA	
fs3280_2t7tr	CGTTCTGAC GATTGATGTC TGGGAGCACGCA	
280 consensus	<u>CGTTCTGAC GATTGATGTC TGGGAGCACGCA</u>	

Clones de 170 pb:

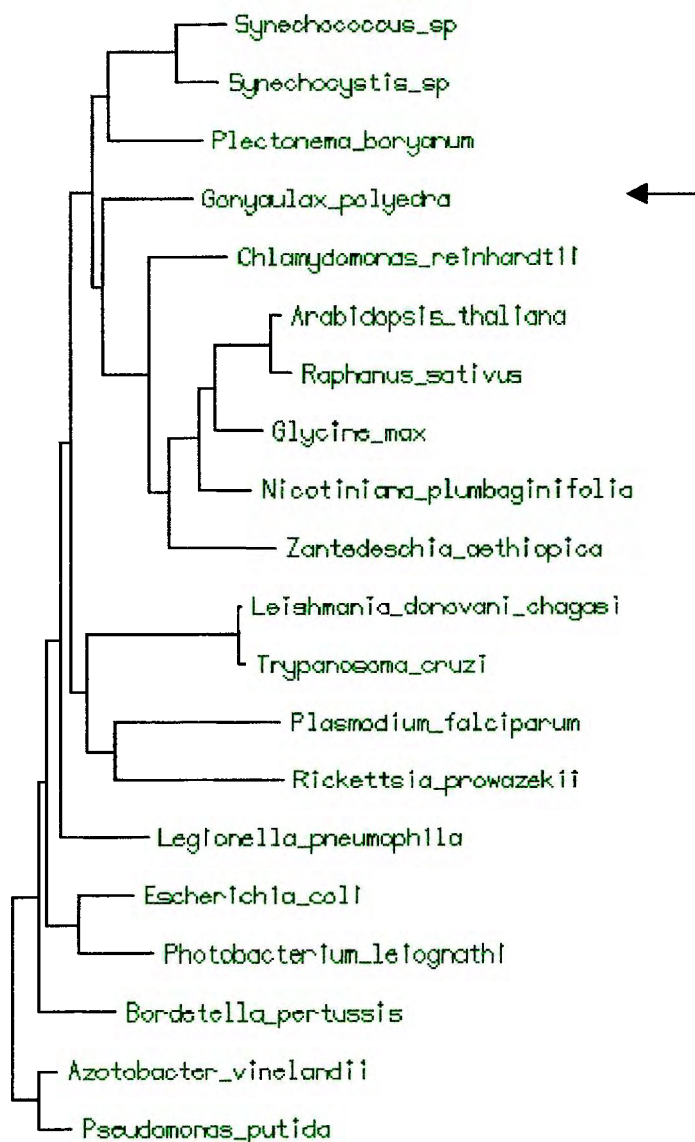
Name: fsod3170_csp6trim Len: 168 Check: 5559 Weight: 1.00
 Name: fsod5170_fsp6trim Len: 168 Check: 5559 Weight: 1.00
 Name: fsod5170_dsp6trim Len: 168 Check: 6008 Weight: 1.00

1 50
 fsod3170_csp GAATTTTCATT ACGGTAAACA TCACAACGCG TATGTGACCA ATCTGAACAA
 fsod5170_fsp GAATTTTCATT ACGGTAAACA TCACAACGCG TATGTGACCA ATCTGAACAA
 fsod5170_dsp GAGTTTCATT ACGGTAAACA TCACAACGCG TATGTGACCA ATCTGAACAA
170 consensus GAATTTTCATT ACGGTAAACA TCACAACGCG TATGTGACCA ATCTGAACAA

51 100
 fsod3170_csp ACTGATCGAG GGCACAGATC TCGCCAACGC TCCCCTGGAA GAAATCGTGA
 fsod5170_fsp ACTGATCGAG GGCACAGATC TCGCCAACGC TCCCCTGGAA GAAATCGTGA
 fsod5170_dsp ACTGATCGAG GGCACAGATC TCGCCAACGC TCCCCTGGAA GAAATCGTGA
170 consensus ACTGATCGAG GGCACAGATC TCGCCAACGC TCCCCTGGAA GAAATCGTGA

101 150
 fsod3170_csp AAGCCGCCGC GAGTAATGCT TCCAAAGCTG GTTTGTTCAA CAACGCCGCC
 fsod5170_fsp AAGCCGCCGC GAGTAATGCT TCCAAAGCTG GTTTGTTCAA CAACGCCGCC
 fsod5170_dsp AAGCCGCCGC GAGTGATGCT TCCAAAGCTG GTTTGTTCAA CAACGCCGCC
170 consensus AAGCCGCCGC GAGTAATGCT TCCAAAGCTG GTTTGTTCAA CAACGCCGCC

151 168
 fsod3170_csp CAAGTCTGGA ACCACACA
 fsod5170_fsp CAAGTCTGGA ACCACACA
 fsod5170_dsp CAAGTCTGGA ACCACACA
170 consensus CAAGTCTGGA ACCACACA

B *Filogenia molecular de FeSOD*

Testes de hibridação entre os segmentos de FeSOD clonados por PCR e ácidos nucleicos de *G. polyedra*: Amostras de RNA total de *G. polyedra* (1 - 10 µg) foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1,2 % e transferidas para uma membrana de nylon. Hibridações em *Northern blot*, utilizando-se cada um dos segmentos clonados de FeSOD como sondas moleculares, também revelaram sinais positivos, porém, somente em concentrações acima de 1 µg de RNA total (fig. 29). Marcações com as sondas de 170 e 280 pb revelaram uma banda em torno de 700 pb. A presença destes sinais positivos indica especificidade entre as sondas e os ácidos nucleicos de *G. polyedra*, cujo tamanho estimado das bandas condiz com o tamanho médio da região codificadora do gene de FeSOD (entre 650 pb a 1200pb).

Entretanto, estas hibridações positivas específicas entre ácidos nucleicos de *G. polyedra* e sondas homólogas de FeSOD não são obtidas facilmente, sob condições padrões de hibridação, sendo necessários ajustes metodológicos. Além disto, ampliações em PCR utilizando combinações mistas de *primers* específicos para FeSOD e *primers* universais inespecíficos, a partir de mRNA ou alíquotas de bibliotecas de cDNA de *G. polyedra*, produziram muitos produtos secundários, impossibilitando a clonagem completa do gene para FeSOD por esta metodologia (dado não mostrado). Estes resultados sugerem que a abundância de transcritos de FeSOD em *G. polyedra* seja muito baixa, dificultando a sua detecção. Em plantas por exemplo, é comum a FeSOD não ser detectada sob condições normais de cultivo, por esta não ser expressa constitutivamente (Van Camp *et al.* 1990). Contudo, pelo fato dos dois fragmentos de FeSOD amplificados majoritariamente (170 e 280 pb) possuírem alta similaridade com FeSOD de cianobactérias e da alga *C. reinhardtii* (>70%) e por produzirem sinais positivos específicos nas hibridações em *Northern blot*, acredita-se, portanto, que estes fragmentos representem seqüências gênicas codificadoras da FeSOD de *G. polyedra*.

4.4.2. Padrões de expressão

Estresse metálico: Os efeitos do estresse metálico, sobre a expressão da isoforma FeSOD, foram estudados em células de *G. polyedra* expostas a altas concentrações de metais (10,0 ppb Hg²⁺; 1,0 ppm Cd²⁺; 5,0 ppm Pb²⁺; e 0,25 ppm Cu²⁺) por 4 h. Análises por hibridações em *Northern blot* mostraram que os níveis de transcritos de FeSOD aumentam substancialmente em resposta ao tratamento com os metais poluentes (Hg²⁺, 90 %; Cd²⁺, 120 %; Pb²⁺, 130 %; Cu²⁺, 62 %), enquanto os níveis de *mRNA* para LBP (controle) não variaram significativamente, nas mesmas condições experimentais (fig. 30).

Análises quantitativas por *RT-PCR*, utilizando-se *primers* específicos, corroboraram os resultados anteriores revelando, também, um claro aumento na abundância dos transcritos de FeSOD durante estresse metálico. Os níveis de *mRNA* para FeSOD atingiram valores até 9 vezes maiores, sob tratamento com Pb²⁺ (fig. 31). Como controle, um segmento do gene para LBP foi amplificado a partir das mesmas amostras de *mRNA*. Análises densitométricas do gel mostraram um rendimento de amplificação de segmentos de LBP semelhante em todos os tratamentos experimentais, sugerindo que o aumento da transcrição de FeSOD é um efeito específico da exposição aos metais poluentes.

Estes resultados indicam um controle positivo da expressão de FeSOD de *G. polyedra*, sob as condições de estresse metálico adotadas. Como o estresse oxidativo em cloroplastos é um efeito relevante da exposição a metais neste dinoflagelado, o rápido aumento da expressão de enzimas antioxidantes como a FeSOD parece ser uma importante resposta adaptativa ao nível molecular. Em plantas, induções de SOD, envolvendo aumentos nos níveis de proteína e *mRNA*, têm sido correlacionadas com o aumento da resistência a diversas formas de estresse ambiental (Bowler *et al.* 1992, Amsellem *et al.* 1993, Gupta *et al.* 1993), sendo esta ativação modulada por fatores de transcrição redox-sensíveis.

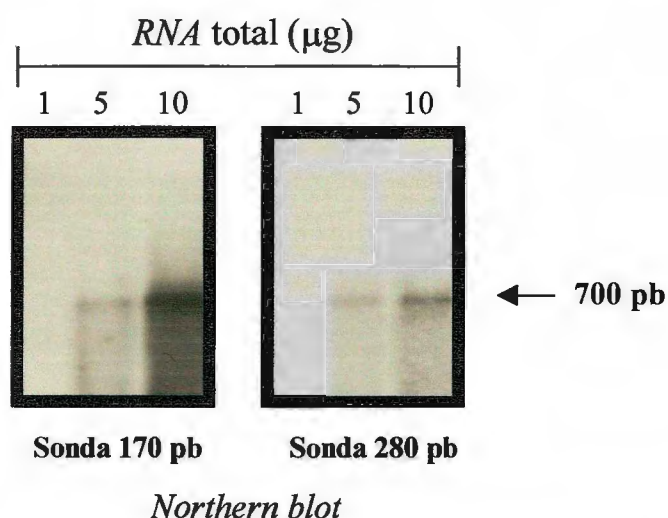


Fig. 29. Híbridações em *Northern blot* com *RNA* total de *G. polyedra*. Os segmentos clonados de 170 e 280 pb, referentes ao *cDNA* de FeSOD, foram marcados radioativamente e utilizados como sondas moleculares.

