AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

ESTUDO DA RESPOSTA DO CARAMUJO BIOMPHALARIA GLABRATA (SAY, 1818) FRENTE A ESTÍMULOS AMBIENTAIS ESTRESSORES, COM ENFOQUE NA PROTEÍNA HSP70

REBECA DA SILVA CANTINHA

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Doutor em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Aplicações

Orientadora:
Profa. Dra. Sueli Ivone Borrely

São Paulo
2012

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

ESTUDO DA RESPOSTA DO CARAMUJO *BIOMPHALARIA GLABRATA* (SAY, 1818) FRENTE A ESTÍMULOS AMBIENTAIS ESTRESSORES, COM ENFOQUE NA PROTEÍNA HSP70

REBECA DA SILVA CANTINHA

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutor em Ciências na área de Tecnologia Nuclear – Aplicações.

Orientadora: Dra. Sueli Ivone Borrely

Co-orientadora: Dra. Eliana Nakano

São Paulo

2012

Ó profundidade das riquezas, tanto da sabedoria, como da ciência de Deus! Quão insondáveis são os seus juízos, e quão inescrutáveis os seus caminhos! Porque quem compreendeu a mente do Senhor? Ou quem foi seu conselheiro? Ou quem lhe deu primeiro a ele, para que lhe seja recompensado? Porque dele e por ele, e para ele, são todas as coisas; glória, pois, a ele eternamente. Amém.

(Bíblia - Romanos 11:33-36)

AGRADECIMENTOS

A **Deus** pelos milagres de cada dia, e especialmente ao longo destes quatro anos e meio;

Aos **meus pais** pelo apoio, amor e incentivo ao longo de todo este processo;

À **minha irmã Raquel** pelo companherismo e por ter emprestado os ouvidos, a mente e o coração ao longo deste doutorado;

Às minhas orientadoras **Dra. Sueli Ivone Borrely** e **Dra. Eliana Nakano** pelos direcionamentos, amizade, paciência e confiança ao longo deste trabalho;

Á **Dra. Nancy Oguiura** pela companhia nesta jornada, e por ter "vestido a camisa" deste projeto;

Á **Dra. Isabel de Fátima Correia Batista** por ter cedido seu tempo e suas habilidades no aconselhamento deste trabalho;

Às demais membros da banca, **Dra. Maria Teresa de Carvalho Pinto Ribela** e **Dra. Kayo Okazaki** por terem se disponibilizado tão afetuosamente a contribuir com este trabalho;

Assim como à **Dra. Nelida Lucia Del Mastro** e a **Dra. Martha Harumi Sonobe** pelas valiosas contribuições no Seminário de área;

À **Dra. Toshie Kawano** (*in memoriam*) por ter aberto as portas do Laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan por ocasião de minha chegada a São Paulo; pelo carinho e apoio durante todo o período de nossa convivência;

À **Dra. Maria Carolina Quartim Barbosa Elias-Sabbaga** pela parceria científica ao longo deste trabalho disponibilizando os equipamentos para a realização dos experimentos desta tese, e pelo carinho com que sempre me recebeu em seu laboratório;

Também ao **Dr. Lincoln Suesdek** pela parceria científica ao longo deste trabalho disponibilizando os equipamentos para a realização dos experimentos desta tese, pelos conselhos pessoais e profissionais, e pela disponibilidade ao longo destes quatro anos e meio;

Aos alunos e funcionários dos **Laboratórios de Parasitologia**, **de Ecologia e Evolução** e **de Toxinologia Aplicada** do **Instituto Butantan**, amigos queridos que tornaram minha estada neste instituto tão prazerosa;

Um agradecimento especial à **Ludmila**, **Lenita**, **Patrícia Aoki**, **Ana Rita, Cristina** e **Suzete** pela parceria profissional, contribuições em todos os aspectos, e amizade ao longo deste doutorado;

À **Marcela** pela parceria e pela confiança de trabalhar ao meu lado e me permitir contribuir para sua formação;

Aos amigos do **Laboratório de Ensaios Biológicos ambientais** do **Centro de Tecnologia das Radiações** do **Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN**) pelo carinho com que me receberam neste processo;

Ao **Dr. Carlos Alberto de Bragança Pereira**, **Dra. Lúcia Pereira Barroso**, **Raquel Valente Barreiros** e **Thais Mateussi Cicolin** do Instituto de Matemática e Estatística da Universidade de São Paulo, pela análise estatística deste trabalho;

A **Rute** pelo apoio, pelo carinho e pelas orações;

Aos **amigos de Recife** pelo suporte emocional nesta jornada;

Ao **IPEN** por ter me aceito como aluna de doutorado e investido tanto em minha formação acadêmica;

À **CAPES** pelo apoio financeiro durante este doutorado;

Ao **Dr. Ferruccio M. Ritossa** pelo pontapé inicial nas HSPs;

A todos aqueles que por falha de memória não estão listados aqui.

ESTUDO DA RESPOSTA DO CARAMUJO *BIOMPHALARIA GLABRATA* (SAY, 1818) FRENTE A ESTÍMULOS AMBIENTAIS ESTRESSORES, COM ENFOQUE NA PROTEÍNA HSP70

Rebeca da Silva Cantinha

RESUMO

Moluscos têm sido empregados como bioindicadores em estudos de contaminação ambiental. Nesse contexto, o caramujo de água doce *Biomphalaria glabrata* tem sido avaliado como um bom modelo laboratorial, e estudos prévios apontaram sua aplicação na pesquisa ambiental. A proteína HSP70 é uma molécula de 70 kDa, pertencente a uma família de proteínas com papel na manutenção da homeostase dos seres vivos: as proteínas de choque térmico (HSPs); e vem sendo estudada como potencial biomarcador de dano ambiental, indicando estresse e protegendo os organismos dos danos às proteínas. Neste trabalho, foi caracterizada a proteína HSP70 de *B. glabrata* pelo Western blot, com o objetivo de seu emprego em aplicações ambientais futuras. Para isso, caramujos de 5-6 meses de idade, com diâmetro de concha de 14,4 (±1,7) mm, foram expostos ao calor e ao cloreto de cádmio ($CdCl_2$) a fim de se verificar a resposta desta proteína frente a esses estresses. Os animais foram dissecados para investigação da indução da HSP70. As proteínas foram extraídas dos tecidos com tampão RIPA, separadas em eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida, transferidas para uma membrana de nitrocelulose e detectadas com anticorpo específico para HSP70. A $CL_{50/96h}$ foi determinada como sendo 0,34 (0,30-0,37) ppm para o $CdCl_2$ e serviu de referência para os experimentos de indução da proteína. Foi observado que a exposição a temperaturas subletais aumentou a resistência dos caramujos à temperatura letal de 42 °C. Exposições prévias ao calor de 33 °C e ao $CdCl_2$ a 0,22 ppm aumentou a sobrevivência dos caramujos *B. glabrata* à concentração letal de $CdCl_2$ (0,7 ppm) e à temperatura letal (42 °C), respectivamente. Os achados do Western blot apontaram para um possível papel da HSP70 nesse processo. Os resultados mostraram relação entre a proteína HSP70 e o aumento na sobrevivência aos estímulos letais após prévia exposição a estresses moderados. O Western blot mostrou uma indução da HSP70 nos grupos pré-expostos, se comparados aos grupos controles. A glândula digestiva foi o tecido mais responsivo, no que concerne à indução da proteína HSP70, comparando com tecidos de cabeça/pé e ovoteste. Foi encontrado o pico de indução da HSP70 nos caramujos *B. glabrata* após 48 horas de exposição ao calor de 33 °C, e após 96 horas de exposição ao $CdCl_2$ a 0,22 ppm. Apesar do bem conhecido papel da HSP70 na termotolerância e tolerância a outros agentes estressores nos organismos vivos, esta foi a primeira vez que isto foi demonstrado no *B. glabrata*, oferecendo subsídios para a sua aplicação em estudos de monitoramento ambiental. Os resultados apresentados aqui abrem o caminho para estudos futuros dessa proteína no molusco, e fornecem mais bases para o conhecimento do *B. glabrata*.

STUDY OF THE RESPONSE FROM THE SNAIL *BIOMPHALARIA GLABRATA* (SAY, 1818) FACING STRESSOR ENVIRONMENTAL STIMULI, WITH FOCUS ON THE PROTEIN HSP70

Rebeca da Silva Cantinha

ABSTRACT

Molluscs have been employed as bioindicators in studies of environmental stress. In this way the freshwater snail *Biomphalaria glabrata* has been evaluated as a good laboratory model, and previous studies have pointed for its application in environmental research. The HSP70 protein is a molecule of 70 kDa from a family of proteins with role in maintaining homeostasis: the Heat Shock Proteins (HSPs), and it has been studied as a potential biomarker for environmental injury indicating stress and providing protection against the protein damage. In this work, the protein HSP70 was characterized in *B. glabrata* by Western blotting aiming its employment in future environmental applications. To this purpose, 5-6 months old snails, with shell diameter of 14,4 (±1,7) mm, were exposed to heat and to cadmium chloride ($CdCl_2$) in order to verify the response of this protein to the stresses. Animals were dissected to investigate induction of HSP70. Proteins were extracted from tissues with RIPA buffer, fractionated in denaturing polyacrilamide gel electrophoresis, transferred to nitrocellulose membrane, and detected with a HSP70-specific antibody. The $CL_{50/96h}$ was determined as 0,34 (0,30-0,37) ppm for $CdCl_2$ and served as reference in the experiments for protein induction. It was observed that exposure to sublethal temperatures improved the resistance of snails *B. glabrata* to the lethal temperature of 42 ºC. Previous sublethal exposure to heat at 33 °C and to $CdCl_2$ at 0,22 ppm improved the survival of snails *B. glabrata* to a lethal concentration of $CdCl_2$ (0,7 ppm) and to a lethal temperature (42 ºC), respectively. The findings of Western blot pointed to a possible role of HSP70 protein in this process. Results showed a correlation between HSP70 and the improvement of survival to lethal stimuli after a previous exposure to mild stresses. The Western blot showed an induction of HSP70 protein in the pre-exposed groups as compared to the control ones. The digestive gland was the most responsive tissue to stress regarding the HSP70 protein induction compared with heat/foot and ovotestis. An induction peak of HSP70 was found after 48 hours of exposure to heat at 33 °C, and after 96 hours of exposure to $CdCl_2$ at 0,22 ppm. Despite of the well known role of HSP70 in thermotolerance and tolerance to other stress agents in living organisms, it was the first time it was shown in *B. glabrata*, supporting its application in environmental monitoring studies. The results presented here open a way to future studies of this protein in the mollusc, and provide more basements to knowledge of *B. glabrata*.

SUMÁRIO

Página

LISTA DE TABELAS 9

LISTA DE FIGURAS 10

LISTA DE ABREVIATURAS 13

1 INTRODUÇÃO 14

2 OBJETIVOS 16

2.1 Objetivos gerais 16
2.2 Objetivos específicos 16

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 17

3.1 O *B. glabrata* 17
3.1.1 Descrição anatômica do *B. glabrata* 17
3.1.2 Descrição ambiental e comportamental do *B. glabrata* 21
3.1.3 O *B. glabrata* em estudos ambientais 22
3.2 Contaminação e estresse ambiental aquático 26
3.2.1 Moluscos como bioindicadores 27
3.2.2 Biomarcadores 29
3.2.2.1 As proteínas de choque térmico (HSPs) 31
3.2.2.1.1 A HSP70 32
3.2.2.2 HSPs e o calor 35
3.2.2.2.1 Termotolerância 37
3.2.2.3 As HSPs no monitoramento ambiental (estudos em moluscos e outros filos) 38
3.2.3 O papel ambiental e biológico do cádmio 41

4 MATERIAL E MÉTODOS 46

4.1 Moluscos para experimentação 46
4.2 Exposição dos animais ao calor para indução de termotolerância 47
4.3 Exposição dos animais ao cádmio para determinação da $CL_{50/96h}$ e dos efeitos sobre a proteína HSP70 48
4.4 Estudos de resistência cruzada 49
4.4.1 Calor/Cádmio 49
4.4.2 Cádmio/Calor 50
4.5 Avaliação da proteína HSP70 na glândula digestiva dos caramujos 51
4.6 Determinação da curva tempo-resposta de indução da proteína HSP70 53
4.7 Análise estatística dos resultados 53

5 RESULTADOS 55

5.1 Análise da termotolerância e dos efeitos do cádmio sobre a sobrevivência do caramujo *B. glabrata* 55
5.1.1 Estudos da termotolerância no caramujo *B. glabrata* 55
5.1.2 Estudos dos efeitos do cádmio sobre a sobrevivência do caramujo *B. glabrata* 57
5.1.2.1 Determinação da $CL_{50/96h}$ para o cloreto de cádmio no caramujo *B. glabrata* 57
5.1.2.2 Estudos de resistência cruzada 59
5.1.2.2.1 Calor/Cádmio 59
5.1.2.2.2 Cádmio/Calor 60
5.2 Análise da indução da proteína HSP70 pelo calor e pelo cádmio 62
5.2.1 Resposta da proteína HSP70 em caramujos *B. glabrata* expostos ao calor e ao cádmio 62
5.2.2 Indução da proteína HSP70 em diversos tecidos de caramujos *B. glabrata* expostos ao calor 64
5.2.3 Diferenças interindividuais observadas na indução da proteína HSP70 nos caramujos *B. glabrata* expostos ao calor e ao cádmio 66