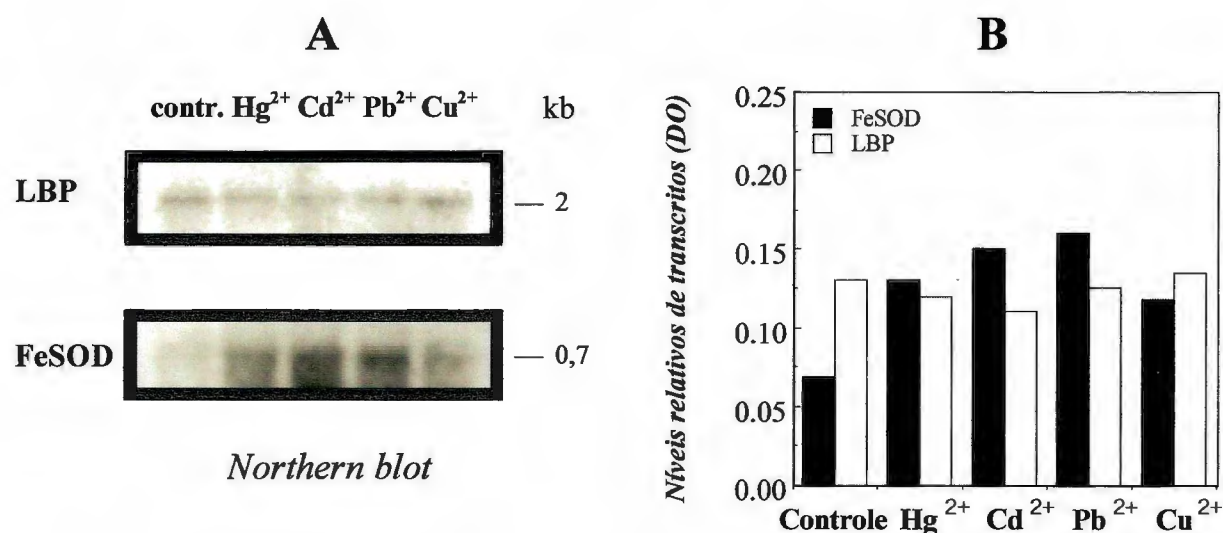


Fig 30. Aumento de transcritos de FeSOD por exposição a metais. A. Análises em *Northern blot* com *RNA* total (10 µg), extraído de células expostas a altas concentrações de metais (10 ppb Hg²⁺, 1 ppm Cd²⁺, 5 ppm Pb²⁺ e 0,25 ppm Cu²⁺), por 4 h. Segmentos dos genes para FeSOD e LBP (controle) foram utilizados como sondas moleculares homólogas. B. Análise densitométrica respectiva, revelando aumentos específicos na quantidade de transcritos de FeSOD.

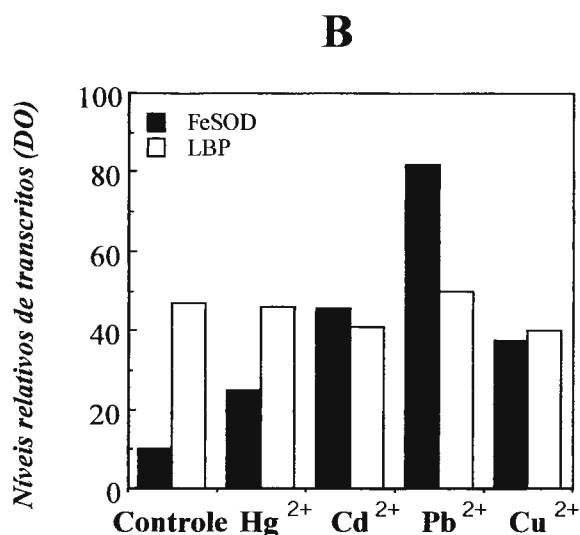
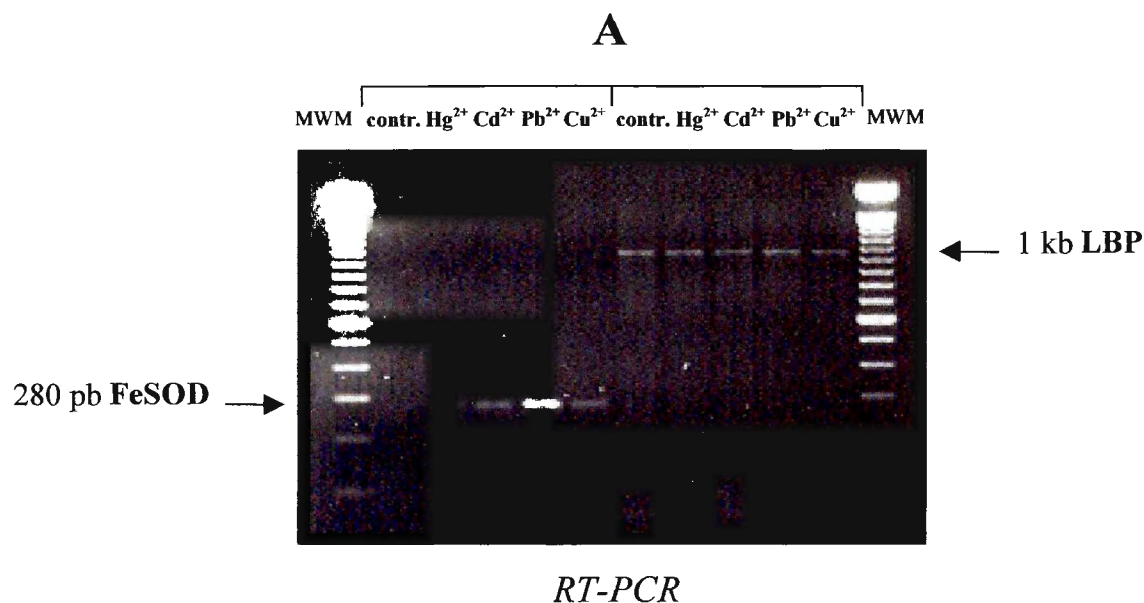


Fig 31. Quantificação de transcritos de FeSOD por *RT-PCR*. A. Gel de agarose 1,5 % corado com brometo de etídeo, mostrando segmentos amplificados com *primers* específicos para FeSOD e LBP (controle), a partir de *mRNA* (250 ng) extraído de células expostas a altas concentrações de metais (10 ppb Hg²⁺, 1 ppm Cd²⁺, 5 ppm Pb²⁺ e 0,25 ppm Cu²⁺), por 4 h. B. Análise densitométrica do respectivo gel, revelando aumentos específicos na quantidade de transcritos para FeSOD. MWM = padrão molecular (100 bp *DNA ladder*).

Expressão circadiana: Com o intuito de verificar se a oscilação diária de FeSOD em *G. polyedra* também é acompanhada de variações nos níveis de seus transcritos, hibridações em *Northern blot*, com sondas homólogas específicas, foram realizadas com amostras de *mRNA* extraídas ao longo do ciclo circadiano (fig. 32). Segundo as análises densitométricas, nenhuma variação significativa foi observada nos níveis diários de transcritos de FeSOD, sugerindo um controle de expressão diferenciado, pelo relógio circadiano.

Oscilações circadianas nos níveis de diferentes enzimas de *G. polyedra* têm sido descritas, como GAPDH, envolvida no metabolismo energético e LBP e luciferase, envolvidas na bioluminescência deste dinoflagelado (Morse *et al.*, 1989, Fagan *et al.* 1999). Apesar da regulação da ritmicidade de proteínas poder ocorrer aos níveis de transcrição, tradução e/ou modificações pós-traducionais, como reportado em *Neurospora crassa* e *Drosophila melanogaster* (Aronson *et al.* 1994, Garceau *et al.* 1997), aceita-se que o relógio circadiano de *G. polyedra* exerça o seu controle através da modulação da tradução de transcritos. Neste caso, assim como reportado para GAPDH, LBP e luciferase, é provável que a regulação circadiana da síntese de FeSOD também ocorra ao nível traducional, neste dinoflagelado.

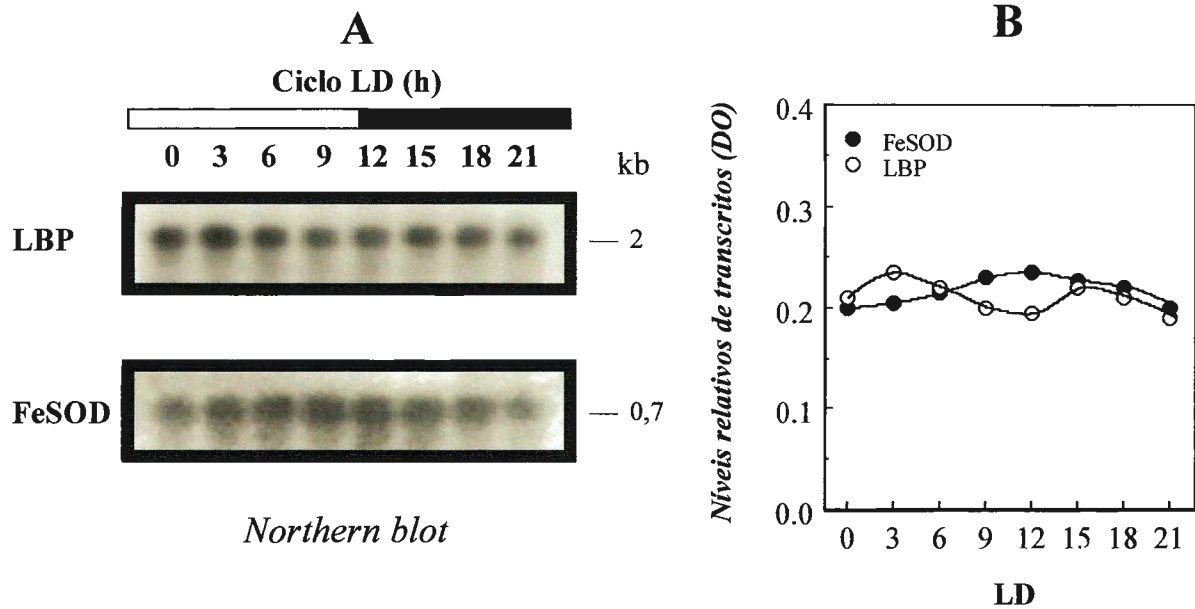


Fig 32. Níveis diários de transcritos de FeSOD. **A.** Análises em *Northern blot* com *mRNA* (1 μ g) extraído de células coletadas ao longo de 24 h, cultivadas sob ciclo LD 12:12 h. Segmentos dos genes para FeSOD e LBP (controle) foram utilizados como sondas moleculares homólogas. **B.** Análise densitométrica respectiva, revelando ausência de oscilações diárias significativas na quantidade de transcritos para FeSOD.

5. DISCUSSÃO

5.1. Efeitos do estresse metálico em *G. polyedra*

Algas unicelulares são essenciais para manutenção do equilíbrio ecológico em ecossistemas marinhos, pois exercem importantes funções como principais produtores primários, além de contribuírem para a oxigenação e ciclagem de nutrientes no ambiente marinho. Desta forma, ensaios toxicológicos com microalgas são relevantes à avaliação do potencial tóxico de poluentes, em ecossistemas marinhos (Walsh, 1988). Testes padrões de biotoxicidade avaliam os efeitos de substâncias químicas sobre o crescimento e viabilidade de representantes da biota, estabelecendo níveis máximos de tolerância para cada poluente. Estes estudos possuem uma grande importância na prevenção dos impactos de poluentes ambientais, através do estabelecimento de níveis limitantes de descarga de produtos químicos específicos no mar, tendo ampla aplicação em programas de monitoramento e gerenciamento ambiental.

Dinoflagelados, em particular, atuam como produtores primários ou consumidores na cadeia trófica, além de participarem de eventos de marés vermelhas. Apesar da grande importância ecológica e econômica dos dinoflagelados, poucos estudos de ecotoxicologia têm sido realizados com estes importantes componentes da cadeia trófica marinha. O presente trabalho representa o primeiro estudo comparativo dos efeitos tóxicos de diferentes metais poluentes e das respostas adaptativas ao estresse metálico, em um dinoflagelado bioluminescente. Em *G. polyedra*, os quatro metais poluentes avaliados, Hg^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , e Cu^{2+} , causaram aumentos significativos de mortalidade celular e formação de cistos assexuais, em concentrações relativamente baixas. Em geral, bioensaios com microalgas mostram que as concentrações de metais poluentes que inibem significativamente o crescimento celular variam de 0,5 - 500 ppb Hg^{2+} , 0,02 - 140 ppm Cd^{2+} , 0,2 - 250 ppm Pb^{2+} , e 0,1 - 7 ppm Cu^{2+} (Hollibaugh *et al.* 1980). As concentrações estimadas para

G. polyedra encontram-se próximas aos limites mínimos destes intervalos, indicando uma alta sensibilidade deste dinoflagelado aos metais avaliados. A sobrevivência celular a altas concentrações de metais pode estar relacionada, em parte, à rápida formação de cistos assexuais observada nos bioensaios. De fato, o encistamento de dinoflagelados é uma forma de resistência às condições ambientais desfavoráveis (Anderson *et al.* 1984). Em representantes de água doce como *Peridinium cinctum* e *Peridinium willey*, por exemplo, o encistamento é induzido por carência nutricional (Chapman & Pfister, 1995). Em *G. polyedra*, a formação de cistos também tem sido reportada por baixas temperaturas e tratamento com indoleaminas (Balzer & Hardeland, 1991, Behrmann & Hardeland, 1995).

As células encistadas em presença de Pb^{2+} e Cu^{2+} existiram, parcial ou completamente, quando cultivadas em meio livre de metais tóxicos, mostrando uma capacidade de recuperação celular. Entretanto, o mesmo não foi observado sob tratamento com os metais Hg^{2+} e Cd^{2+} , indicando efeitos tóxicos irreversíveis. Uma recuperação após exposição a Cu^{2+} também foi observada em outras duas espécies de dinoflagelados, *Amphidinium carterae* e *Prorocentrum micans* (Lage *et al.* 1994). Apesar dos efeitos algistáticos promovidos por Pb^{2+} e Cu^{2+} nas concentrações testadas, a escala de toxicidade encontrada para *G. polyedra* foi $Hg^{2+} > Cu^{2+} > Cd^{2+} > Pb^{2+}$, baseado nos respectivos valores de CE50.

No ambiente natural, organismos que habitam locais cronicamente poluídos são expostos a baixas concentrações de metais, sob longos períodos de exposição. Em outros casos, os organismos podem ser abruptamente expostos a altas concentrações de metais como, por exemplo, durante a descarga de efluentes em ambientes costeiros. Estas duas situações foram parcialmente simuladas em nossos experimentos, primeiramente pela exposição crônica de *G. polyedra* às concentrações subletais de metais e, posteriormente, por pulsos de exposição aguda, a altas concentrações. Sob tratamento agudo, o efeito mais

dramático foi a estimulação imediata da bioluminescência total e o aumento da frequência de *flashes* bioluminescentes. Sob condições crônicas, não foram observadas alterações expressivas no ritmo bioluminescente, indicando que o mecanismo de temporização celular não é significativamente afetado pela exposição a metais. Contudo, pequenos efeitos foram notados. As exposições a Hg^{2+} e Cu^{2+} , os dois primeiros metais na escala de toxicidade para *G. polyedra*, resultaram em amplitudes maiores e períodos mais curtos no ritmo de *glow* bioluminescente, enquanto Cd^{2+} e Pb^{2+} diminuíram a amplitude e prolongaram o período. A exposição crônica a Cu^{2+} também causou aumentos expressivos na frequência de *flashes* bioluminescentes, enquanto os tratamentos com os demais metais causaram um efeito ligeiramente oposto.

Estes efeitos variados, sobre os parâmetros bioluminescentes de *G. polyedra*, apontam diferenças no mecanismo de ação de cada metal poluente. Entretanto, sabe-se que íons de metais tóxicos são capazes de atravessar membranas por carreadores não-específicos de íons multivalentes, causando despolarização de membranas e acidificação do citoplasma (Cumming & Gregory, 1990). Metais pesados também podem causar alteração de funcionamento de membranas pela interação com íons Ca^{2+} , associados a fosfolipídeos de membrana (Green *et al.* 1980). No caso de *G. polyedra*, é provável que os quatro metais poluentes analisados também atuem sobre membranas vacuolares, uma vez que o aumento da frequência de *flashes* bioluminescentes é atribuído à estimulação de potenciais de ação, conduzidos na membrana que compõe os *scintillons*.

Os bioensaios de toxicidade conduzidos neste trabalho mostram, portanto, que *G. polyedra* possui um grande potencial como espécie indicadora dos efeitos de substâncias poluentes *in natura*. Como o encistamento está relacionado à dispersão e sobrevivência desta alga, a ocorrência de marés vermelhas, decorrentes de afloramentos desta espécie de dinoflagelado, poderia ser um forte indício da contaminação do ambiente marinho por metais tóxicos.

Estes afloramentos de *G. polyedra* podem ser facilmente detectados durante o dia, devido à forte coloração vermelho-alaranjada resultante da alta concentração celular de pigmentos carotenóides nesta alga, especialmente de peridina (Pinto *et al.* 2000). Durante a noite, a detecção seria facilitada pela grande emissão de luz natural por células de *G. polyedra*, decorrente de aumentos na frequência de seus *flashes* bioluminescentes, por estimulação química. Além disto, este fenômeno pode ser observado sob níveis de contaminação relativamente baixos, uma vez que esta espécie de dinoflagelado se mostrou altamente sensível aos efeitos de metais poluentes, quando comparada a outras espécies de algas unicelulares. Como *G. polyedra* possui distribuição cosmopolita, a aplicação desta alga em programas de monitoramento ambiental poderia, ainda, ser estendida a várias regiões geográficas .

5.2. Modulação de antioxidantes cloroplásticos

Estudos recentes têm demonstrado que o estresse oxidativo é um importante mediador da toxicidade de metais poluentes (Stohs & Bagchi, 1995, Patra & Panda, 1998). De fato, a manutenção de uma alta capacidade antioxidante celular tem sido correlacionada com o aumento da resistência a diferentes formas de estresse ambiental, incluindo o estresse metálico (Sinha *et al.* 1997, Dat *et al.* 1998, Thomas *et al.* 1999). A indução de antioxidantes é, portanto, uma importante resposta adaptativa que garante a manutenção da atividade biológica durante adversidades ambientais. Apesar dos inúmeros estudos nesta área, pouco se sabe sobre a resposta antioxidante de defesa ao nível subcelular, particularmente em cloroplastos de microalgas marinhas. Por este motivo, abordou-se também o estudo dos efeitos de metais poluentes sobre o balanço oxidativo nos cloroplastos de *G. polyedra*, de acordo com os modelos crônico e agudo de estresse metálico, estipulados nos bioensaios de toxicidade.

Os resultados indicaram diferentes respostas antioxidantes conforme o tipo de metal e modelo de estresse aplicado. Sob exposição crônica, aumentos nas atividades das enzimas SOD e Apx e nos níveis de peridinina foram encontrados. Peridinina é um importante carotenóide encontrado somente em certas espécies de dinoflagelados, pertencente ao complexo hidrossolúvel *PCP*, localizado no PSII (Knoetzel & Rensing, 1990). Apesar da sua capacidade de suprimir $O_2 (^1\Delta g)$ *in vitro* (Pinto *et al.* 2000), a principal função biológica da peridinina parece ser a captação de energia luminosa nos cloroplastos. Neste sentido, a diminuição do nível de peridinina em células de *G. polyedra*, sob exposição crônica a metais, pode ser uma estratégia de controle do fluxo de elétrons entre PSII e PSI, prevenindo a formação excessiva de $O_2^{\bullet -}$ pela Reação de Mehler e danos foto-oxidativos subsequentes (Foyer, 1996). Isto explicaria, também, a constância dos níveis basais de β -caroteno, encontrada sob as mesmas condições experimentais. Contudo, uma redução da captação de energia luminosa, durante o estresse metálico crônico, poderia também acarretar em redução da capacidade fotossintética. De fato, a fotossíntese é provavelmente o processo metabólico mais sensível ao estresse metálico nos vegetais. Inibições de crescimento, clorose e necrose de tecidos são sintomas comuns da intoxicação por metais (Murthy *et al.* 1989, Murthy & Mohanty, 1991, Gonzales *et al.* 1998).