5.3 Curva tempo-resposta da proteína HSP70 após exposição do caramujo *B. glabrata* ao calor e ao cádmio 68

6 DISCUSSÃO 70

7 CONCLUSÕES 86

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 87

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Mortalidade dos caramujos *Biomphalaria glabrata* em temperatura de 42 °C, após pré-exposição a temperaturas subletais por 120 horas. 55

Continuação da TABELA 1 - Mortalidade dos caramujos *Biomphalaria glabrata* em temperatura de 42 °C, após pré-exposição a temperaturas subletais por 120 horas..... 56

TABELA 2 – Medidas descritivas do tempo de sobrevivência para cada grupo testado..... 56

TABELA 3 - Mortalidade dos caramujos *Biomphalaria glabrata* expostos ao cádmio ($CdCl_2$) por 96 horas.58

TABELA 4 - Mortalidade dos caramujos *Biomphalaria glabrata* pré-expostos à temperatura de 33 °C durante 120 horas (n_o=50), e em seguida a 0,7 ppm de $CdCl_2$..... 59

TABELA 5 - Mortalidade dos caramujos *Biomphalaria glabrata* em temperatura de 42 °C, após pré-exposição a 0,22 ppm de $CdCl_2$ por 96 horas (n_o=35). 61

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Caramujo *Biomphalaria glabrata*. 18

FIGURA 2. Sistema digestivo de *Biomphalaria glabrata*. 20

FIGURA 3. Parte mole do *Biomphalaria glabrata*, vista do lado esquerdo, com o manto parcialmente levantado. 21

FIGURA 4. Fluxo de efeitos que podem ser ocasionados por estresse ambiental (adaptado de NAS/NRC, 1989 e Gonzalez et al., 2009). 30

FIGURA 5. Hierarquia dos níveis de complexidade dos sistemas vivos que sofrem influência do ambiente (adaptado de Gonzalez et al., 2009). 30

FIGURA 6. Sinais fisiológicos que ativam a expressão da HSP70 (adaptado de Kregel, 2002). 34

FIGURA 7. Modelo do mecanismo de ação do sistema de chaperonas no processo de desagregação dos polipeptídeos (Liberek et al., 2008). 35

FIGURA 8. Cristal de esfalerita (Composição - Sulfeto de zinco. 67,0% Zn, 33,0% S), e cristal de greenockita encravado em uma rocha (Composição - Sulfeto de cádmio. 77,8% Cd, 22,2% S). Fonte: Museu de Minerais e Rochas Heinz Ebert, 2012. 42

FIGURA 9. Caramujo *Biomphalaria glabrata* selvagem utilizado nos experimentos. 46

FIGURA 10. Criação de caramujos *Biomphalaria glabrata* no laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan. 47

FIGURA 11. Caramujos *Biomphalaria glabrata* expostos ao calor em estufa DBO. 47

FIGURA 12. Caramujos *Biomphalaria glabrata* expostos ao calor (42 °C) em banho-maria. 48

FIGURA 13. Exposição dos caramujos *Biomphalaria glabrata* ao cloreto de cádmio. 49

FIGURA 14. Dissecação do caramujo *Biomphalaria glabrata* para separação dos tecidos e extração das proteínas totais. 52

FIGURA 15. Curva de sobrevivência dos caramujos *Biomphalaria glabrata* a 42 °C. Grupos: Controle (preto); pré-expostos a 30 °C (vermelho); pré-expostos a 33 °C (verde); pré-expostos a 36 °C (azul) por 120 horas. 57

FIGURA 16. Curva de sobrevivência dos caramujos *Biomphalaria glabrata* expostos ao cloreto de cádmio durante 96 horas. 58

FIGURA 17. Gráfico Kaplan-Meier da sobrevivência dos caramujos *Biomphalaria glabrata* ao $CdCl_2$ (0,7 ppm), após pré-exposição a 33 °C por 120 horas. 60

FIGURA 18. Gráfico Kaplan-Meier da sobrevivência dos caramujos *Biomphalaria glabrata* à temperatura de 42 °C, após pré-exposição a 0,22 ppm de $CdCl_2$ por 96 horas. 62

FIGURA 19 - Western blot da proteína HSP70 na glândula digestiva de caramujos *Biomphalaria glabrata* expostos ao calor por 120 horas. (C): Grupo controle; (30, 33, 36 °C): Temperaturas de exposição. 63

FIGURA 20 - Análise pelo software ImageJ da indução da proteína HSP70 na glândula digestiva de caramujos *Biomphalaria glabrata* expostos ao calor por 120 horas. Cada barra corresponde à leitura da indução da proteína HSP70 em um pool de glândulas digestivas de 10 caramujos (FIG. 19). 63

FIGURA 21 - Western blot da proteína HSP70 na glândula digestiva de caramujos *Biomphalaria glabrata* expostos ao cádmio ($CdCl_2$) por 96 horas. (C): Grupo controle; (0.09 - 0.5): Concentrações de $CdCl_2$. 63

FIGURA 22 - Análise pelo software ImageJ da indução da proteína HSP70 na glândula digestiva de caramujos *Biomphalaria glabrata* expostos ao cádmio ($CdCl_2$) por 96 horas. Cada barra corresponde à leitura da indução da proteína HSP70 em um pool de glândulas digestivas dos caramujos sobreviventes à exposição ao cádmio em cada concentração testada (FIG. 21). 64

FIGURA 23 - Western blot da proteína HSP70 em diversos tecidos de caramujos *Biomphalaria glabrata* expostos ao calor por 120 horas. GD: Glândula digestiva. C/P: Cabeça/pé. OT: Ovoteste. 65

FIGURA 24 – Repetição da figura anterior, reestruturada, dando destaque aos tecidos analisados. Western blot da proteína HSP70 nos diversos tecidos de caramujos *Biomphalaria glabrata* expostos ao calor por 120 horas. GD: Glândula digestiva. C/P: Cabeça/pé. OT: Ovoteste. 65

FIGURA 25 - Análise pelo software ImageJ da indução da proteína HSP70 nos diversos tecidos de caramujos *Biomphalaria glabrata* expostos ao calor por 120 horas. GD: Glândula digestiva. C/P: Cabeça/pé. OT: Ovoteste. Cada barra corresponde à leitura da indução da proteína HSP70 em um pool de tecidos de 10 caramujos (FIG. 23 e 24). 65

FIGURA 26 - Western blot da indução da proteína HSP70 na glândula digestiva de caramujos *Biomphalaria glabrata* individualizados expostos ao calor. A e B: Grupos controle e expostos a 33 °C por 120 horas. 66

FIGURA 27 - Análise pelo software ImageJ da indução da proteína HSP70 na glândula digestiva de caramujos *Biomphalaria glabrata* individualizados e em pool, expostos ao calor de 33 °C por 120 horas. Cada barra corresponde à leitura da indução da proteína HSP70 no extrato de glândula digestiva (FIG. 26). Tomou-se como referência a figura 26A para os animais de 1 a 5, e a figura 26B para os animais de 6-10. . 66

FIGURA 28 - Western blot da proteína HSP70 na glândula digestiva de caramujos *Biomphalaria glabrata* individualizados expostos ao cádmio. A e B: Grupos controle e expostos a 0,22 ppm de $CdCl_2$ por 96 horas. 67

FIGURA 29 - Análise pelo software ImageJ da indução da proteína HSP70 na glândula digestiva de caramujos *Biomphalaria glabrata* individualizados expostos ao cádmio (0,22 ppm) por 96 horas. Cada barra corresponde à leitura da indução da proteína HSP70 no extrato de glândula digestiva (FIG. 28). Tomou-se como referência a figura 28A para os animais de 1 a 5, e a figura 28B para os animais de 6-10. 67

FIGURA 30 - Western blot da proteína HSP70 na glândula digestiva de caramujos *Biomphalaria glabrata* individualizados não expostos a agentes agressores (grupo controle). 68

FIGURA 31 - Análise pelo software ImageJ da indução da proteína HSP70 na glândula digestiva de caramujos *Biomphalaria glabrata* individualizados, não expostos a agentes agressores (grupo controle). Cada barra corresponde à leitura da indução da proteína HSP70 no extrato de glândula digestiva de cada caramujo e no pool (FIG. 30). 68

FIGURA 32. Indução da proteína HSP70 pelo cádmio e pelo calor em caramujos *Biomphalaria glabrata*, medida nos intervalos de 24, 48, 72, 96 e 120 horas de exposição. 69

FIGURA 33 - Análise pelo software ImageJ da curva tempo-resposta (FIG. 32) da indução da proteína HSP70 na glândula digestiva de caramujos *Biomphalaria glabrata* expostos ao cádmio (0,22 ppm) e ao calor (33 °C). 69

LISTA DE ABREVIATURAS

ABNT: Associação Brasileira de Normas Técnicas

A. irradians: *Argopecten irradians*

ATSDR: Agency for Toxic Substances and Disease Registry

B. glabrata: *Biomphalaria glabrata*

C. gigas: *Crassostrea gigas*

$CL_{50/96h}$: Concentração letal para 50% da população em 96 horas de exposição

CONAMA: Conselho Nacional do Meio Ambiente

C. virginica: *Crassostrea virginica*

Cyp450: Citocromo P450

DBO: Demanda Bioquímica de Oxigênio

ELISA: Enzime-Linked Immunosorbent Assay

HSP: Proteína de choque térmico (Heat Shock Protein)

HSP70: Proteína de choque térmico (Heat Shock Protein) de 70 kDa

IARC: International Agency for Research on Cancer

M. edulis: *Mytilus edulis*

O. edulis: *Ostrea edulis*

PCR: Polymerase Chain Reaction

P. magellanicus: *Placopecten magellanicus*

RT-PCR: Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

S. mansoni: *Schistosoma mansoni*

SOD: Superóxido dismutase

1 INTRODUÇÃO

Moluscos constituem o segundo filo de importância, depois dos artrópodes, em número de espécies descritas (Ruppert et al., 2005). Recebem destaque também por sua ampla distribuição ambiental (DeJong et al., 2001; Souza et al., 2001) e papel na dinâmica humana como fonte de alimentação, hospedeiros de microrganismos patogênicos (Collins et al., 2006), além de serem potenciais agentes de bioinvasões e bioincrustações (Pointier, 2001; Brugnoli et al., 2005). Esse filo tem sido bastante empregado na experimentação científica, incluindo estudos de monitoramento ambiental (Frantsevich et al., 1995; Fernandez et al., 2002; Regoli et al., 2006; Jara & Wiegand, 2008; Kimbrough et al., 2008), ganhando interesse como bioindicadores de contaminação aquática (Salánki et al., 2003; Oehlmann & Oehlmann, 2004; Rittschof & McClellan-Green, 2005; Franzellitti et al., 2010).

O caramujo *Biomphalaria glabrata* (*B. glabrata*), um dos hospedeiros intermediários no ciclo do *Schistosoma mansoni* (*S. mansoni*) no Brasil (Pessôa & Martins, 1988; Rey, 2011), é uma das espécies que vem ganhando destaque nas investigações científicas no campo dos estudos ambientais. De fácil cultivo em laboratório, essa espécie demonstrou elevada sensibilidade à toxicidade e mutagenicidade induzida pela presença de elementos químicos, em condições experimentais (Verrengia Guerrero et al., 1997; Nakano et al., 2003; Ansaldo et al., 2006; Estevam et al., 2006). Essa característica, aliada ao seu fácil manuseio, o coloca na condição de bom modelo para biomonitoramento ambiental.

Diversos trabalhos investigaram também os efeitos da exposição do *B. glabrata* a agentes físicos (Tallarico et al., 2004; Ruelas et al., 2006; Cantinha et al., 2010), oferecendo mais embasamentos teóricos para o uso destes moluscos em protocolos de monitoramento ambiental.

Novas técnicas para estudos já padronizados, assim como novas moléculas alvo, têm sido buscadas para emprego em estudos ambientais. As classes de estruturas investigadas abrangem praticamente todas as moléculas presentes nos organismos vivos, e muitos estudos com este enfoque foram realizados também no caramujo *B. glabrata* (Nakano et al., 2003; Ainsemberg et al., 2005; Ansaldo et al., 2006; Estevam et al., 2006; Cochón et al., 2007; Ansaldo et al., 2009).

Entre as moléculas vitais, as proteínas vêm ganhando interesse em estudos de monitoramento do meio ambiente (Franzellitti et al., 2010; Leung et al., 2011). Estas

constituem uma classe de importância para a manutenção da vida, considerando suas inúmeras funções biológicas (sinalização, estruturação, enzimática, hormonal, defesa, transporte, regulação, entre outras). Entre as proteínas, as chaperonas, responsáveis por assegurar a correta conformação dos polipeptídeos, têm se destacado como biomarcadores em estudos de monitoramento ambiental. Suas funções incluem: desenovelar proteínas com acomodação inadequada, possibilitando novo enovelamento; conectar peptídeos; renaturar peptídeos lesados; solubilizar agregados protéicos e transportar proteínas para serem destruídas (Sanders, 1993; Gupta et al., 2010).