Uma resposta antioxidante diferente foi encontrada sob estresse metálico agudo. Enquanto apenas pequenas modificações foram detectadas na atividade enzimática e nos níveis de peridinina, o conteúdo de β -caroteno celular dobrou, sugerindo uma maior necessidade de proteção contra danos foto-oxidativos. De fato, modulações de pigmentos carotenóides são consideradas especialmente importantes na prevenção de danos foto-oxidativos, em plantas submetidas a alta intensidade luminosa ou baixas temperaturas (Ramalho *et al.* 1998, Garcia-Plasaola *et al.* 1999). Durante o estresse metálico, o fluxo de elétrons nos

cloroplastos pode ser interrompido, favorecendo a produção de ERO. Neste sentido, a manutenção de altos níveis de β -caroteno também deve contribuir para a atenuação dos efeitos da fotoinibição, no modelo de estresse aplicado.

As distintas respostas antioxidantes observadas nos modelos crônico e agudo, parecem estar relacionadas à intensidade do estresse aplicado. De acordo com os resultados de consumo de O_2 e poder redutor, diferentes estados oxidativos celulares são atingidos durante os modelos crônico e agudo de estresse metálico. Assim, a indução de antioxidantes cloroplásticos resultaria de um processo de aclimação ao aumento paulatino da concentração de ERO, durante o tratamento crônico. Por outro lado, o consumo exacerbado de O_2 e menor poder redutor, encontrados nas células sob estresse agudo, sugerem uma geração abrupta de ERO, durante um curto intervalo de tempo, excedendo a capacidade antioxidante celular. É sabido que a regeneração de ascorbato nos cloroplastos ocorre pelo ciclo ascorbato-glutationa, dependente de GSH e NADPH, uma vez que não há transporte ativo de ascorbato para o interior desta organela (Halliwell & Gutteridge, 1999). Além dos baixos níveis de GSH encontrados durante o tratamento agudo, níveis limitantes de NADPH e rápida oxidação de ascorbato podem também ocorrer nestas condições. Desta forma, a menor disponibilidade de ascorbato poderia estar limitando a atividade da enzima Apx. Como consequência, o acúmulo de H_2O_2 passaria a inibir a atividade da FeSOD. Nestas mesmas condições, o β -caroteno parece ser menos sensível e sua indução poderia compensar, em parte, a inativação enzimática pelos níveis elevados de ERO. Uma resposta antioxidante similar foi observada na alga *Ceratophyllum demersum*, exposta a Cu^{2+} . Níveis aumentados de antioxidantes foram detectados durante exposição a concentrações subletais do metal, enquanto uma capacidade antioxidante reduzida e letalidade foram observadas a doses mais altas de Cu^{2+} , em decorrência de insultos oxidativos (Devi & Prasad, 1998).

Se tal estado pró-oxidativo é instalado pelo modelo agudo de estresse metálico, nos cloroplastos de *G. polyedra*, conseqüentes danos oxidativos seriam esperados. De fato, níveis aumentados de dienos conjugados e carbonilas protéicas foram detectados, predominantemente, em cloroplastos de células mantidas sob tratamento agudo com metais, indicando eventos de peroxidação lipídica e oxidação protéica.

Os distúrbios do equilíbrio oxidativo cloroplástico são também dependentes das propriedades intrínsecas de cada metal tóxico, conforme evidenciado nas figuras 11 e 12. Dentre os metais poluentes avaliados, Cu^{2+} e Pb^{2+} foram os que promoveram os efeitos mais distintos. Embora tóxico a altas doses, o Cu^{2+} é um micronutriente essencial para a atividade de muitas enzimas como a própria SOD e, por isto, seus efeitos podem ser atenuados durante condições crônicas. Por outro lado, o tratamento com Pb^{2+} foi o mais severo, causando lesões oxidativas mesmo em concentrações subletais. A peroxidação de membranas é um efeito conhecido do tratamento com Pb^{2+} (Quinlan *et al.* 1988). Os efeitos indiretos deste metal são baseados na estimulação de peroxidação lipídica Fe^{3+} -dependente e alteração no empacotamento de lipídeos de membrana (Adonaylo & Oteiza, 1999). Neste contexto, o aumento de oxidação protéica, verificado em células tratadas com Pb^{2+} , poderia resultar do ataque de produtos intermediários de peroxidação lipídica, como radicais alquil peroxil e aldeídos reativos.

Assim, a instalação de um estado pró-oxidante em cloroplastos de *G. polyedra* depende da intensidade do estresse e das propriedades de cada metal. Sob tais condições adversas, a modulação de antioxidantes cloroplásticos parece ser uma importante estratégia adaptativa deste dinoflagelado, ao estresse metálico. De acordo com o modelo proposto, a resposta antioxidante a curto prazo inclui o aumento de fotoproteção, por altos níveis de β -caroteno, enquanto a manutenção de uma alta capacidade antioxidante e menor captação

de energia luminosa, devido a níveis reduzidos de peridina, são componentes da resposta a longo prazo.

5.3. Isoformas de SOD e padrões de indução enzimática

A indução de enzimas antioxidantes é um importante componente da resposta antioxidante, observada em cloroplastos de *G. polyedra* sob estresse metálico. Neste trabalho, os estudos foram concentrados na enzima SOD por esta representar a primeira linha de defesa antioxidante, além de ser amplamente utilizada como indicador bioquímico de estresse oxidativo, em diferentes circunstâncias (Tsang *et al.* 1991, Davidson & Pearson, 1996). Aumentos dose-dependentes na atividade total da SOD foram observados em células de *G. polyedra*, expostas a diferentes concentrações de metais poluentes. Estas respostas de atividade são rápidas, ocorrendo nas primeiras horas de exposição deste dinoflagelado aos metais. Análises complementares demonstraram que FeSOD e MnSOD são as isoformas induzidas. Estas mesmas isoformas apresentam ainda uma oscilação circadiana, com máximo de atividade no início do período diurno. Em ambos os casos, as induções de atividade enzimática são acompanhadas de variações nos níveis de proteína.

A resistência a diversas formas de estresse ambiental tem sido correlacionada a aumentos nos níveis de SOD (Bowler *et al.* 1991, Van Camp *et al.* 1994). Em microalgas, induções de atividade de SOD têm sido descritas sob exposição a radiação UV-B em *Chlorella vulgaris* e *Symbiodinium sp.* e a metais tóxicos em *Ditylum brightwellii* e *Tetraselmis gracilis* (Lesser & Shick, 1989, Rijstenbil *et al.* 1994, Malanga & Puntarulo, 1995, Okamoto *et al.* 1996). As isoformas de SOD também sofrem indução diferenciada conforme o tipo de estresse ambiental, embora o processo de regulação seja ainda incerto. Perfis eletroforéticos alterados em géis de atividade de SOD e surgimento de novas isoenzimas de CuZnSOD foram detectados em peixes habitantes de áreas litorâneas contaminadas por metais, no Oceano Atlântico (Pedrajas *et al.* 1993,

Rodriguez-Ariza *et al.* 1994). Em plantas, induções de FeSOD cloroplástica ocorrem sob exposição ao herbicida paraquat e durante fotoinibição provocada por alta intensidade luminosa, enquanto induções específicas de CuZnSOD são verificadas sob tratamento com alumínio, desidratação e estresse osmótico (Hassan & Scandalios, 1990, Guan & Scandalios, 1998, Richards *et al.* 1998).

As induções de FeSOD e MnSOD, observadas em *G. polyedra*, também indicam que isoformas específicas de SOD podem ser utilizadas como biomarcadores de estresse ambiental e de áreas poluídas por metais. Provavelmente, a indução destas isoformas possui um importante papel protetor nos sítios subcelulares mais sensíveis ao tratamento metálico, onde o estresse oxidativo é instalado. De acordo com os resultados apresentados, a exposição de *G. polyedra* a metais poluentes é capaz de promover um estresse oxidativo em seus cloroplastos, particularmente sob tratamento agudo. Além disto, a oscilação circadiana da SOD, verificada neste dinoflagelado, é provavelmente uma adaptação que previne a instalação de um estado pró-oxidativo em seus cloroplastos. Nesta microalga, os níveis máximos de SOD coincidem com o pico de atividade fotossintética, quando as condições são de intensa utilização de energia luminosa e produção de altas concentrações de oxigênio (Samuelson *et al.* 1983). Neste sentido, a manutenção do equilíbrio oxidativo nos cloroplastos de *G. polyedra* parece ser um fator determinante para a sua aptidão, perante adversidades ambientais.

5.4. Expressão diferencial de FeSOD: regulação redox *versus* controle circadiano

Os padrões de indução de isoformas de SOD, por exposição a metais, indicam uma resposta sítio-específica em *G. polyedra*. Por este motivo, os estudos foram voltados aos aspectos moleculares desta resposta adaptativa. A partir de uma otimização das técnicas de purificação de cloroplastos e ensaios enzimáticos em géis de poliacrilamida, a alta atividade de SOD detectada nestas

organelas, durante exposição a metais, foi atribuída à FeSOD. A presença desta isoforma em *G. polyedra* foi posteriormente confirmada pela clonagem parcial do *cDNA* codificador de FeSOD neste dinoflagelado, por técnicas baseadas em *PCR*. Análises preliminares de filogenia molecular indicaram uma alta similaridade com a FeSOD de cianobactérias. De acordo com a teoria endosimbiótica, cianobactérias e ancestrais dos cloroplastos modernos são filogeneticamente próximos, implicando em uma alta homologia entre proteínas cloroplásticas e proteínas correlatas, em cianobactérias. A análise de distância filogenética apresentada neste trabalho separa a FeSOD cianobacteriana, cloroplástica e citossólica em três grupos cladísticos distintos. O grupo citossólico inclui, predominantemente, seqüências de protobactérias e eucariontes heterotróficos primitivos, enquanto a grande proximidade entre os grupos de FeSOD cianobacteriana e plastídica dá suporte à origem endosimbiótica dos cloroplastos. Embora situada dentro do grupo plastídico, a FeSOD de *G. polyedra*, assim como a da microalga *C. reinhardtii*, não forma um grupo monofilético com a FeSOD de plantas vasculares, aparentando ter se originado a partir de um ancestral comum à FeSOD cianobacteriana.

Uma importante revelação deste trabalho diz respeito aos diferentes níveis de regulação observados para FeSOD de *G. polyedra*, conforme a condição ambiental. Segundo o modelo de estresse metálico adotado, induções de FeSOD incluem aumentos específicos nos seus níveis de *mRNA*, indicando um controle transcricional positivo, pelo tratamento com metais poluentes.

Embora a indução de isoformas de SOD, acompanhadas por aumentos em seus transcritos, seja bem documentada durante o estresse oxidativo em diversos organismos (Hérouart *et al.* 1993, Bueno *et al.* 1998, Franco *et al.* 1999), este é o primeiro relato da indução de uma isoforma cloroplástica por metais, em dinoflagelados marinhos e também a primeira evidência de regulação gênica, ao nível transcricional, em *G. polyedra*. Em contrapartida, a ritmicidade diária, detectada nos níveis de FeSOD deste dinoflagelado, não é

acompanhada de oscilações nos seus níveis de *mRNA*, os quais permanecem constantes durante todo o ciclo circadiano. Esta observação corrobora a hipótese de uma regulação traducional predominante, no controle de fenômenos rítmicos pelo relógio circadiano de *G. polyedra*.

O estresse oxidativo é um conhecido indutor da transcrição de genes específicos de defesa, embora o mecanismo pelo qual a modulação da expressão destes genes ocorra, ainda esteja em debate. Este tipo de resposta adaptativa tem sido bem caracterizada em procariontes, nos quais genes codificadores de enzimas antioxidantes como a SOD são ativados por fatores de transcrição como os do sistema *Sox R/S* (Ding & Demple, 1997). Em eucariontes, a transdução da mensagem externa até o núcleo e conseqüente ativação gênica, também pode ocorrer por sinalização redox. As atividades de fatores de transcrição como o AP-1, formado pelo produto dos proto-oncogenes *c-fos* e *c-jun*, NF- κ B, envolvido em diversos processos celulares, e γ AP-1, importante na defesa contra estresse oxidativo em leveduras, sofrem modulações por oxidantes como o H₂O₂. (Flohé, *et al.* 1997, Kuge *et al.* 1997, Suzuki *et al.* 1997).

Estudos sobre a regulação gênica de SOD em eucariontes têm sido predominantemente centrados na isoforma mitocondrial. Em mamíferos, o gene para MnSOD é caracterizado pela ausência dos elementos promotores clássicos *TATA box* e *CAAT box*. Entretanto, a região promotora é rica em bases guanina e citosina (*GC box*), apresentando múltiplos sítios reconhecidos pelo fator de transcrição Sp1, uma proteína do tipo *zinc finger*. O gene para MnSOD humana, por exemplo, possui sete sítios para Sp1, organizados em repetições em *tandem* na sua região promotora. A expressão da MnSOD humana é regulada pelo fator Sp1, o qual atua como promotor basal e também como ativador transcricional (Yeh *et al.* 1998). Entretanto, outros fatores de transcrição, como NF- κ B e C/EBP, também estão envolvidos em sua regulação,

dependendo do estímulo externo (Jones *et al.* 1997). Em contraste, a análise da seqüência da extremidade 5' do gene para MnSOD em *Drosophila*, revela a presença de ambas *TATA* e *CAAT box*, localizadas nas posições -24 e -72, respectivamente. A região promotora apresenta, ainda, 11 sítios reconhecidos pelo fator de transcrição AP-1, além de outros sítios de ligação a diferentes fatores de transcrição. Estudos com moscas mutantes, deficientes no gene *rl* (codificador de MAP quinase), indicam que a expressão do gene para MnSOD em *Drosophila* pode ser controlada pela via de transdução de sinal de MAP quinase, a qual facilita a formação de AP-1, ativando assim a transcrição gênica (Duttaroy *et al.* 1997).

Em vegetais, estes mecanismos são menos esclarecidos, embora estudos de regulação da SOD em plantas submetidas a estresse ambiental também indiquem um controle por modulação redox (Scandalios, 1997). Grande parte dos estudos sobre a regulação de SOD em vegetais tem sido realizada em milho, onde todas as isoformas de SOD, incluindo as presentes nos cloroplastos, são codificadas no núcleo. Acredita-se que o gene da FeSOD cloroplástica era originalmente codificado na própria organela e posteriormente, ao longo da evolução, foi transferido ao núcleo celular (Van Camp *et al.* 1990). Em tabaco, a GSH tem sido apontada como ativadora da expressão de diferentes genes estresse-responsivos, incluindo a CuZnSOD citossólica (Van Camp *et al.* 1997). De fato, a ligação de fatores de transcrição à região promotora, na extremidade 5' de genes alvos, pode ser afetada por oxidações de grupos tiólicos em resíduos de cisteína localizados no sítio de ligação com o *DNA* (Hidalgo *et al.* 1997, Arrigo, 1999). Devido à alta sensibilidade destes grupos tiólicos, o estado redox celular pode modular positiva ou negativamente a atividade de fatores de transcrição e, portanto, acarretar em indução ou repressão de expressão gênica (Griffith, 1999). Em *G. polyedra*, a regulação transcricional da FeSOD poderia ser modulada por um mecanismo semelhante, uma vez que o estado redox celular indicado pela razão $GSH/(GSH + 2 GSSG)$

é alterado significativamente conforme o modelo de estresse metálico aplicado, embora estudos mais específicos devam ser conduzidos para se verificar esta hipótese.

Trabalhos recentes mostraram que a expressão de MnSOD também pode ser regulada ao nível pós-transcricional, através do controle da tradução ou estabilidade de *mRNA*. Em ratos, a tradução da MnSOD é aumentada pela ligação de uma proteína redox sensível à região não codificadora da extremidade 3' do *mRNA* (Chung *et al.* 1998). Segundo este modelo, a expressão gênica é ativada traducionalmente, de forma pouco usual, provavelmente por facilitar a formação do complexo de pré-iniciação. Em geral, mecanismos de regulação traducional envolvem a ligação de proteínas específicas (*trans-acting factor*) em seqüências específicas no *mRNA* (*cis-acting factor*) impedindo a tradução protéica, e não ativando sua tradução. Um mecanismo de controle semelhante tem sido proposto para a regulação circadiana de proteínas em *G. polyedra*. Morse e colaboradores (1989), demonstraram que os níveis de *mRNA* para a LBP permanecem constantes durante todo o período em que a proteína oscila circadianamente. Este controle temporal envolve fatores protéicos *trans-acting* que reprimem a tradução da LBP, pela interação com seqüências regulatórias *cis-acting* na extremidade 3' do seu *mRNA*, ligando-se de forma circadiana a ele (Mittag *et al.* 1994). Este modelo de regulação é observado, não só em *G. polyedra*, mas também em outras algas unicelulares como *C. reinhardtii*, sugerindo uma conservação deste mecanismo de regulação circadiana ao longo da evolução (Mittag, 1996). Estudos recentes sugerem também o envolvimento de quinases e fosfatases no controle da ritmicidade de processos celulares de *G. polyedra* (Comolli *et al.* 1996, Asano *et al.* 1998).

Embora a regulação circadiana da FeSOD, ao contrário da sua ativação transcricional pela exposição a metais, seja controlada traducionalmente, o exato mecanismo regulatório é incerto, podendo ser semelhante ao modelo

descrito para a LBP, ou ainda, ocorrer pelo bloqueio do alongamento traducional, conforme sugerido recentemente para a isoforma cloroplástica da GAPDH (Fagan *et al.* 1999). Contudo, o fato da FeSOD poder ser regulada em diferentes níveis enfatiza, ainda mais, a complexidade dos mecanismos envolvidos na resposta bioquímica e molecular ao estresse oxidativo, em *G. polyedra*. Neste sentido, a elucidação da seqüência completa do gene para FeSOD deste dinoflagelado e o estudo da sua estrutura gênica, são essenciais para a compreensão dos elementos envolvidos em sua regulação.

BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo

6. CONCLUSÕES

As informações obtidas nesta tese permitem concluir que os metais poluentes avaliados são extremamente tóxicos ao dinoflagelado marinho *G. polyedra*, causando decréscimos de sobrevivência celular a concentrações relativamente baixas. A escala de toxicidade encontrada, com base nos respectivos valores de CE50, foi $Hg^{2+} > Cu^{2+} > Cd^{2+} > Pb^{2+}$. O encistamento e a bioluminescência deste dinoflagelado são também estimulados pelo tratamento com os metais tóxicos, apontando um grande potencial de aplicação desta alga em programas de monitoramento ambiental.