Uma das chaperonas mais conhecidas, a HSP70 tem sido estudada e seu emprego proposto como um biomarcador de contaminação ambiental. Considerada a mais conservada entre os diversos filos, também é a mais abundante e bem caracterizada. Foi descrita em espécies de diferentes níveis evolutivos, como bactérias e humanos. Na célula encontra-se presente em diferentes compartimentos (Sanders, 1993; Gupta et al., 2010; Jackson et al., 2011).

Trabalhos demonstraram o potencial da HSP70 de moluscos como biomarcador no monitoramento ambiental por meio de experimentos nos quais os animais foram expostos a agentes químicos, físicos e biológicos, e observou-se uma indução da proteína, relacionada com o estresse sofrido pelo animal (Tomanek & Sanford, 2003; Piano et al., 2004; David et al., 2005; Cellura et al., 2006; Farcy, 2007).

O calor é conhecidamente o estímulo indutor de referência para as HSPs, embora outros agentes tenham sido correlacionados com a indução destas proteínas. O cádmio, por exemplo, é um poluente aquático muito freqüente em amostras ambientais, extremamente tóxico, e também capaz de produzir radicais livres, e de interagir com o mecanismo de transporte transmembrana. Sua interação com os grupamentos sulfidrila presentes nas proteínas e seus mecanismos de redução do glutation aumentam os níveis de estresse oxidativo, acumulando proteínas alteradas no organismo (Ansaldo et al., 2006; Bertin & Averbeck, 2006). Trabalhos mostraram que este metal também é capaz de induzir a proteína HSP70, inclusive em moluscos (Piano et al., 2004; Ivanina et al., 2009).

Considerando o panorama exposto, este trabalho apresenta o primeiro estudo da proteína HSP70 em caramujos *B. glabrata*, com enfoque no monitoramento ambiental, e agregará mais informações sobre o comportamento desta proteína no molusco, bem como novos conhecimentos para a padronização deste animal como bioindicador de contaminação ambiental.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Considerando o potencial de aplicação do caramujo *B. glabrata* em protocolos experimentais, notadamente para estudos ambientais; e considerando, também, o interesse pela proteína HSP70 no monitoramento ambiental, este trabalho objetiva estudar a resposta do caramujo *B. glabrata* a estímulos ambientais de referência: o calor e o cádmio; e a correlação desta resposta com a indução da proteína HSP70 neste organismo, investigada por meio da técnica de Western blot.

2.2 Objetivos específicos

- Estudar a termotolerância do caramujo *B. glabrata*;
- Avaliar a indução da proteína HSP70 pelo calor no caramujo *B. glabrata*;
- Determinar a $CL_{50/96h}$ do cloreto de cádmio ($CdCl_2$) para o caramujo *B. glabrata*;
- Averiguar se o cádmio induz a proteína HSP70 no caramujo *B. glabrata*;
- Analisar a existência de resistência cruzada entre o calor e o cádmio no caramujo *B. glabrata*;
- Analisar se a indução da proteína HSP70 está envolvida na resistência cruzada calor-cádmio/cádmio-calor neste caramujo;
- Determinar a curva tempo-resposta da proteína HSP70 no caramujo *B. glabrata*, quando exposto ao calor e ao cádmio.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os moluscos formam o segundo maior filo do reino animal; constituído por espécies amplamente distribuídas no ambiente, mostram-se excelentes no monitoramento das áreas naturais (DeJong et al., 2001; Souza et al., 2001; Oehlmann & Oehlmann, 2004; Kimbrough et al., 2008). Os gastrópodes constituem a classe mais abundante do filo, e entre esses, o caramujo *B. glabrata* tem se destacado como objeto de estudo de efeitos de agentes físicos (Okazaki et al., 1996; Tallarico et al., 2004; Ruelas et al., 2006; Grazeffe et al., 2008; Cantinha et al., 2010) e químicos (Verrengia Guerrero et al., 1997; Nakano et al., 2003; Aisemberg et al., 2005; Ansaldo et al., 2006; Kristoff et al., 2006; Cochón et al., 2007; Ansaldo et al., 2009; Kristoff et al., 2010).

3.1 O *B. glabrata*

Este molusco de água doce, muito utilizado na experimentação científica, é um dos hospedeiros intermediários do helminto *S. mansoni*, um parasita de grande importância em partes da África, Américas do Sul e Central, e Caribe (DeJong et al., 2001; Souza et al., 2001). Possuem esse nome devido à sua morfologia (*Bis* = dois; *omphalos* = umbigo; *glabrata* = liso) constituída por uma depressão (umbigo) em cada lado da concha (Paraense, 2008).

3.1.1 Descrição anatômica do *B. glabrata*

São indivíduos assimétricos, com concha espiralada, geralmente lisa, com 7 a 40 mm de diâmetro com função protetora, fortemente mineralizada, constituída em mais de 95% por carbonato de cálcio. Os sais de cálcio utilizados na elaboração da concha provêm dos alimentos e ficam reservados na glândula digestiva sob a forma de fosfatos. Esses sais são transportados pelo sangue até o manto e transformados em carbonatos pela ação das fosfatases (Ruppert et al., 2005; Rey, 2011). A concha é o abrigo permanente de uma parte do corpo do molusco onde se encontram as vísceras envolvidas pelo manto (FIG. 1).

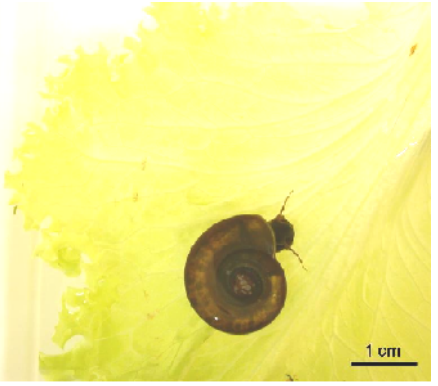

FIGURA 1. Caramujo *Biomphalaria glabrata*.

O manto é uma cavidade contínua com a água circundante, que abriga a maioria dos órgãos do molusco. A superfície ventral do corpo dos moluscos é ocupada por um pé muscular que adere e move o animal sobre superfícies de substratos firmes. Vários músculos contraem-se puxando a concha em direção ao pé, e vice-versa. A maioria dos moluscos quando ameaçada libera-se do substrato recolhendo o pé, juntamente com a cabeça para dentro da concha (Barbosa et al., 1995; Ruppert et al., 2005).

A circulação desses animais é feita por meio do coração contido no pericárdio onde circula a hemolinfa de cor vermelha devido à hemoglobina dissolvida, que contendo ferro, permite a utilização do oxigênio dissolvido à baixa tensão. Formada também por um plasma rico em água, cloreto de sódio e bicarbonato (por isso, tem reação alcalina) (Ruppert et al., 2005; Paraense, 2008; Rey, 2011; Neves, 2011). Nos moluscos gastrópodes os hemócitos (células de defesa), associados com fatores humorais da hemolinfa, representam os elementos fundamentais de defesa do molusco contra patógenos, especialmente o *S. mansoni* (Vasquez & Sullivan, 2001; Azevedo et al., 2004).

A respiração é predominantemente atmosférica, embora sejam capazes de absorver o oxigênio à baixa tensão, retirando-o da água através do tegumento. O manto possui uma cavidade com função secundária de pulmão, sendo utilizado quando o conteúdo de oxigênio na água cai significativamente, e o animal sobe à superfície da água para respirar, por meio da flutuação ou atravessando entre objetos submersos, renovando seu conteúdo pulmonar. A hematose ocorre na rede vascular da parede pulmonar, de onde o sangue flui para o coração (Ruppert et al., 2005; Brasil, 2007; Paraense, 2008; Rey, 2011; Neves, 2011).

A excreção é realizada pelo rim, no qual é observada uma prega mucosa, saliente e pigmentada, denominada crista renal que é característica para essa espécie de *Biomphalaria* (Brasil, 2007; Paraense, 2008; Rey, 2011; Neves, 2011).

O sistema nervoso é cefalizado e bem desenvolvido, formado por pares de gânglios que formam um anel em torno do esôfago, logo atrás do saco bucal. O sistema nervoso autônomo é constituído por vários gânglios. Possui órgãos dos sentidos que englobam um par de olhos, situados na base dos tentáculos; um receptor olfativo, um par de órgãos do equilíbrio e orientação locomotora, receptores de contato sob a forma de elementos sensitivos; além de quimioreceptores (Ruppert et al., 2005; Brasil, 2007; Rey, 2011).

O sistema digestivo desses animais é completo com boca, cavidade bucal, faringe, esôfago, estômago, intestino, ceco, reto e ânus. No interior do saco bucal encontra-se a rádula, usada pelos moluscos para raspar substratos duros e remover algas e organismos microscópicos e detritos (Paraense, 1970; Pessoa & Martins, 1988; Ruppert et al., 2005; Paraense, 2008).

Nos moluscos em geral, um ou mais pares de glândulas salivares secretam muco para dentro da cavidade bucal, este muco mistura-se com as partículas ingeridas pelo animal e forma o cordão mucoso que pode ser movimentado pelos cílios em direção ao esôfago e estômago. O esôfago, bastante longo, conduz os alimentos até um musculoso estômago, que se comunica com a glândula digestiva, um órgão localizado na região pilórica do estômago, onde são produzidas numerosas enzimas digestivas pelas células constituintes de seu epitélio, que também se encarrega da absorção, acúmulo de reservas nutritivas e excreção (FIG. 2) (Pessoa & Martins, 1988; Ruppert et al., 2005; Rey, 2011). No caso de contaminações ambientais por metais, estudos indicam a glândula digestiva como órgão que retém as maiores quantidades do poluente (Verrengia Guerrero et al., 1997; Ansaldo et al., 2006; 2009).

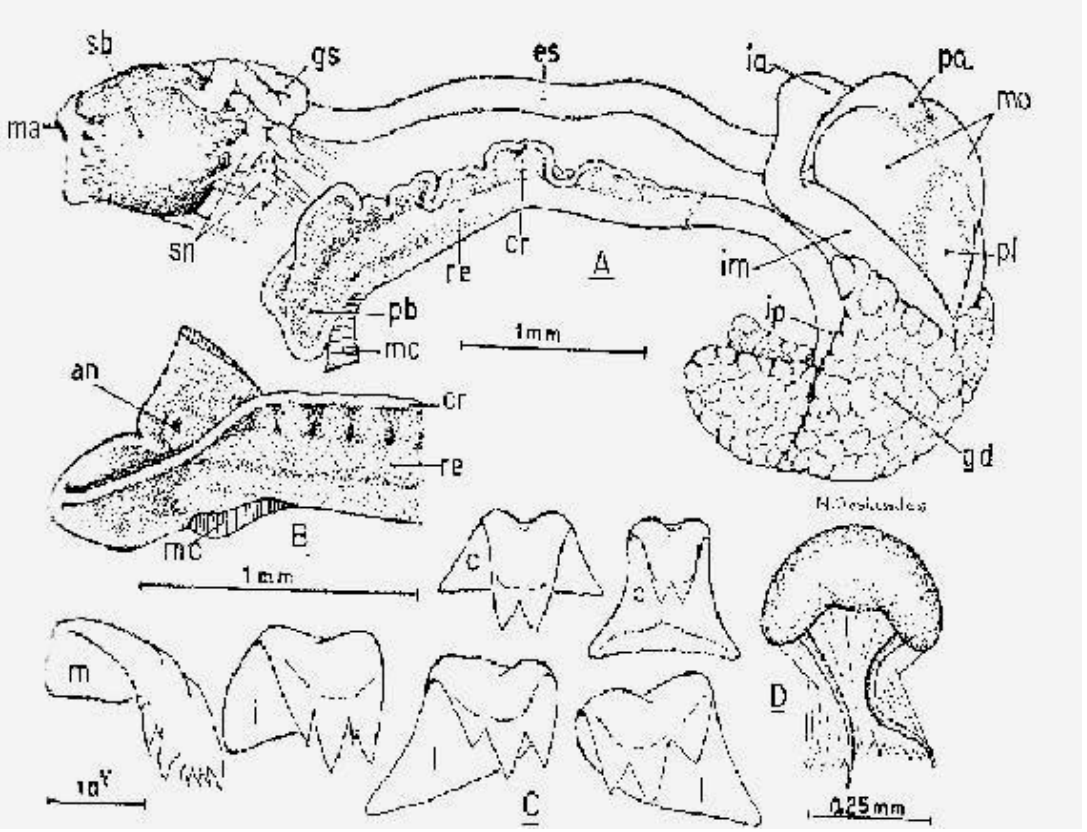

FIGURA 2. Sistema digestivo de *Biomphalaria glabrata*. A. Tubo digestivo e glândulas anexas; B. Porção terminal do reto e região anal; C. Dentes da rádula; D. Mandíbula; an. Ânus; c. Dente central; cr. Crista retal; es. Esôfago; gd. Glândula digestiva; gs. Glândula salivar; i. Dente intermediário; ia. Intestino anterior; im. Intestino médio; ip. Intestino posterior; l. Dente lateral; m. Dente marginal; ma: Mandíbula; mc. Músculo columelar; mo. Moela; pa. Papo; pb. Pseudobrânquia; pl. Piloro; re. Reto; sb. Saco bucal; sn. Sistema nervoso central (adaptado de Paraense, 1970).

Os resíduos da digestão são evacuados pelo intestino, longo e enrolado, que não participa da digestão, sua função é modificar e armazenar pelotas fecais, e reabsorver a água. O ânus encontra-se dorsalmente à região do manto, no curso da corrente exalante, onde as pelotas fecais podem ser expelidas sem o risco de se precipitar e sedimentar sobre as brânquias (Pessoa & Martins, 1988; Ruppert et al., 2005; Rey, 2011).

Como todos os moluscos pulmonados, o caramujo *B. glabrata* é hermafrodita, capaz de se reproduzir por auto-fecundação, embora prefira a reprodução cruzada com outro indivíduo, onde um atua como macho e outro como fêmea. As vias masculinas e femininas são separadas, embora exista um órgão hermafrodita, o ovoteste, onde se desenvolvem as células reprodutoras femininas e masculinas (Paraense, 2008). Essa é uma das razões pelas quais esses animais são práticos para a experimentação, considerando que

não existem interferentes relacionados ao gênero da espécie (Münzinger, 1987; Nakano et al., 2003).

A organização anatômica do caramujo *B. glabrata* pode ser visualizada no esquema da Figura 3.

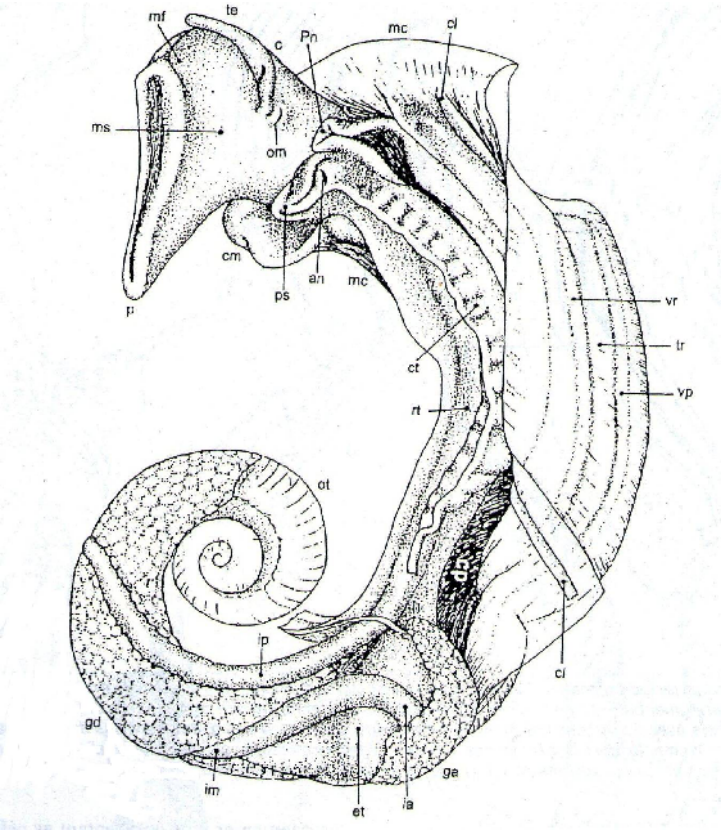

FIGURA 3. Parte mole do *Biomphalaria glabrata*, vista do lado esquerdo, com o manto parcialmente levantado. (an. Ânus; c. Cabeça; cl. Crista dorsolateral; cm. Colar do manto; cp. Cavidade pulmonar; ct. Crista retal; et. Estômago; ga. Glândula do albúmen; gd. Glândula digestiva; ia. Intestino anterior; im. Intestino médio; ip. Instestino posterior; mc. Músculo columelar; mf. Mufla; ms. Massa cefalopodal; om. Orifício genital masculino; ot. Ovoteste; p. Pé; pn. Pneumóstoma; ps. Pseudobrânquia; rt. Reto; te. Tentáculo; tr. Tubo renal; vp. Veia pulmonar; vr. Veia renal). (Adaptado de Barbosa, 1995 e Neves, 2011)

3.1.2 Descrição ambiental e comportamental do *B. glabrata*

Em laboratório esses moluscos podem alcançar mais de 2 anos de vida, embora normalmente vivam por cerca de 14-15 meses. Na natureza, os moluscos planorbídeos são

encontrados em regiões geográficas diferentes, com altitudes e temperaturas variáveis (Pessoa & Martins, 1988; Rey, 2011; Neves, 2011).

São capazes de viver em criadouros com condições bastante variáveis de pH, concentração de matéria orgânica e sais. Têm preferência por água parada ou pouco corrente, não contaminada (Münzinger, 1987; Pessoa & Martins, 1988; Neves, 2011).

O caramujo *B. glabrata* é fototrópico, alimentando-se predominantemente de vegetais. Em laboratório consomem folhas de couve, alface, agrião ou cenoura fatiada (Pessoa & Martins, 1988; Neves, 2011). Foi observado que animais letalmente irradiados ou expostos a concentrações letais de metais tóxicos diminuem ou cessam a alimentação antes da morte (Abd Allah et al., 2003; Ruelas et al., 2006).

Este animal não suporta temperaturas elevadas por muito tempo, refazendo-se do calor excessivo durante a noite em decorrência do abaixamento da temperatura, sobrevivem em torno de 4 horas a 40 °C e no máximo por alguns minutos a 50 °C. As temperaturas baixas reduzem o metabolismo e as posturas (Pessoa & Martins, 1988; Rey, 2011; Neves, 2011).

O caramujo *B. glabrata* pode começar sua oviparidade com 5 a 7 semanas de vida As desovas são feitas em intervalos regulares, geralmente à noite, com emissão de um número variado de ovos (Perlowagora-Szumlewicz, 1966; Pessôa & Martins, 1988; Okazaki et al., 1996). A oviparidade sofre influência de fatores ambientais como a temperatura, turbidez da água, presença de substâncias tóxicas no ambiente, ou mesmo parasitismo do molusco pelo *S. mansoni* (Pessoa & Martins, 1988).

Segundo Perlowagora-Szumlewicz (1966) o amadurecimento sexual da espécie *B. glabrata* pode ser analisado pelas primeiras oviposições, bem como pela viabilidade das desovas. Ao chegarem à idade de 14 a 15 meses de vida os espécimes alcançam seu comprimento máximo, juntamente com a perda ou diminuição considerável de sua capacidade reprodutiva.

3.1.3 O *B. glabrata* em estudos ambientais

Pesquisas têm objetivado estabelecer o caramujo *B. glabrata* como bioindicador, alguns trabalhos, inclusive, já padronizaram testes de mutagenicidade e genotoxicidade nesta espécie, o que fornece maiores conhecimentos para sua aplicação em estudos ambientais (Nakano et al., 2003; Tallarico et al., 2004; Estevam et al., 2006; Grazeffe et al., 2008). Alguns marcadores biológicos como enzimas e

carboidratos; e funções biológicas como sobrevivência e reprodução, também já foram estudados neste caramujo frente a agentes estressores, com resultados de interesse para aplicações ambientais (Oliveira-Filho et al., 2004; Aisemberg et al., 2005; Ansaldo et al., 2006; Ansaldo et al., 2009).

Os primeiros estudos dos efeitos de compostos químicos sobre o caramujo *B. glabrata*, no entanto, foram realizados com vista ao estabelecimento de novos moluscicidas para combate da esquistossomose (Fujinami & Nakamura, 1911 apud Komiya, 1964[1]; Fujinami e Narabayashi, 1913 apud Komiya, 1964[2]; Narabayashi, 1915 apud Komiya, 1964[3]; Hoffman & Zakhary, 1953; Nolan et al., 1953; Bond & Nolan, 1954; Nolan & Bond, 1955; Paulini & Camey, 1965a,b).

Em 1965(a), Paulini e Camey testaram os efeitos moluscicida do Planticuivre, um inseticida cujo ingrediente ativo era o dimetil-ditio-carbamato de cobre (cuprobam); o produto não se mostrou muito efetivo no combate ao caramujo, com ação lenta sobre este molusco; porém, com importante efeito sobre peixes e sapos, e nenhum efeito sobre a vegetação aquática. O cobre, aliás, era um dos compostos químicos mais testados antigamente, como um promissor agente moluscicida (Hoffman & Zakhary, 1953; Webbe, 1987).

Cheng e Sullivan (1973; 1977) também estudando o potencial moluscicida do cobre conseguiram verificar que este altera o mecanismo de osmorregulação do caramujo, acarretando acúmulo de água nos tecidos, com alterações histopatológicas importantes. O cobre também interage com os mecanismos respiratórios do molusco, reduzindo a taxa de respiração do animal. Entretanto, segundo esses autores, a toxicidade do cobre está diretamente ligada a sua posição na molécula do composto, de tal maneira que em um moluscicida ideal baseado no cobre, o metal deve estar suficientemente disponível para

---

[1]FUJINAMI , K. & NAKAMURA, D. Studies on the prevention and infection of Katayama Disease. Chugai Iji Shinpo, (753), 1907-1027. 1911. (in Japanese) In: KOMIYA, Y. The prevention of Schistosomiasis japonica. Tokyo: Meguro Parasitological Museum. p. 245-274. 1964.

[2] FUJINAMI, K. & NARABAYASHI, H. The preventive measure of japanese schistosomiasis, particulary the technic of mixing lime. Chugai Iji Shinpo, (796), 649-657; Hiroshima Eisei Iji Geppo, (174), 179-190. 1913. (in Japanese) In: KOMIYA, Y. The prevention of Schistosomiasis japonica. Tokyo: Meguro Parasitological Museum. p. 245-274. 1964.

[3] NARABAYASHI, H. The prevention of Japanese schistosomiasis, particulary the eradication of its intermediate host by mixing lime in wate r. Chugai lji Shinpo, (855), 1381-1416; Hiroshima ljisieisei Geppo, (206), 54-68; (207) , 98-107; (208), 151-160; (209), 191-196; (210), 232-239. 1915. (in Japanese). In: KOMIYA, Y. The prevention of Schistosomiasis japonica. Tokyo: Meguro Parasitological Museum. p. 245-274. 1964.

permitir sua atividade biológica; porém, suficientemente protegido das interações com outras moléculas, íons e colóides do meio aquático.

Essa diferença entre os efeitos do cobre quando em composições diferentes também foi observada por Oliveira-Filho et al. (2004) ao testar a susceptibilidade de diversos organismos de água doce a pesticidas baseados no cobre. Para o sulfato de cobre, que uma forma bastante empregada deste metal na experimentação científica, o caramujo *B. glabrata* mostrou-se mais resistente que as demais espécies testadas (alga *Raphidocelis subcapitata*, microcrustáceo *Daphnia similis* e peixe *Danio rerio*).

Outros trabalhos utilizaram o caramujo *B. glabrata* como objeto de estudo para os efeitos de diversos compostos capazes de contaminar o ambiente.

Uma mini-revisão de Ravera, em 1991, já apontava uma série de metais capazes de interferir com a reprodução do caramujo. O autor agrupou os metais e suas respectivas concentrações capazes de levar a zero a fecundidade do caramujo *B. glabrata*, são eles: cádmio (50 ppb); mercúrio, vanádio e chumbo (500 ppb) e zinco (1ppm).

Abd Allah et al. (1997) avaliaram os efeitos do cádmio, chumbo e mercúrio sobre caramujos *B. glabrata* parasitados pelo *S. mansoni*. Os metais reduziram a sobrevivência e o crescimento do animal, sendo que as maiores interferências foram ocasionadas pela exposição ao cádmio. A liberação das larvas do *S. mansoni* também foi afetada pela exposição dos caramujos aos metais; entretanto, esse grupo não observou efeitos dos metais sobre a reprodução do caramujo.

Em um trabalho posterior (2003), este mesmo grupo não observou novamente efeitos dos metais sobre a reprodução do caramujo, nem sobre o comportamento, nas concentrações de cádmio, chumbo e mercúrio testadas. Porém, foram observados efeitos sobre o crescimento e sobrevivência, onde os metais tiveram efeitos depressores sobre esses parâmetros. Testando os animais à exposição aos metais nas temperaturas de 17 e 28 °C, o grupo observou maiores efeitos de acúmulo dos metais nos animais expostos à temperatura de 28 °C, embora o grupo não tenha sabido correlacionar o sinergismo entre o efeito da temperatura e o efeito dos metais.