A resistência de *G. polyedra* ao estresse metálico envolve respostas celulares, como o encistamento e também subcelulares, como a indução de antioxidantes cloroplásticos. A exposição aguda aos metais tóxicos é capaz de instalar um estresse oxidativo nos cloroplastos desta alga. Apesar do concomitante aumento dos níveis de β -caroteno, o estresse metálico agudo é deletério, sobrepujando o sistema de defesa antioxidante cloroplástico. Entretanto, sob estresse metálico crônico de curto prazo, a manutenção de alta capacidade antioxidante é uma estratégia relevante na atenuação das lesões oxidativas em lipídeos e proteínas, prevenindo possíveis danos estruturais e perda de funções cloroplásticas. Esta modulação de antioxidantes cloroplásticos sugere que a adaptação bioquímica de *G. polyedra* inclui respostas rápidas e específicas ao sítio subcelular onde o estresse oxidativo é instalado. Um importante componente desta resposta adaptativa é a indução da enzima SOD, em particular, o aumento imediato da expressão da FeSOD cloroplástica. Em *G. polyedra*, induções de FeSOD podem ocorrer pela regulação transcricional positiva, em presença de metais tóxicos, ou pelo controle circadiano traducional desta isoforma. Estas diferentes possibilidades de regulação protéica, reveladas neste trabalho, salientam a importância da FeSOD na manutenção do equilíbrio oxidativo cloroplástico durante adversidades ambientais e lançam novas perspectivas a respeito do controle de expressão gênica em *G. polyedra*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abrahams, L.V. & Townsend, L.D. (1993). Bioluminescence of dinoflagellates: a test of the burglar alarm hypothesis. *Ecology* 74: 258-260.
- Adonaylo, V.N. & Oteiza, P.I. (1999). Lead intoxication: antioxidant defenses and oxidative damage in rat brain. *Toxicology* 135: 77-85.
- Amsellem, Z., Jansen, M.A.K., Driesenaar, A.R.J. & Gressel, J. (1993). Developmental variability of photooxidative stress tolerance in paraquat - resistant *Coryza*. *Plant. Physiol.* 103: 1097-1106.
- Anderson, D.M., Kulis, D.M. & Binder, B.J. (1984). Sexuality and cyst formation in the dinoflagellate *Gonyaulax tamarensis*: cyst yield in batch cultures. *J. Phycol.* 20: 418-425.
- Aronson, B.D., Johnson, K.A., Loros, J.J. & Dunlap, J.C. (1994). Negative feedback defining a circadian clock: autoregulation of the clock gene frequency. *Science* 263: 1578-1584.
- Arrigo, A.P. (1999). Gene expression and the thiol redox state. *Free Rad. Biol. Med.* 27: 936-944.
- Asada, K. & Takahashi, M. (1987). Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. *In* Kyle, D.J., Osmond, C. & Arntzen, C.J. [Eds.]. *Photoinhibition*. Elsevier, NY.
- Asada, K., Kanematsu, S., Okaka, S. & Hayakawa, T. (1980). Phylogenetic distribution of three types of superoxide dismutases in organisms and in cell organelles. *In*: Bannister, J.V. & Hill, H.A.O. [Eds.]. *Chemical and biochemical aspects of superoxide and superoxide dismutase*. Elsevier/North Holland, NY.
- Asano, C.S. (1998). Mecanismos controladores do ritmo endógeno diário da atividade da superóxido dismutase na alga unicelular marinha *Gonyaulax polyedra* Stein. Tese de Doutorado. Instituto de Química, Universidade de São Paulo.

- Asano, C.S., Okamoto, O.K. & Colepicolo, P. (1998). Diurnal patterns of incorporation of [γ 32 P]-ATP in isolated chloroplasts from *G. polyedra*. *Biol. Rhythm Res.* 29: 488-493.
- Asano, C.S., Okamoto, O.K., Hollnagel, H.C., Stringher, C., Oliveira, M.C. & Colepicolo, P. (1995). The activity of superoxide dismutase oscillates in the marine dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*. *Ci. Cul.* 48: 64-67.
- Balzer, I. & Hardeland, R. (1991). Photoperiodism and effects of indoleamines in a unicellular alga, *Gonyaulax polyedra*. *Science* 253: 795-797.
- Beauchamp, C. & Fridovich, I. (1971). Superoxide dismutase: improved assays and assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 44 : 276-82.
- Behrman, G. & Hardeland, R. (1995). Ultrastructural characterization of asexual cysts of *Gonyaulax polyedra* Stein (Dinoflagellata). *Protoplasma* 185: 22-27.
- Bohnert, H.J., Nelson, D.E. & Jensen, R.G. (1995). Adaptations to environmental stresses. *The Plant Cell* 7: 1099-1111.
- Bowler, C., Slooten, L., Vandenbrander, S., DeRycke, R., Botterma, J., Sybesma, C., Van Montagu, M. & Inzé, D. (1991). Manganese superoxide dismutase can reduce cellular damage mediated by oxygen radicals in transgenic plants. *EMBO J.* 10: 1723-1732.
- Bowler, C., Van Montagu, M. & Inzé, D. (1992). Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43: 83-116.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-54.
- Broda, H., Gooch, .D., Taylor, W., Aiuto, N. & Hastings, J.W. (1986). Acquisition of circadian bioluminescence data in *Gonyaulax* and an effect of the measurement procedure on the period of the rhythm. *J. Biol. Rhythm* 1: 251-263.
- Bueno, P., Piqueras, A., Kurepa, J., Savouré, A., Verbruggen, N., Van Montagu, M. & Inzé, D. (1998). Expression of antioxidant enzymes in response to

- abscisic acid and high osmoticum in tobacco BY-2 cell cultures. *Plant Sci.* 138: 27-34.
- Burdon, R.H. (1996). Control of cell proliferation by reactive oxygen species. *Biochem. Soc. Trans.* 24: 1028-1032.
- Chapman, A.D. & Pfister, L.A. (1995). The effects of temperature and nitrogen on the encystment and growth of the fresh water dinoflagellates *Peridinium cinctum* and *Peridinium willey* in culture (Dinophyceae). *J. Phycol.* 31: 355-359.
- Chung, D.J., Wright, A.E. & Clerch, L.B. (1998). The 3' untranslated region of manganese superoxide dismutase RNA contains a translational enhancer element. *Biochemistry* 37: 16298-16306.
- Colepicolo P., Camarero V.C. & Hastings J.W. (1992). A circadian rhythm in the activity of superoxide dismutase in the photosynthetic alga *Gonyaulax polyedra*. *Chronobiol. Int.* 9: 266-268.
- Comolli, J., Taylor, W., Rehman, J. & Hastings, J.W. (1996). Inhibitors of serine/threonine phosphoprotein phosphatases alter circadian properties in *Gonyaulax polyedra*. *Plant Physiol.* 111: 285-291.
- Cumming, J.R. & Gregory, J.T. (1990). Mechanisms of metal tolerance in plants: physiological adaptations for exclusion of metal ions from the cytoplasm. *In*: Alsher, R.G. & Cumming, J.R. [Eds.]. *Stress responses in plants: adaptation and acclimation mechanisms*. Wiley-Liss, NY.
- Dat, J.F., Foyer, C.H. & Scott, I. (1998). Changes in salicylic acid and antioxidants during induced thermotolerance in mustard seedlings. *Plant Physiol.* 118: 1455-1461.
- Davison, I.R. & Pearson, G.A. (1996). Stress tolerance in intertidal seaweeds. *J. Phycol.* 32: 197-211.
- DeJesus, M.D., Tabatabai, F. & Chapman, D.J. (1989). Taxonomic distribution of CuZn-superoxide dismutase in green algae and its phylogenetic importance. *J. Phycol.* 25: 767-772.

- Desjardins, M. & Morse, D. (1993). The polypeptide components of scintillons, the bioluminescent organelles of the dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*. *Biochem. Cell Biol.* 71: 176-182.
- Devi, S.R. & Prasad, M.N.V. (1998). Copper toxicity in *Ceratophyllum demersum* L. (Coontail), a free floating macrophyte: response of antioxidant enzymes and antioxidants. *Plant Sci.* 138: 157-165.
- Di Mascio, P., Hollnagel, H.C., Sperana, M. & Colepicolo, P. (1995). Diurnal rhythm of β -carotene in the photosynthetic alga *Gonyaulax polyedra*. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 376: 287-301.
- Ding, H. & Demple, B. (1997). In vivo kinetics of a redox regulated transcriptional switch. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 8445-8449.
- Duttaroy, A., Parkes, T., Emtage, P., Kirby, K., Gabreille, L., Boulianne, G.L., Wang, X., Hilliker, A.J. & Phillips, J.P. (1997). The manganese superoxide dismutase gene of *Drosophila*: structure, expression, and evidence for regulation by MAP kinase. *DNA Cell Biol.* 16: 391-399.
- Elstner, E.F., Wagner, G.A. & Schutz, W. (1988). Activated oxygen in green plants in relation to stress situations. *Curr. Topics Plant Biochem. Physiol.* 7: 159-187.
- Fagan, T., Morse, D. & Hastings, J. W. (1999). Circadian synthesis of a nuclear-encoded chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in the dinoflagellate *Gonyaulax polyedra* is translationally controlled. *Biochemistry* 38: 7689-7695.
- Farber, J.L., Kyle, M.E. & Coleman, J.B. (1990). Biology of disease. Mechanisms of cell injury by activated oxygen species. *Lab. Invest.* 62: 670-678.
- Floh e, L., Brigelius-Floh e, R., Saliou, C., Traber, M.G., & Packer, L. (1997). Redox regulation of NF-kappa B activation. *Free Rad. Biol. Med.* 22: 1115-1126.

- Fogel, M. & Hastings, J.W. (1972). Bioluminescence: mechanism and mode of control of scintillon activity. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 69: 690-693.
- Foyer, C.H. (1996). Free radical processes in plants. *Biochem. Soc. Trans.* 24: 427-433.
- Franco, A.A., Odom, R.S. & Rando, T.A. (1999). Regulation of antioxidant enzyme gene expression in response to oxidative stress and during differentiation of mouse skeletal muscle. *Free Rad. Biol. Med.* 27: 1122-1132.
- Freeman, B.A. & Crapo, J.D. (1982). Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab. Invest.* 47: 412-426.
- Fridovich, I. (1974). Superoxide dismutases. *Adv. Enzymol.* 41: 35-97.
- Fridovich, I. (1982). Superoxide dismutases in biology and medicine. *In: Pathology of oxygen.* Academic Press, N.Y.
- Fridovich, I. (1986). Superoxide dismutases. *Adv. Enzymol.* 58: 61-97.
- Fridovich, I. (1997). Superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$), superoxide dismutases, and related matters. *J. Biol. Chem.* 250: 18515-18517.
- Fritz, L., Morse, D. & Hastings, J.W. (1990). The circadian bioluminescence rhythm of *Gonyaulax* is related to daily variations in the number of light emitting organelles. *J. Cell Sci.* 95: 321-32.
- Garceau, N.Y., Liu, Y., Loros, J.J. & Dunlap, J.C. (1997). Alternative initiation of translation and time-specific phosphorylation yield multiple form of the essential clock protein frequency. *Cell* 89: 469-476.
- García-Plazaola, J.I., Artetxe, V. & Becerril, J.M. (1999). Diurnal changes in antioxidant and carotenoid composition in the mediterranean sclerophyll tree *Quercus ilex* (L) during winter. *Plant Sci.* 143: 125-133
- Gibbs, S. (1981). The chloroplasts of some algal groups may have evolved from endosymbiotic eukaryotic algae. *Ann. NY Acad. Sci.* 361: 193-208.

- Gonzales, A. Steffen, K.L. & Lynch, J.P. (1998). Light and excess manganese. Implications for oxidative stress in common bean. *Plant Physiol.* 118: 493-504.
- Green, D.E., Fry, M. & Blondin, G. (1980). Phospholipids as the molecular instruments of ion and solute transport in biological membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 257261.
- Griffith, O.W. (1999). Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Rad. Biol. Med.* 27: 922-935.
- Grill, E. & Winnacker, E.L. (1985). Phytochelatins: the principal heavy-metal complexing peptides of higher plants. *Science* 230: 674-676.
- Guan, L. & Scandalios, J.G. (1998). Two structurally similar maize cytosolic superoxide dismutase genes, *sod4* and *sod4A*, respond differentially to abscisic acid and high osmoticum. *Plant Physiol.* 117: 217-224.
- Guillard, R. & Ryther, J. (1962). Studies on marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleveland). *Can. J. Microbiol.* 8: 229-39.
- Gupta, A.S., Webb, R.P., Holaday, A.S. & Allen, R.D. (1993). Overexpression of superoxide dismutase protects plants from oxidative stress. *Plant Physiol.* 103: 1067-1073.
- Halliwell, B. & Gutteridge, J.M.C. (1999). *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3rd ed., Oxford University Press, NY.
- Hamilton, N.A., Russo, R.C. & Thurston, R.V. (1978). Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environ. Sci. Technol.* 12: 417-421.
- Hassan, H.M. & Scandalios, J.G. (1990). Superoxide dismutase in aerobic organisms. In: Alscher, R.G. & Cumming, J.R. [Eds]. *Stress responses in plants: adaptational and acclimation mechanisms*. Wiley-Liss, New York, NY.

- Hassan, H.M. (1988). Biosynthesis and regulation of superoxide dismutases. *Free Rad. Biol. Med.* 5: 377-385.
- Hastings, J.W. & Sweeney, B.M. (1958). A persistent diurnal rhythm of luminescence in *Gonyaulax polyedra*. *Biol. Bull.* 115: 440-458.
- Hastings, J.W., Astrachan, L. & Sweeney, B.M. (1961). A persistent daily rhythm in photosynthesis. *J. Gen. Physiol.* 45: 69-76.
- Hérouart, D., Van Montagu, M. & Inzé, D. (1993). Redox-activated expression of the cytosolic copper-zinc superoxide dismutase gene in *Nicotiniana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 3108-3112.
- Herzog, M. & Maroteaux, L. (1986). Dinoflagellate 17S rRNA sequence inferred from the gene sequence: evolutionary implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 8644-8648.
- Hidalgo, E., Ding, H. & Demple, B. (1997). Redox signal transduction: mutations shifting [2Fe-2S] centers of the soxR sensor-regulator to the oxidized form. *Cell* 88: 121-129.
- Hofmann, E., Wrench, P.M., Sharples, F.P., Hiller, R.G., Welte, W. & Diederich, K. (1996). Structural basis of light harvesting by carotenoids: peridinin-chlorophyll-proteins from *Amphidinium carterae*. *Science* 272: 1788-1791.
- Hollibaugh, J.T., Seibert, D.L.R. & Thomas, W.H. (1980). A comparison of the acute toxicities of ten heavy metals to phytoplankton from Saanich Inlet, BC, Canada. *Estuar. Coast Mar. Sci.* 10: 93-105.
- Hollnagel H.C., Di Mascio P., Asano C.S., Okamoto O.K., Stringher C.G., Oliveira M.C. & Colepicolo P. (1996). The effect of light on the biosynthesis of beta-carotene and superoxide dismutase activity in the photosynthetic alga *Gonyaulax polyedra*. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 29:105-10.
- Holm-Hansen, O. (1969). Algae: amounts of DNA and carbon in single cells. *Science* 163: 87-88.
- Homma, K. & Hastings, J.W. (1989). Cell growth kinetics, division asymmetry, and volume control at division in the marine dinoflagellate *Gonyaulax*

- polyedra*: a model of circadian clock control of the cell cycle. *J. Cell Sci.* 92: 303-318.
- Hugget, R.J., Kimerle, R.A., Mehrle Jr., P.M. & Bergman, H.L. (1992). Biomarkers. Biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress. Lewis Publishers, MI.
- Jamal, I.S. & Sprowls, J.J. (1987). Effects of cadmium and dietary selenium on cytoplasmic and mitochondrial antioxidant defense systems in the heart of rats fed with high dietary copper. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 87: 102-110.
- Jones, P.L., Ping, D. & Boss, J.M. (1997). Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 β regulate the murine manganese superoxide dismutase gene through a complex intronic enhancer involving C/EBP- β and NF- κ B. *Mol. Cell. Biol.* 17: 6970-6981.
- Khan, A.U. & Wilson, T. (1995). Reactive oxygen species as cellular messengers. *Chemistry & Biology* 2: 437-445.
- Kim, E.J., Chung, H.J., Suh, B., Hah, Y.C. & Roe, J.H. (1998). Expression and regulation of the sodF gene encoding iron and zinc-containing superoxide dismutase in *Streptomyces coelicolor* Muller. *J. Bacteriol.* 180: 2014-2020.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Molec. Evol.* 16: 111-120.
- Knoetzel, J. & Rensing, L. (1990). Characterization of the photosynthetic apparatus from the marine dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*. I. Pigment and polypeptide composition of the pigment-protein complexes. *J. Plant Physiol.* 136: 271-279.
- Kostic, M.M., Ognjanovic, B., Dimitrijevic, S., Zikic, R.V., Stajn, A., Rosic, G.D. & Zivkovic, R.V. (1993). Cadmium-induced changes of antioxidant and metabolic status in red blood cells of rats: in vivo effects. *Eur. J. Haematol.* 51: 86 - 92.

- Krinsky, N.I. (1989). Antioxidant functions of carotenoids. *Free Radic. Biol. Med.* 7: 617-635.
- Kuge, S., Jones, N. & Nomoto, A. (1997). Regulation of γ AP-1 nuclear localization in response to oxidative stress. *EMBO J.* 16: 1710-1720.
- Kwiatowski, J. (1987). Comparison of chloroplast and cytosolic Cu, Zn superoxide dismutase isozymes from tomato in relation to superoxide dismutase evolution. *Curr. Top. Biol. Med. Res.* 15: 121-139.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lage, O.M., Parente, A.M., Soares, H.M.V.M., Vasconcelos, M.T.S.D. & Salema, R. (1994). Some effects of copper on the dinoflagellates *Amphidinium carterae* and *Prorocentrum micans* in batch culture. *Eur. J. Phycol.* 29: 253-260.
- Le, Q.H., Markovic, P., Hastings, J.W., Jovine, R.V.M. & Morse, D. (1997). Structure and organization of the peridinin chlorophyll protein gene in *Gonyaulax polyedra*. *Mol. Gen. Genetics* 255: 595-604.
- Lesser, M.P. & Shick, J.M. (1989). Effects of irradiance and ultraviolet radiation on photoadaptation in zooxanthellae of *Aiptasia pallida*: primary production, photoinhibition, and enzymic defenses against oxygen toxicity. *Mar. Biol.* 102: 243-255.
- Li, L. & Hastings, J.W. (1998). The structure and organization of the *Gonyaulax polyedra* luciferase gene. *Plant Mol. Biol.* 36: 275-284.
- Malanga, G. & Puntarulo, S. (1995). Oxidative stress and antioxidant content in *Chlorella vulgaris* after exposure to ultraviolet-B radiation. *Physiol. Plant.* 94: 672-679.
- McCord, J.M. & Fridovich, I. (1968). The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.* 243: 5753-60.

- Mittag, M., Li, L. & Hastings, J.W. (1998). The mRNA level of the circadian regulated *Gonyaulax* luciferase remains constant over the cycle. *Chronobiol. Int.* 15: 93-98.
- Mittag, M. (1996). Conserved circadian elements in phylogenetically diverse algae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 14401-14404.
- Mittag, M., Lee, D.H. & Hastings, J.W. (1994). Circadian expression of the luciferin binding protein correlates with the binding of a protein to the 3' untranslated region of its mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 5257-5261.
- Monteiro, H.P., Bechara, E.J.H. & Abdalla, D.S.P. (1991). Free radicals involvement in neurological porphyrias and lead poisoning. *Mol. Cell. Biochem.* 103: 73-83.
- Morse, D., Fritz, L. & Hastings, J.W. (1990). What is the clock? Translational regulation of circadian bioluminescence. *Trends in Biochem.* 15: 262-265.
- Morse, D., Milos, P.M., Roux, E. & Hastings, J.W. (1989). Circadian regulation of bioluminescence in *Gonyaulax* involves translational control. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 172-176.
- Murphy, M.E. & Kehrer, J.P. (1989). Oxidation state of tissue thiol groups and content of protein carbonyl groups in chickens with inherited muscular dystrophy. *Biochem J.* 260: 359-364.
- Murthy, S.D.S. & Mohanty, P. (1991). Mercury induces alteration of energy transfer in phycobilisome by selectively affecting the pigment protein, phycocyanin, in the cyanobacterium, *Spirulina platensis*. *Plant Cell Physiol.* 32: 231-237.
- Murthy, S.D.S., Sabat, S.C. & Mohanty, P. (1989). Mercury-induced inhibition of photosystem II activity and changes in the emission of fluorescence from phycobilisomes in intact cells of the cyanobacterium, *Spirulina platensis*. *Plant Cell Physiol.* 30: 1153-1157.
- Nakano, Y. & Asada, K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 22: 867-880.