Aisemberg et al. (2005) observaram que o chumbo também interfere com os níveis da enzima alanina-desidrogenase no molusco *B. glabrata*, em níveis abaixo dos valores máximos permitidos pela legislação brasileira (CONAMA, 2005). Estudando caramujos pigmentados e albinos, os autores observaram inibição da atividade enzimática, inversamente proporcional aos níveis de exposição e de bioacúmulo tecidual, sendo que não foram observadas diferenças relacionadas à pigmentação do caramujo.

Estevam et al. (2006) avaliaram, através do teste do letal dominante, os efeitos ocasionados pelo herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). Os efeitos mutagênicos deste composto foram observados nas três concentrações testadas, com aumento significante na freqüência de malformações letais na progênie dos caramujos albinos, que foram cruzados com caramujos selvagens expostos ao herbicida. Esse teste já havia sido padronizado anteriormente para esta espécie de moluscos por Nakano et al. (2003), por meio de avaliação dos efeitos mutagênicos da mitomicina C e da ciclofosfamida em progênies de caramujos *B. glabrata* albinos cruzados com caramujos selvagens expostos aos quimioterápicos.

Cochón et al. (2007) investigaram a indução de estresse oxidativo pelo herbicida paraquat, e também seu efeito sobre as poliaminas (putrescina, espermidina e espermina). Os resultados mostraram aumento na peroxidação lipídica e diminuição da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) no caramujo *B. glabrata*, enquanto que os níveis de poliaminas permaneceram inalterados.

Em 1965 (b) Paulini e Camey já haviam descrito o potencial moluscicida do paraquat, sendo que este apresentara no referido trabalho o benefício adicional de ser absorvido por algas e folhas verdes de plantas aquáticas, permanecendo com seu efeito moluscicida inalterado. Ainda como vantagem adicional o herbicida não mostrou toxicidade para peixes, nas concentrações letais para os caramujos, e em concentrações abaixo da considerada moluscicida este composto controla plantas aquáticas capazes de interferir com o fluxo da água, especialmente para irrigação (p. ex.: elódea).

Ansaldo et al. (2006; 2009) analisando os efeitos do cádmio, chumbo e arsênico sobre a reprodução e acúmulo de glicogênio no caramujo *B. glabrata* observaram diminuição da fecundidade e fertilidade dos animais, com aumento no tempo de eclosão dos ovos. Esses metais também interferiram com os níveis de glicogênio dos tecidos, especialmente na região gonadal, o que pode explicar os efeitos sobre a reprodução do animal, visto que o glicogênio é uma fonte de energia importante para o processo reprodutivo (Manzoni & Schmitt, 2006), e, segundo os autores, o desvio de energia para contornar os efeitos estressores dos metais levaria à diminuição das reservas energéticas para manutenção das atividades reprodutivas.

Esses autores observaram que o cádmio e o chumbo têm bioacumulação maior na glândula digestiva, enquanto que para o arsênico a região gonadal concentra os maiores níveis do metal.

Kristoff et al. (2006; 2010) verificaram inibição de enzimas colinesterase ocasionada por pesticidas (azinfos-metil e carbaril) em caramujos *B. glabrata*. A redução da atividade das enzimas ocorreu dentro de 24 horas de exposição aos agentes químicos, alcançando o maior nível dentro de 48 horas. Nenhuma desordem de ordem locomotora foi observada pela exposição dos caramujos ao pesticida, porém a recuperação dos níveis basais encontrados em indivíduos não expostos foi relativamente delongada, com base em outro modelo animal testado (o poliqueta *Lumbriculus variegatus*).

3.2 Contaminação e estresse ambiental aquático

O crescimento urbano e demográfico; assim como o desenvolvimento tecnológico, embora representem um avanço das sociedades modernas e possibilidades de novas descobertas, acarretam impactos ambientais severos e perigosos para a manutenção da vida nos ecossistemas. O crescimento e desenvolvimento tecnológico aumentam a quantidade de rejeitos domésticos, industriais e agrícolas lançados diariamente em corpos d'água, originando uma contaminação incompatível com a manutenção da vida aquática. A poluição dos ambientes aquáticos acaba trazendo prejuízos também para o homem, além dos prejuízos econômicos que incorrem da degradação ambiental (Mukhopadhyay et al., 2003; Alves & Uturbey, 2010; Paavola, 2011).

O controle da poluição aquática está diretamente relacionado com a proteção da saúde, garantia de um meio ambiente ecologicamente equilibrado e melhoria na qualidade de todas as formas de vida. Embora seja sabido que os efeitos do ambiente sobre a saúde interagem com outros contribuintes como estilo de vida e fatores genéticos, os estressores ambientais têm um peso considerável sobre a manutenção da vida (CONAMA, 2005; EEA, 2005).

Após a revolução industrial a capacidade humana de modificar o ambiente tornou-se ampliada, especialmente com o lançamento de substâncias químicas em ecossistemas aquáticos, terrestres e na atmosfera. Devido às diversas atividades antropogênicas, milhares de substâncias nocivas são liberadas diariamente no ambiente. Nele essas substâncias podem sofrer transporte e transformação, originando subprodutos deletérios pra a manutenção da vida. Assim, os organismos ali presentes são constantemente desafiados por eventos que causam estresses capazes de danificar estruturas celulares e afetar a homeostase da célula (Amorim et al., 2003; Noyes et al., 2009; Gupta et al., 2010).

Entre os poluentes liberados diariamente no ambiente destacam-se os resíduos de fertilizantes, inseticidas e herbicidas utilizados na agricultura; rejeitos de esgoto e processos industriais; compostos com atuação endócrina, tais como hormônios e surfactantes; metais e metalóides; medicamentos; além de agentes tóxicos produzidos acidentalmente como produtos gasosos, líquidos, particulados e sólidos decorrentes da manipulação do lixo (EEA, 2005; Gupta, 2007).

O ressurgimento do programa nuclear pode ser apontado como outro fator que aumenta a importância do monitoramento ambiental, pois além dos rejeitos gerados pelas centrais nucleares, é sabido que a água de resfriamento dos reatores é retirada de coleções hídricas presentes no local e devolvida em temperaturas acima do natural, ocasionando variações ambientais para as formas de vida ali presentes. Outras atividades industriais também utilizam água retirada do ambiente natural em processos de resfriamento, contribuindo para desequilíbrios no ecossistema da região (Campos, 2007; State, 2007; Beheshti, 2011; Safa, 2012).

Mesmo as hidrelétricas, que representam mais de 70% da produção de energia no país, embora consideradas como uma alternativa relativamente limpa, também contribuem para alterações ambientais, tendo participação no aquecimento global em decorrência da decomposição da matéria orgânica submersa (Alves & Uturbey, 2010).

3.2.1 Moluscos como bioindicadores

O monitoramento dos ambientes impactados pela ação humana torna-se essencial para manutenção da vida, a fim de detectar ameaças à sobrevivência das espécies e alterações incompatíveis com as relações naturais nestes locais. Para isso, o estabelecimento de organismos sentinela é uma estratégia relevante, considerando que esses organismos estão naturalmente presentes no ambiente, servindo como sensores naturais dos agravos acarretados pela poluição, e por isso denominados bioindicadores (Cheng & Sullivan, 1973, 1977; Duffy et al., 1999; Scofield et al., 1999; Fernandez et al., 2002; Santos et al., 2002; Tomanek & Sanford, 2003; EEA, 2005; Regoli et al., 2006; Kimbrough et al., 2008).

Diversos animais já foram estudados quanto à sua aplicabilidade como bioindicadores; e alguns já estão estabelecidos em protocolos oficiais de monitoramento ambiental aqui no Brasil (p. ex.: microcrustáceos, amfípodas, ouriços e peixes) (ABNT, 2004a; 2004b; 2006; 2007).

Por sua ampla distribuição ambiental e interação com o meio em que vivem, os moluscos aquáticos vêm ganhando cada vez mais interesse, e muitos são considerados excelentes para experimentação e emprego como bioindicadores de contaminação aquática (Fernandez et al., 2002; Rittschof & McClellan-Green, 2005; Gonzalez et al., 2009).

Em 1986, um amplo programa de monitoramento das águas costeiras dos Estados Unidos foi realizado investigando os moluscos nativos da região. O *Mussel Watch*, como foi denominado este programa, atestou os benefícios de empregar moluscos como indicadores de contaminação ambiental (Kimbrough et al., 2008).

Frantsevich et al. (1995) também utilizaram moluscos aquáticos para analisar os efeitos do acidente de Chernobyl, em relação à contaminação pelo ^{90}Sr e ^{137}Cs. A concentração desses radionuclídeos em algumas amostras coletadas no reservatório de Kiev durante o verão de 1986 ultrapassou 300 a 450 vezes os níveis de radioatividade natural anteriores ao acidente. Praticamente todo o ^{90}Sr presente nos moluscos estava concentrado nas conchas, e, em comparação com moluscos terrestres, os espécimes aquáticos apresentavam níveis de contaminação 3 a 4 vezes menor.

Fernandez et al. (2002) e Santos et al. (2002) analisando moluscos *Thais haemastoma* e *Buccinum undatum*, respectivamente, verificaram o impacto da poluição de ambientes aquáticos por compostos derivados orgânicos do estanho utilizados principalmente como antiincrustantes em cascos de navios, embora sejam também utilizados como acaricida e fungicida na agricultura.

Estes compostos são capazes de ocasionar desregulação endócrina que leva à ocorrência de impossex, isto é, o desenvolvimento de caracteres sexuais masculinos em fêmeas de moluscos gastrópodes, o que pode levar à esterilização e morte dos organismos afetados. Santos et al.(2002) verificou ainda alterações enzimáticas nas fêmeas afetadas pelo imposex. Os autores observaram redução da atividade da enzima P450 e aumento da atividade da NADH citocromo C redutase.

Shaw et al. (2004) estudaram 12 pontos do mar Mediterrâneo, dos quais 3 não foram considerados contaminados, 5 estavam medianamente contaminados e 4 foram considerados contaminados. Os resultados mostraram interferências nos níveis da enzima citocromo P450 na glândula digestiva de moluscos *Mytilus galloprovincialis* dos locais contaminados. A proteína P4501A estava elevada nos organismos nestes locais, enquanto que a proteína P4503A estava reduzida. Sabe-se que a primeira está envolvida na biotransformação de contaminantes orgânicos (ex. PAHs e PCBs), enquanto que esta última tem sido relatada como catalisadora na hidroxilação de hormônios esteróides. O

resultado encontrado pelo grupo denota uma provável poluição por contaminantes orgânicos nestes locais.

E, como observado nas citações anteriores, o caramujo *B. glabrata* também foi apontado por diversos autores como um potencial bioindicador de contaminação ambiental.

3.2.2 Biomarcadores

Quando submetido a condições de estresse, os organismos adotam estratégias para se defender, como por exemplo, o aumento de enzimas detoxificantes e alterações comportamentais, que nem sempre são suficientes para reverter os prejuízos decorrentes do estímulo negativo. Essa capacidade que os seres vivos possuem para iniciar um grande número de respostas adaptativas ao estresse é altamente conservada entre os diversos táxons, e desempenha um papel central e obrigatório na resposta aos danos ambientais (Rittschof & McClellan-Green, 2005; Gupta et al., 2010; Schreck, 2010).

É possível estimar quando um organismo está sob condições de estresse, observando as tentativas de reverter a agressão por meio de alterações biológicas e comportamentais. Dessas alterações, surgiu o termo *biomarcador*, definido por McCarty & Munkittrick (1996) como sendo medidas da função biológica em níveis sub-orgânico, fisiológico e comportamental, expressas após exposição do organismo a agentes estressores. Os biomarcadores podem ser utilizados na prevenção, detecção precoce e tratamento dos danos. A figura 4 esquematiza as possíveis rotas de manifestação dos efeitos de um estressor ambiental (NAS/NRC, 1989; Amorim et al., 2003).

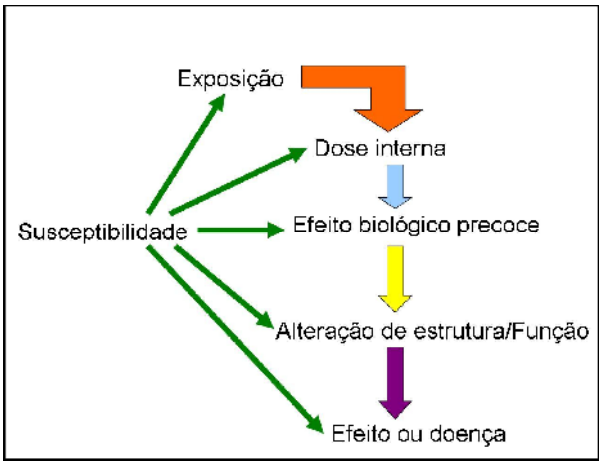

FIGURA 4. Fluxo de efeitos que podem ser ocasionados por estresse ambiental (adaptado de NAS/NRC, 1989 e Gonzalez et al., 2009).