- Okamoto, O.K., Asano, C.S., Aidar, E. & Colepicolo, P. (1996). Effects of cadmium on growth and superoxide dismutase activity of the marine microalga *Tetraselmis gracilis*. *J. Phycol.* 32: 74-79.
- Patra, J. & Panda, B.B. (1998). A comparison of biochemical responses to oxidative stress and metal stress in seedlings of Barley, *Hordeum vulgare*. *Environ. Poll.* 101: 99-105.
- Pedrajas, R.J., Peinado, J. & López-Barea, J. (1993). Purification of CuZn-Superoxide dismutase isoenzymes from fish liver: appearance of new isoforms as a consequence of pollution. *Free Rad. Res. Commun.* 19: 29-41.
- Perl-Treves, R. & Galun E. (1991). The tomato Cu-Zn superoxide dismutase genes are developmentally regulated and respond to light and stress. *Plant Mol. Biol.* 17: 745-760.
- Pinto, E., Catalani, L.H., Lopes, N.P., DiMascio, P. & Colepicolo, P. (2000). Peridinin as the major biological carotenoid quencher of singlet oxygen in *Gonyaulax polyedra*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 268: 496-500.
- Prosser, L.D. (1986). *Adaptational biology: molecules to organisms*. Wiley-Interscience, NY.
- Puget, K. & Michelson, M. (1974). Isolation of a new copper containing superoxide dismutase bacteriocuprein. *Biochem. biophys. Res. Commun.* 58: 830-838.
- Quinlan, G.J., Halliwell, B., Moorhouse, C.P. & Gutteridge, J.M.C. (1988). Action of lead (II) and aluminium (III) ions on iron-stimulated lipid peroxidation in liposomes, erythrocytes and rat liver microsomal fractions. *Biochim. Biophys. Acta* 962: 196-200.
- Ramalho, C.B., Hastings, J.W. & Colepicolo, P. (1995). Circadian oscillation of nitrate reductase activity in *Gonyaulax polyedra* is due to changes in cellular protein levels. *Plant Physiol.* 107: 225-231.
- Ramalho, J.C., Campos, P.S., Teixeira, M. & Nunes, M.A. (1998). Nitrogen dependent changes in antioxidant system and in fatty acid composition of

- chloroplast membranes from *Coffea arabica* L. plants submitted to high irradiance. *Plant Sci.* 135: 115-124.
- Rice-Evans, C.A., Diplock, A.T. & Symons, M.C.R. (1991). Techniques in free radical research. *In*: Burdon, R.H. & Van Knippenberg, P.H. [Eds.]. Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. Elsevier, Amsterdam.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J. & Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad. Biol. Med.* 20: 933-956.
- Richards, K.D., Schott, E.J., Sharma, Y.K., Davis, K.R. & Gardner, R.C. (1998). Aluminium induces oxidative stress genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 116: 409-418.
- Rietveld, W.J. (1996). General introduction to chronobiology. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 19: 63-70.
- Rijstenbil, J.W., Derkesen, J.W.M., Gerringa, L.J.A., Poortvliet, T.C.W., Sandee, A., Van Der Berg, M., Van Drie, J. & Wijnholds, J.A. (1994). Oxidative stress induced by copper: defense and damage in the marine planktonic diatom *Ditylum brightwellii*, grown in continuous cultures with high and low zinc levels. *Mar. Biol.* 119: 583-590.
- Rizzo, P.J. (1991). The enigma of the dinoflagellate chromosome. *J. Protozool.* 38: 246-252.
- Robinson, J. & Cooper, J.M. (1970). Method of determining oxygen concentrations in biological media, suitable for calibration of the oxygen electrode. *Anal. Biochem.* 33: 390-399.
- Rodriguez-Ariza, A., Dourado, G., Navas, J.I., Pueyo, C. & Lopez-Barea, J. (1994). Pro-mutagen activation by fish liver as a biomarker of littoral pollution. *Environ. Mol. Mutagen.* 24: 116-123.

- Roenneberg, T. & Hastings, J.W. (1991). Are the effects of light on the phase and period of the *Gonyaulax* clock mediated by different pathways? *Photochem. Photobiol.* 53: 525-533.
- Saitou, N. & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molec. Biol. Evol.* 4: 406-425.
- Salin, M.L. (1987). Toxic oxygen species and protective system of the chloroplast. *Physiol. Plant.* 72: 681-689.
- Salovsky, P., Shopova, V., Dancheva, V. & Marev, R. (1992). Changes in antioxidant lung protection after single intra-tracheal cadmium acetate instillation in rats. *Hum. Exp. Toxicol.* 11: 117 - 122.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.
- Samuelson, G. Sweeney, B.M., Matlick, H.A. & Prezelin, B.B. (1983). Changes in photosystem II account for the circadian rhythm in photosynthesis in *Gonyaulax polyedra*. *Plant Physiol.* 73: 329-331.
- Saunders, G.W., Hill, D.R.A., Sexton, J.P. & Andersen, R.A. (1997). Small-subunit ribosomal RNA sequence from selected dinoflagellates: testing classical evolutionary hypothesis with molecular systematic methods. *Pl. Syst. Evol.* 11: 237-259.
- Sausser, K.R., Liu, J.K. & Wong, T.Y. (1997). Identification of a copper-sensitive ascorbate peroxidase in the unicellular green alga *Selenastrum capricornutum*. *Biometals* 10: 163-168.
- Scandalios, J.G. (1997). Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.
- Sies, H. (1993). Strategies of antioxidant defense. *Eur. J. Biochem.* 215: 213-219.
- Sies, H. (1999). Glutathione and its role in cellular functions. *Free Rad. Biol. Med.* 27: 916-921.

- Sinha, S. Gupta, M. & Chandra, P. (1997). Oxidative stress induced by iron in *Hydrilla verticillata* (i.f.) Royle: response of antioxidants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 38: 286-291.
- Steidinger, K.A. (1993). Some taxonomic and biologic aspects of toxic dinoflagellates. In: Falconer, I.R. [Ed.]. Algal toxins in seafood and drinking water, Academic Press, London.
- Steinman, H.M. & Ely, B. (1990). Copper-zinc superoxide dismutase of *Caulobacter crescentus*: cloning, sequencing, and mapping of the gene and periplasmic location of the enzyme. *J. Bacteriol.* 172: 2901-2910.
- Steinman, H.M. (1982). Copper-zinc superoxide dismutase from *Caulobacter crescentus* CB15. A novel bacteriocuprein form of the enzyme. *J. Biol. Chem.* 257: 10283-10293.
- Steinman, H.M. (1985). Bacteriocuprein superoxide dismutases in pseudomonads. *J. Bacteriol.* 162: 1255-1266.
- Stohs, S.J. & Bagchi, D. (1995). Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic. Biol. Med.* 18: 321-336.
- Suzuki, Y.J, Forman, H.J. & Sevanian, A. (1997). Oxidants as stimulators of signal transduction. *Free Rad. Biol. Med.* 22: 269-285.
- Thomas, D.J., Thomas, J.B., Prier, S.D., Nasso, N.E. & Herbert, S.K. (1999). Iron superoxide dismutase protects against chilling damage in the cyanobacterium *Synechococcus species* PCC7942. *Plant Physiol.* 120: 275-282.
- Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4350-4354.
- Trevors, T.J., Stratton, W.G. & Gadd, M.G. (1986). Cadmium transport, resistance and toxicity in bacteria, algae and fungi. *Can. J. Microbiol.* 32:447-464.

- Tsang, E.W., Bowler, C., Herouart, D., VanCamp, W., Vilarroel, R., Genetello, C., VanMontagu, M. & Inzé, D. (1991). Differential regulation of superoxide dismutases in plant exposed to environmental stress. *Plant Cell* 3: 783-792.
- Tschiersch, H. & Ohmann, E. (1993). Photoinhibition in *Euglena gracilis*: involvement of reactive oxygen species. *Planta (Berl.)* 191: 316-323.
- Van Assche, F. & Clijsters, H. (1990). Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant Cell Environ.* 13: 195-206.
- Van Camp, W., Bowler, C., Vilarroel, R. Tsang, E.W.T., Van Montagu, M. & Inzé, D. (1990). Characterization of iron superoxide dismutase cDNAs from plants obtained by genetic complementation in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 9903-9907.
- Van Camp, W., Capiou, K., Van Montagu, M., Inzé, D. & Sloaten, L. (1996). Enhancement of oxidative stress tolerance in transgenic tobacco plants overproducing Fe-superoxide dismutase in chloroplasts. *Plant Physiol.* 112: 1703-1714.
- Van Camp, W., Inzé, D. & Van Montagu, M. (1997). The regulation and function of tobacco superoxide dismutases. *Free Rad. Biol. Med.* 21: 515-520.
- Van Camp, W., Willekens, H., Bowler, C., Van Montagu, M., Inzé, D., Reupold-Popp, P., Sandermann, H.Jr. & Langebartels, C. (1994). Elevated levels of superoxide dismutase protect transgenic plants against ozone damage. *Biotechnology* 12: 165-168.
- Vangronsveld, J. & Clijsters, H. (1994). Toxic effects of metals. *In*: Farago, M.E. [Ed.]. *Plants and the chemical elements: biochemistry, uptake, tolerance and toxicity*. VCH, Weinheim, Germany.
- Walsh, G.E. (1988). Principles of toxicity testing with marine unicellular algae. *Environ. Toxicol. Chem.* 7: 979-987.
- White, A.W. & Lewis, C.M. (1982). Resting cysts of the toxic dinoflagellate *Gonyaulax excavata* in Bay of Fundy sediments. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 39: 1185-1194.

- Wilson, T. & Hastings, J.W. (1998). Bioluminescence. *Annu. Rev. Cell Devel. Biol.* 14: 197-230.
- Yeh, C. Wan, X.S. & Clair, D.K.St. (1998). Transcriptional regulation of the 5' proximal promoter of the human manganese superoxide dismutase gene. *DNA Cell Biol.* 17: 921-930.
- Youn, H.D., Kim, E.J., Roe, J.H., Hah, Y.C. & Kang, S.O. (1996). A novel nickel-containing superoxide dismutase from *Streptomyces* spp. *Biochem. J.* 318: 889-896.
- Zhong, Z., Troll, W., Koenig, K.L. & Frenkel, K. (1990). Carcinogenic sulfide salts of nickel and cadmium induce H₂O₂ formation by human polymorphonuclear leukocytes. *Cancer Res.* 50: 7564-7570.