Sistemas biológicos são considerados ferramentas sensíveis e promissoras para o monitoramento de estresses ambientais. O monitoramento do impacto do ambiente sobre o organismo vivo é de grande importância para prever e evitar os efeitos prejudiciais à manutenção da espécie, e pode ser baseado em mudanças medidas em vários níveis de complexidade nos seres vivos, como resumido na Figura 5 (NAS/NRC, 1989; Amorim et al., 2003; Gonzalez et al., 2009).

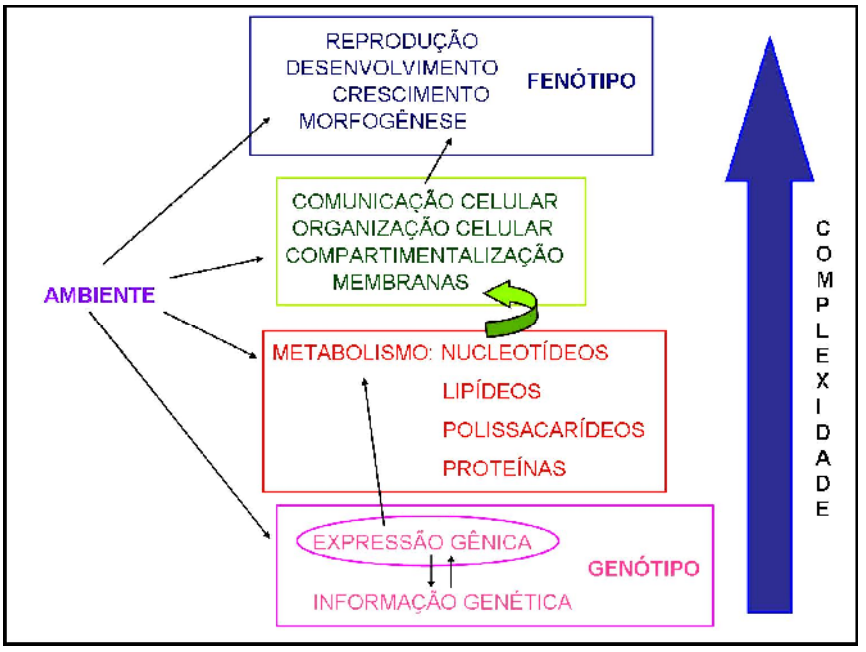

FIGURA 5. Hierarquia dos níveis de complexidade dos sistemas vivos que sofrem influência do ambiente (adaptado de Gonzalez et al., 2009).

Como demonstrado na figura 5 o nível do dano e a manifestação da resposta também devem ser levados em consideração nos estudos com biomarcadores. Por exemplo, lesões no DNA nem sempre implicam em distúrbios funcionais, podendo ocorrer a recuperação do efeito lesivo antes que seja transcrito o produto final; assim, a investigação dos prejuízos decorrentes da contaminação ambiental, se realizada em moléculas mais diretamente envolvidas nas funções bioquímicas do organismo, pode ser mais efetiva para determinar a ocorrência de danos fisiológicos (Azevedo & Chasin, 2003; Ribeiro et al., 2003).

As proteínas, por exemplo, sob condições fisiológicas são continuamente ameaçadas por fatores externos desde os primeiros momentos de sua existência. Em uma proteína nativa, os aminoácidos estão dispersos ao longo de sua cadeia polipeptídica, e apenas após o dobramento da proteína eles começam a interagir se ligando uns aos outros, determinando a estrutura conformacional da molécula proteica (Liberek et al., 2008).

A estrutura conformacional da proteína é essencial para que esta desempenhe suas funções. As proteínas devem ter uma estabilidade estrutural grande o suficiente para evitar que mudanças em sua conformação inativem sua capacidade funcional; entretanto, deve haver um balanço entre a estabilidade e a flexibilidade conformacional da molécula, visto que durante sua atuação as proteínas fazem ligações com outras estruturas presentes na célula, o que requer uma flexibilidade para permitir uma alteração rápida e precisa em seu arranjo estrutural, compatível com a interação (Somero, 1995; Somero, 2003).

A grande quantidade de moléculas trabalhando no meio celular, e as rápidas mudanças do ambiente externo são capazes de interferir nos processos de dobramento das cadeias polipeptídicas recém-sintetizadas e promover perda na conformação nativa da proteína. Isto leva não apenas a depleção no número de proteínas funcionais no organismo, mas também à agregação entre polipeptídeos (Liberek et al., 2008).

Quando estão sendo sintetizados, os peptídeos que constituem a proteína encontram-se com suas cadeias laterais desprotegidas aumentando sua tendência de formar agregados; Tartaglia et al. (2007) afirmaram que o nível de expressão gênica se mostra inversamente correlacionado com as taxas de agregação de suas respectivas proteínas, sugerindo que no ambiente celular as proteínas possuem uma margem de segurança muito pequena em relação aos desequilíbrios fisiológicos que favorecem a agregação polipeptídica.

Neste sentido, alguns grupos têm se dedicado a estudar as proteínas de choque térmico (HSPs-*heat shock proteins*), também conhecidas como proteínas do estresse (*SPs-Stress Proteins*).

3.2.2.1 As proteínas de choque térmico (HSPs)

As HSPs estão envolvidas na preservação do equilíbrio proteico do organismo, reestruturando proteínas alteradas ou encaminhando as proteínas com danos irreversíveis para serem eliminadas (Meyer & Silva, 1999; Piano et al., 2004; Farcy et al., 2007). Estas

são chaperonas[4], bem conservadas filogeneticamente, o que já oferece um indicativo do seu importante papel nos processos fundamentais para a célula; cujas funções incluem, entre outras: desenovelar proteínas com acomodação inadequada, possibilitando novo enovelamento, conectar peptídeos, renaturar peptídeos lesados, solubilizar agregados proteicos e transportar proteínas (Meyer & Silva, 1999; Bierkens, 2000; Kregel, 2002; David et al., 2005).

Quando a agregação proteica forma estruturas danosas ao equilíbrio celular, cabe à célula não apenas o processamento dos peptídeos agregados, mas principalmente assegurar que quantidades suficientes das proteínas responsáveis por suas funções fisiológicas estejam presentes. A célula pode processar os agregados proteicos de duas maneiras, seja por meio da proteólise, originando um "pool" de aminoácidos que poderão ser utilizados em novas sínteses proteicas, ou desagregando os peptídeos e reestruturando a proteína em sua conformação nativa, tornando-a novamente funcional. Embora a célula possa utilizar os dois processos, a desagregação é preferencial, visto que há menos gasto de energia envolvido neste processo, e menos subprodutos para a célula administrar (Liberek et al., 2008).

Por tais características, os estudos sugerem a aplicação dessas moléculas como marcadores de contaminação ambiental (Sanders, 1993; Sanders & Martin, 1993; Mukhopadhyay et al., 2003).

A primeira evidência destas proteínas foi observada por Ritossa em 1962, cujos resultados foram complementados por suas novas observações em 1964. Suas pesquisas constataram que pufes de cromossomos politênicos de glândula salivar de *Drosophila busckii* foram ativados após exposição ao calor de 37 °C por 30 minutos, ao dinitrofenol, a salicilatos, e também em resposta à anaerobiose, à azida sódica e ao dicumarol. Estes resultados levaram aos primeiros indícios da existência das proteínas HSPs codificadas na região ativada, o que foi posteriormente confirmado por Tissiéres et al. (1974) em glândula salivar de drosófilas (*Drosophila melanogaster*) expostas ao calor, que resultou na síntese de uma série de novas proteínas com massa molecular de 26 e 70 kDa, assim denominadas proteínas de choque térmico ou proteínas de estresse.

3.2.2.1.1 A HSP70

[4] Chaperonas são proteínas que asseguram a correta conformação de outros polipeptídeos *in vivo*, à medida que eles emergem do ribossomo, mas que não são componentes dessas estruturas formadas (Borém & Vieira, 2005).

A classe das HSPs é dividida em famílias, de acordo com suas seqüências de aminoácidos e pesos moleculares, que podem variar desde proteínas grandes com mais de 100 kDa, até proteínas pequenas como a ubiquitina de 8 kDa (Moseley, 2000; Kregel, 2002; Gupta et al., 2010; Al-Whaibi, 2011).

Entre as diversas famílias, a família das HSPs de 70 kDa é considerada a mais conservada entre os diversos filos, com mais de 50% de homologia entre organismos tão diferentes quanto o homem, a drosófila, o camundongo, a levedura e as bactérias (Lindquist, 1986); também é a mais abundante e bem caracterizada, e, está envolvida nos processos gerais de dobramento das proteínas celulares e quebra de agregados proteicos (Sanders, 1993; Meyer & Silva, 1999; Lacoste et al., 2001; Gupta et al., 2010).

Sob condições de estresse, as HSPs da família 70 se associam, preferencialmente, a complexos e organelas sensíveis a mudanças no ambiente celular como os pré-ribossomos, os snRNPs e os ribossomos, desse modo, protegendo o processamento do RNA e a síntese proteica, o que, por sua vez, permite aos tecidos críticos se recuperar de danos induzidos pelo ambiente (Sanders, 1993; Gupta et al., 2010). Também é sabida sua localização nuclear, citoplasmática e mitocondrial (Moseley, 2000); e Zahor et al. (2010) revelaram a presença da proteína na região perinuclear, embora não dentro do núcleo.

A proteína HSP70 é regulada por fatores de transcrição (HSFs) presentes no citosol, ligados à proteína, e mantidos em um estado inativo. Uma grande variedade de estímulos pode ativar esses fatores de transcrição separando-os da proteína HSP. Os HSFs são fosforilados por proteínas quinases e formam trímeros no citosol, capazes de entrar no núcleo e se ligar aos elementos de choque térmico (HSE) na região promotora do gene hsp70. O HSP70 mRNA é então transcrito e deixa o núcleo para o citosol, onde a HSP70 será sintetizada (FIG. 6) (Kregel, 2002; Amano et al., 2012).

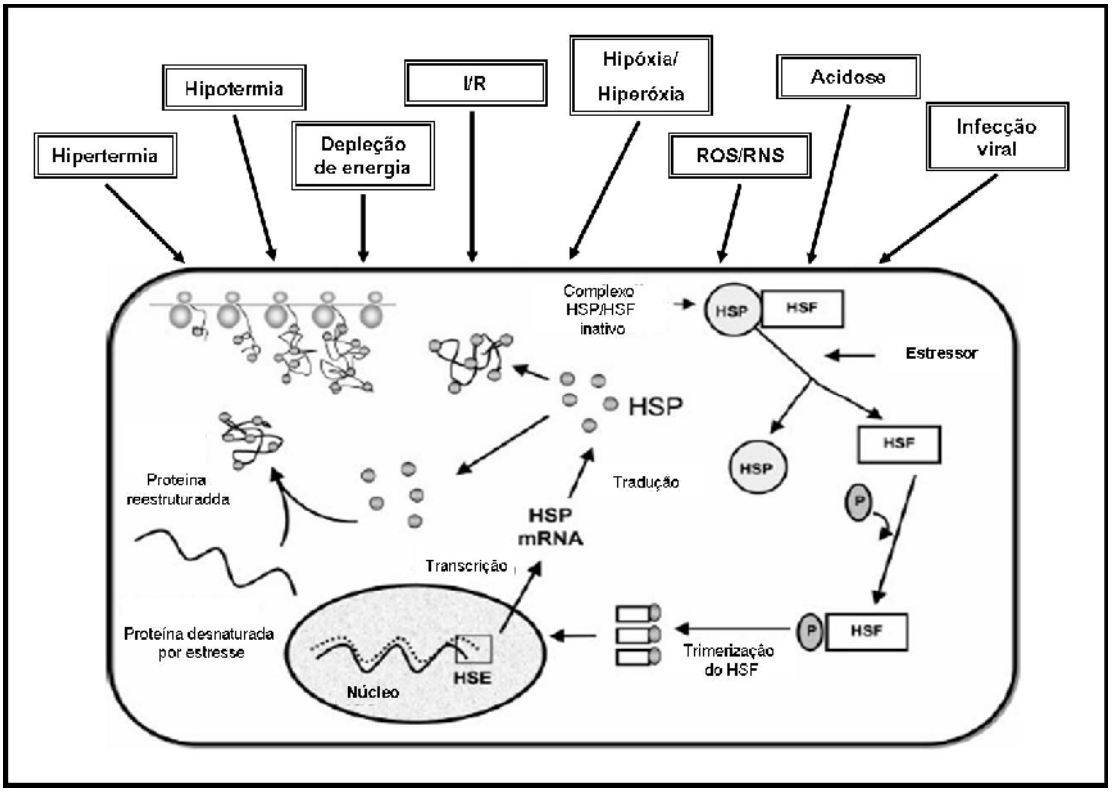

FIGURA 6. Sinais fisiológicos que ativam a expressão da HSP70 (adaptado de Kregel, 2002). (I/R: Isquemia/Reperfusão; ROS: Espécies reativas de oxigênio; RNS: Espécies reativas de nitrogênio).

Quando os danos na proteína são tão intensos que a HSP70 não consegue restaurá-la à sua conformação nativa, esta proteína danificada é carreada até os lisossomos onde será digerida, sendo que a HSP70 funciona, também, como transportadora da molécula comprometida (Powers & Workman, 2007).

A família HSP70 desfaz os agregados protéicos, transferindo os polipeptídeos para uma proteína da família HSP100, onde serão desdobrados dentro de um canal central por meio da hidrólise do ATP, e liberados para redobramento espontâneo ou por assistência de outras chaperonas. Existe ainda a possibilidade que o sistema chaperona HSP70, além de encaminhar o peptídeo para desdobramento pela HSP100, possua ainda um papel de regulação do ciclo da ATPase durante o processamento do peptídeo na HSP100 (Liberek et al., 2008; Al-Whaibi, 2011) (FIG. 7).

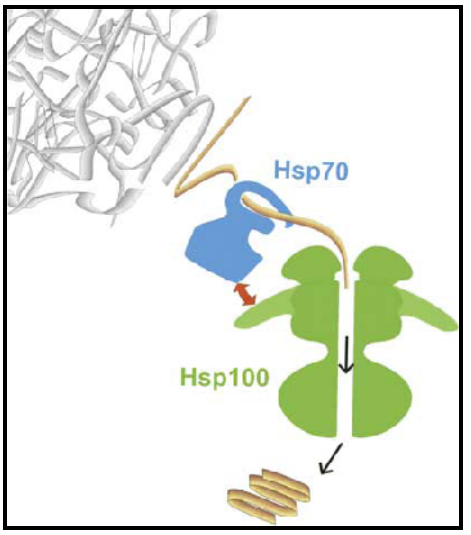

FIGURA 7. Modelo do mecanismo de ação do sistema de chaperonas no processo de desagregação dos polipeptídeos (Liberek et al., 2008).

A proteína HSP70 exerce suas funções em conjunto com muitos outros co-fatores, entre eles HSPs de outras famílias (Moseley, 2000; Powers & Workman, 2007). Em mamíferos, por exemplo, os polipeptídeos nascentes do ribossomo sofrem dobramento pela HSP70 que é estimulada pela HSP40 como co-fator (Young et al., 2004).

Trabalhos relatam também o papel da HSP70 nos mecanismos de resposta imune dos organismos (Moseley, 2000). Foi demonstrado em ratos que epítopos da HSP70 de *Plasmodium falciparum* são reconhecidos por anticorpos, promovendo resposta imune (Kumar & Zheng, 1998). Estudos sugerem também que a proteína HSP70 produzida pelo parasita *S. mansoni* seja altamente imunogênica e interfira com vários mecanismos imunes do hospedeiro intermediário *B. glabrata*. Alguns trabalhos sugerem que a proteína HSP70 no molusco sofre interferência dos produtos secretados pelo *S. mansoni*, o que evitaria o reconhecimento e ataque do verme pelo sistema imune do caramujo *B. glabrata* (Ittiprasert et al., 2009; Zahor, 2010); outros sugerem o oposto, que a proteína está envolvida com os mecanismos imunes do molusco, estando presente em caramujos resistentes ao verme e inibida nos caramujos susceptíveis (Lockyer et al, 2004; Lockyer et al, 2008).

3.2.2.2 HSPs e o calor

A definição de calor é bastante relativa, visto que uma temperatura moderada pode ser considerada fria para animais adaptados a temperaturas extremas, contudo essa mesma temperatura pode ser considerada quente para organismos adaptados ao frio. Assim uma

definição bastante pertinente de calor para esse trabalho é estabelecida por Holmstrup et al. (2010) como sendo “a temperatura acima do limiar natural a que o organismo está adaptado”.

O aquecimento foi um dos primeiros estímulos a partir do qual se observou indução das HSPs, podendo ser considerado um controle positivo para os experimentos. Esse agente físico é capaz de inativar pontes dissulfeto responsáveis por manter a estrutura nativa das proteínas, e alguns trabalhos sugerem também que a exposição ao calor aumenta a produção de radicais livres no meio, interferindo com as moléculas ali presentes (Considine et al, 2007; Kim et al., 2007).

O calor altera a solubilidade das proteínas; em geral a solubilidade de uma proteína é aumentada em temperaturas entre 40 e 50 °C; quando a temperatura é muito elevada, durante um intervalo de tempo, a proteína é então desnaturada. O calor interfere com as ligações não-covalentes (p. ex.: ligações iônicas, pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas) envolvidas na estabilização da estrutura secundária e terciária da proteína. Quando a estrutura secundária e terciária da proteína é desdobrada, os grupamentos hidrofóbicos interagem reduzindo a ligação com a molécula de água. Interações hidrofóbicas levam à agregação, seguida da coagulação e precipitação. A solubilidade de proteínas desnaturadas é menor do que em seu estado nativo, e leva à agregação com uma reversão mais difícil após o esfriamento (Pelegrine & Gasparetto, 2005).

O choque térmico em temperaturas letais foi referido como um indutor da transição de permeabilidade mitocondrial, confirmado pela liberação de citocromo C (Samali et al., 1999).

Os efeitos do calor que levam à morte do organismo são, freqüentemente, difíceis de avaliar. Observou-se que o excesso de calor, além de desnaturar e coagular proteínas, aumenta a viscosidade do protoplasma, o que é acompanhado pelo aparecimento de vacúolos e liberação de cálcio dentro das células. Também foi sugerido que os complexos de lipídios e proteínas ligados ao cálcio são rompidos pelo excesso de calor. O cálcio liberado no meio celular tem a capacidade de interferir com a permeabilidade da membrana plasmática e os sistemas membranosos celulares (Wood, 1973).

Em outros casos o calor interfere com a excreção dos produtos tóxicos originados pelo metabolismo, que interfere com o pH do meio celular. Nos mamíferos a morte pelo calor também parece estar relacionada com uma incapacidade para osmo-regulação; a perda de água determina uma maior viscosidade no sangue, aumentando o esforço do coração para bombeá-lo, resultando que o calor produzido pelo metabolismo não pode ser

facilmente dissipado pela superfície corporal, além da redução nos níveis de oxigênio para os tecidos, motivada pela viscosidade do sangue (Wood, 1973).

3.2.2.2.1 Termotolerância

A termotolerância pode ser definida como a capacidade que um choque térmico subletal tem de induzir a resistência a uma exposição subsequente a uma temperatura elevada, que de outro modo seria letal, sendo observada uma correlação positiva entre as HSPs e esta resposta (Lindquist, 1986; Lindquist & Craig, 1988; Frankenberg et al., 2000).

Estudos nos quais uma pré-exposição a uma temperatura subletal, seguida por uma exposição a uma temperatura elevada, resultaram em um incremento na sobrevivência dos organismos a temperaturas letais. Essa abordagem foi realizada tanto em cultura de células (Anderson et al., 1988; Samali et al., 1999), quanto em uma ampla variedade de organismos, incluindo bactérias (Boutibonnes et al., 1992), fungos (Ferreira et al., 2005), insetos (Carretero et al., 1991; Kalosaka et al., 2009), plantas (Ahn, 2004; Amano et al., 2012), equinodermos (Sconzo et al., 1986), microcrustáceos (Frankenberg et al., 2000), rotíferos (Smith et al., 2012) e moluscos (Brun et al., 2009; Jackson et al, 2011). Os trabalhos também mostram correlação da termotolerância com proteínas de choque térmico, principalmente a HSP70.

Samali et al. (1999) observaram em seu estudo da termotolerância em cultura de células Jurkat que as HSPs estão envolvidas também na proteção contra a destruição celular, bloqueando a apoptose. Os autores sugerem as HSPs como um mecanismo macromolecular de reparo celular e estratégia de defesa contra desafios subseqüentes.

Também é sabido que o calor pode desempenhar um papel no processo de resistência cruzada, definida como o processo no qual a administração de um estresse moderado protege a célula contra um estresse subseqüente que de outro modo seria letal. Este fenômeno sugere que certos tipos de estresse têm processos celulares em comum (Kim et al., 2007). Bond e Bradley (1995) verificaram o papel protetor da HSP70 no microcrustáceo D*aphnia magna*, quando exposições prévias a temperaturas subletais (32 e 34 °C) proporcionaram maior proteção contra os efeitos tóxicos do inseticida malation.

Tedengren et al. (2000) analisando parâmetros fisiológicos como clearance, consumo de oxigênio e crescimento mostraram que pré-exposição de moluscos *Mytilus edulis* (*M. edulis*) a temperaturas elevadas aumentou sua tolerância ao cádmio. O pré-aquecimento não apenas aumentou os níveis da HSP70, como também conferiu maior resistência ao cádmio, visto que as taxas de filtração do animal se mantiveram inalteradas,

e apenas pequenas alterações no crescimento foram observadas após exposição ao metal. O trabalho indicou que uma pré-exposição a um fator de estresse aumenta a resposta protetora a um estresse subseqüente. Analisando esses agentes separadamente, os autores afirmaram que a temperatura foi mais impactante na produção de HSP70 do que o metal.

3.2.2.3 As HSPs no monitoramento ambiental (estudos em moluscos e outros filos)

Por seu papel na manutenção da homesostase proteica do organismo, e considerando a importância das proteínas para as diversas funções fisiológicas, as proteínas HSPs vêm sendo estudadas como um promissor biomarcador de estresse ambiental, seja por agentes potencialmente poluentes, seja por estímulos naturais em condições fora dos padrões normais de sobrevivência.

Visando à aplicação das HSPs na avaliação de estresse ambiental em moluscos, diferentes estímulos já foram testados.

Lacoste et al. (2001) analisaram o efeito da sinalização neuroendócrina na indução dos genes promotores da HSP70 em hemócitos de ostras *Crassostrea gigas* (*C. gigas*) e abalones *Haliotis tuberculata*. Os achados do Western blot mostraram que a noradrenalina e os receptores α-adrenérgicos estão relacionados com a indução genética e a síntese protéica da HSP70, respectivamente.

Tomanek e Sanford (2003) analisaram o efeito das condições do habitat na produção de HSP70 em moluscos do gênero *Tegula*, submetendo espécimes habitantes de regiões de submaré à realocação para áreas de maré mais alta, onde os moluscos foram submetidos a uma maior freqüência de ondas, e a uma maior temperatura conseqüente à exposição solar. O Western blot comprovou a maior produção de proteínas HSP70 nesses animais realocados para áreas de maré mais alta.

A primeira caracterização da resposta gênica de ostras *C. gigas* à exposição a hidrocarbonetos foi realizada por Boutet et al. (2004), que observaram por RT-PCR e ELISA a indução de várias proteínas envolvidas na detoxificação de hidrocarbonetos (Cyp, citocromo b_5, flavina monooxigenase, glutationa S-transferase) e na proteção contra o estresse oxidativo (SOD), além da HSP70 cuja expressão foi duas vezes maior nos animais expostos do que nos animais controle.

David et al. (2005) investigaram o efeito da hipóxia sobre a quantidade de proteínas HSP70 de ostras *C. gigas*. Esses autores conseguiram observar, por meio do ELISA, uma indução na expressão das proteínas em brânquias e glândula digestiva dos animais submetidos à hipóxia.

Cellura et al. (2006) constataram indução no gene hsp70 de *Mytilus galloprovincialis* expostos a aumento de temperatura e injeção de bactérias *Vibrio anguillarum* mortas pelo calor. Níveis significativos de indução da resposta proteica foram observados através de PCR quantitativa após 3 horas da exposição ao calor e 12 horas após injeção das bactérias.

Farcy et al. (2007) analisaram o efeito da radioatividade natural e das flutuações de temperatura sobre a expressão proteica das HSP70, HSP72 e HSP90 de ostras *C. gigas* utilizando PCR quantitativa. Corroborando os achados de Bradley e Ward (1989) em seu trabalho com microscrustáceos *Daphnia magna*, os níveis de expressão das HSPs apresentaram correlação negativa com as baixas temperaturas do ambiente onde os animais foram coletados; entretanto, não foi possível realizar alguma correlação entre os níveis de radioatividade e os níveis de expressão proteica analisados.

Brun et al. (2008) examinaram o efeito do estresse térmico na indução da HSP40 e HSP70 em moluscos estuarinos *Argopecten irradians* e oceânicos *Placopecten magellanicus*. Os resultados do ELISA e do Western blot demonstraram que depois de ser submetido por 24 horas a uma variação de temperatura de 10 para 20 °C, o *P. magellanicus* apresentou resposta significativa de estímulo à produção de ambas HSPs; o *A. irradians*, por outro lado, apresentou a mesma resposta após uma variação de temperatura de 20 para 30 °C durante três horas. Esses autores também encontraram estímulo à produção das duas HSPs em *A. irradians*, quando a temperatura caiu de 20 para 3 °C durante três horas, ratificando os resultados de outros autores de que as HSPs são induzidas sob estímulos tanto de aquecimento quanto de redução da temperatura (Bradley & Ward, 1989; Farcy et al., 2007).

Fei e Feng (2008), por meio de Western blot, analisaram o efeito da hipóxia e da suplementação com O_2 sobre a HSP70 de caramujos *Lymnaea stagnalis*. Os resultados mostraram indução da proteína nos animais submetidos apenas à hipóxia, e também nos submetidos à suplementação com 80% de oxigênio. A suplementação de oxigênio a 40% reduziu os níveis de HSP70 nos moluscos, se comparados aos níveis dos animais suplementados com 80% de O_2; embora, quando comparados aos animais controle, esses níveis tenham se mostrado ainda significativamente altos.

Jara e Wiegand (2008) utilizaram o mexilhão-zebra *Dreissena polymorpha* como indicador dos efeitos da renaturalização de uma área urbana de Berlim, previamente utilizada como depósito de esgoto tratado. A análise por PCR quantitativa da expressão de HSP70 nas brânquias dos moluscos implantados na área renaturalizada mostrou níveis

elevados, se comparados aos moluscos do grupo controle mantido em laboratório. Comparando com moluscos de uma área urbana próxima da área renaturalizada, não foram observadas diferenças significativas nos níveis de expressão da HSP70. Os altos níveis de organoclorados e metais encontrados nessas áreas justificam a indução de HSPs nos moluscos.

Também já se observou que a exposição ao cádmio induziu a expressão da HSP70 em brânquia e glândula digestiva de ostras *Ostrea edulis* (*O. edulis*) (Piano et al., 2004) e *Crassostrea virginica* (*C. virginica*) (Ivanina et al., 2009).

Todos estes trabalhos apresentados aumentam as evidências de que as HSPs de moluscos são um excelente marcador de estresse decorrente de alterações ambientais.

Até o momento, segundo nosso conhecimento, o único trabalho estudando a HSP70 do *B. glabrata* analisou os efeitos da infecção pelo *S. mansoni*, onde foi demonstrado que o parasita interfere com a HSP70 do caramujo, modificando a resposta imune. Entretanto, nenhum trabalho foi realizado avaliando os efeitos de agressões ambientais sobre a resposta da proteína neste molusco.

A primeira seqüência da proteína no caramujo *B. glabrata* foi relatada por Laursen et al. (1997), que analisou a resposta de células embrionárias deste molusco frente a exposições a temperaturas estressoras. As temperaturas subletais de 30, 37 e 43 °C por uma hora produziram um padrão de peptídeos visualizados pela marcação com [^{35}S]metionina. As temperaturas de 30 e 43°C induziram um perfil similar de peptídeos; em 37 °C, além de peptídeos com tamanho aproximado de 70 kDa, novos peptídeos de 74, 41 e 21,5 kDa foram observados. O Nothern blot confirmou que a provável HSP70 não foi expressa constitutivamente ou a baixos níveis na temperatura basal.

Os autores postulam que a identidade de 70% dos aminoácidos da HSP70 da célula embrionária derivada do molusco *B. glabrata* com seu homólogo no *S. mansoni*, pode fornecer mais uma molécula compartilhada por ambos os organismos, o que pode contribuir para explicar o mecanismo utilizado pelo trematódeo para passar despercebido pelo sistema de defesa do caramujo.

Os resultados encontrados com as HSPs respondendo a estímulos ambientais em moluscos foram corroborados pela indução dessas proteínas em espécies de outros filos, conforme esperado visto a conservação filogenética desta molécula. Nos parágrafos seguintes foram selecionados alguns trabalhos demonstrando o papel das HSPs em resposta aos estímulos ambientais em outras espécies diferentes dos moluscos.

Estudos com peixes habitantes de regiões costeiras do Alasca correlacionaram a presença de HSPs (60 e 70) com a exposição ao mercúrio, sendo este metal considerado um poluente de grande relevância na região (Duffy et al., 1999; Scofield et al., 1999). Embora não tenha sido observada uma correlação direta entre a concentração do metal e a quantidade de HSPs presentes nos tecidos dos animais coletados do ambiente, os autores observaram uma relação entre a HSP60 e a HSP70, onde a primeira mostrou-se sempre mais elevada em relação à segunda.

Lee et al. (2006) observaram que a proteína HSP70 foi induzida por uma vasta gama de estímulos agressores em larvas de *Chironomus tentans*. Tanto estímulos químicos: metais tóxicos (cádmio, chumbo e cromo), inseticidas (organoclorado e organofosforado), polímeros, herbicida, estrógeno sintético e hidrocarboneto policíclico aromático; como estímulos físicos: aquecimento e hipóxia induziram tanto a porção indutível, como a porção constitutiva desta família nos organismos.

Eder et al. (2009) observaram que os inseticidas clorpirifós e esfenvalerato foram capazes de induzir HSP60, HSP70 e HSP90 em músculo e fígado de salmões jovens (*Oncorhynchus Tshawytscha*). Em nematódeos (*Caenorhabditis elegans*), a cipermetrina induziu HSP16 em concentrações subletais, a indução foi dependente da dose e concentração do inseticida (Shashikumar & Rajini, 2010).

3.2.3 O papel ambiental e biológico do cádmio

Os metais têm se destacado entre os agentes químicos mais estudados em relação a seus efeitos sobre o ambiente, visto que, embora naturalmente presentes na natureza, têm sido excessivamente liberados em decorrência das aplicações pelo homem, especialmente na indústria, que juntamente com a mineração, agricultura e processamento de combustíveis fósseis constituem as principais fontes que liberam estes elementos para o ambiente (Kimbrough et al., 2008).

Entre os metais, o cádmio tem recebido especial atenção como um poluente de importância para o meio ambiente.

O cádmio é um metal flexível, maleável, dúctil de cor cinza prateada. Na natureza existe na forma de 7 isótopos estáveis e um radioativo. Encontrado em minérios raros como a esfalerita e a greenockita (FIG. 8), o cádmio é formado como um subproduto da produção do zinco, cobre e chumbo. Na indústria é utilizado para fabricação de baterias, revestimentos anti-corrosivos, semicondutores, corantes e pigmentos. A maior parte do

cádmio chega à natureza por meio da mineração, fundição, combustão do carvão e petróleo, e incineração de resíduos. É relativamente imóvel, com concentrações no solo cerca de 80 vezes maiores do que na água intersticial (Joseph et al., 2007; Joseph et al., 2009).

FIGURA 8. Cristal de esfalerita (Composição - Sulfeto de zinco. 67,0% Zn, 33,0% S), e cristal de greenockita encravado em uma rocha (Composição - Sulfeto de cádmio. 77,8% Cd, 22,2% S). Fonte: Museu de Minerais e Rochas Heinz Ebert, 2012.

O cádmio está ranqueado como o 67° elemento em abundância entre os 90 elementos naturalmente presentes na terra. Grande quantidade deste metal é introduzida no ambiente tanto por fontes naturais quanto por atividades antropogênicas; sendo que esta última é 3 a 10 vezes mais eficaz para contribuir com a introdução do elemento no ambiente que as fontes naturais. A atividade vulcânica, combustão de fósseis, incêndios florestais e transporte pelo vento de partículas de solo contaminadas constituem as maiores fontes naturais de introdução do cádmio no ambiente (Joseph et al., 2009).

No ciclo do combustível nuclear o cádmio é de grande importância como um dos moderadores de nêutrons para controle da reação de fissão nuclear. Em decorrência disto, pode ocorrer a formação de diversos isótopos, incluindo o ^{113m}Cd presente no combustível nuclear queimado e nos resíduos associados à operação do reator e reprocessamento do combustível, podendo chegar ao ambiente no ciclo de resfriamento do reator onde ocorre interação da central nuclear com coleções hídricas. Traços de ^{113m}Cd estão presentes em todo o mundo em decorrência dos vapores produzidos nos testes nucleares (Joseph et al., 2007).

Considerado um poluente extremamente tóxico, o cádmio e capaz de produzir radicais livres, e de interagir com o mecanismo de transporte transmembrana através da competição com íons Ca^{2+}. Sua interação com os grupamentos sulfidrila presentes nas proteínas e seus mecanismos de redução do glutation aumentam os níveis de estresse oxidativo, acumulando proteínas alteradas no organismo em decorrência da produção de radicais livres (Sanders & Martin, 1993; Wirth et al., 2002; Kim et al., 2005; Ansaldo et al., 2006).

O cádmio é reconhecidamente um metal neurotóxico, que adentra o organismo pela ingestão ou inalação, atuando na inibição do cálcio nos neurônios, afetando a transmissão do impulso nervoso; também é nefrotóxico causando lesões no tecido tubular e glomerular devido à proteinúria. No sistema hematológico, o cádmio interfere na absorção do ferro pelas células do trato gastrintestinal, inibindo a síntese do heme. Devido à competição com o cálcio, e aumento da excreção deste juntamente com o fosfato pelos rins, a intoxicação pelo cádmio leva à desmineralização óssea e à osteomalácia, aumentando a probabilidade de fraturas (ATSDR, 2004; Gupta, 2007; Bernard, 2008).

Segundo a IARC (International Agency for Research on Cancer), o cádmio é considerado carcinogênico para humanos e animais. Trabalhos comprovam aumento na incidência de câncer de pulmão em trabalhadores de indústrias de processamento desse metal. Estudos com ratos também comprovaram aumento na incidência de leucemia, tumores de intestino, pulmão, próstata e testículos nos animais (IARC, 1993).

Entretanto sabe-se que o cádmio não é fortemente genotóxico e não causa dano direto no DNA, assim mecanismos como bloqueio da apoptose, alterações na sinalização celular, expressão gênica aberrante, inibição do reparo no DNA e indução de estresse oxidativo podem estar envolvidos na carcinogênese originada pela intoxicação por este metal (Bernard, 2008; Joseph et al., 2009).

O cádmio interage no organismo alterando a integridade estrutural e funcional das membranas celulares, aumentando sua permeabilidade e gerando radicais livres no meio, onde se destaca a reação de Fenton, na qual o cádmio desloca íons cobre e ferro de vários sítios intracelulares, que dissociados reagem com o peróxido de hidrogênio do meio, formando o radical hidroxila, considerado extremamente tóxico para a célula. Além disso, os produtos da decomposição lipídica podem ocasionar ligações cruzadas caóticas entre proteínas e ácidos nucléicos, com importante papel na toxicidade induzida pelo cádmio (Renugadevi & Prabu, 2010).

Na intoxicação pelo cádmio também se observa aumento nos níveis de proteínas

carboniladas e decréscimo nos níveis dos tióis de proteínas, dois possíveis marcadores para oxidação de proteínas induzida por radicais livres. Outro mecanismo de alterações proteicas observado na intoxicação pelo cádmio é a interação do metal com grupamentos (o que inclui outros metais) ou moléculas de importância para a atividade das proteínas, especialmente enzimas. Em algumas situações os efeitos tóxicos do cádmio são tão intensos que a ação dos antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos é tão requisitada levando a inibição de sua atividade pela depleção dessas moléculas (Pena et al., 2007; Renugadevi & Prabu, 2010).

Pena et al. (2007) mostraram que em contaminações com baixas concentrações de cádmio a atividade do proteassoma 20S (uma protease compartimentalizada localizada no núcleo e citoplasma dos eucariotos) é aumentada devido ao acúmulo moderado de proteínas oxidadas no meio; ao contrário, em contaminações com alta concentração do metal a atividade do porteassoma 20S é reduzida com concomitante acúmulo de proteínas oxidadas e ubiquitinadas na célula.

Xuan et al. (2011) analisaram os efeitos da exposição do cádmio sobre caranguejos *Sinopotamon yangtsekiense*. Os resultados mostraram alterações nos parâmetros medidos, com aumento na mobilização de proteínas e carboidratos. Os efeitos deletérios foram expressos após uma exposição longa (21 dias) às concentrações mais altas do metal (2,9 ppm). Os autores observaram decréscimo nos níveis de glicogênio, com transição do mecanismo aeróbico do ciclo de Krebs para o mecanismo anaeróbico de glicólise, necessário para o caranguejo reforçar a demanda energética durante a intoxicação pelo cádmio, manifestada pela inibição na síntese de ATP e ineficiência no metabolismo oxidativo mitocondrial. A deficiência na eliminação do lactato foi presumida como um dos efeitos tóxicos do cádmio no caranguejo.

Uma das alternativas para atender a demanda energética é a utilização de proteínas. Visto que os caranguejos possuem quantidade limitada de carboidratos, o aumento da atividade de proteases no músculo e hepatopâncreas foi outro efeito observado por esse grupo. Com o passar do tempo, no entanto, a síntese de proteínas detoxificadoras foi maior que a quebra de proteínas no hepatopâncreas.

Outros trabalhos previamente citados mostraram a interferência do cádmio com os mecanismos fisiológicos dos organismos, desencadeando outras alterações no que concerne à manutenção da vida, como por exemplo: alterações na sobrevivência, fecundidade e fertilidade, depleção energética, inibição do crescimento, diminuição da sobrevivência, entre outros (Ravera, 1991; Abd Allah et al.,1997; Abd Allah et al., 2003;

Piano et al., 2004; Ansaldo et al., 2006; Lee et al., 2006; Ansaldo et al., 2009, Ivanina et al., 2009).

Muitos estudos foram realizados no intuito de investigar as interações ambientais do cádmio; e embora os resultados não sejam consistentes para todos os membros deste extenso e heterogêneo grupo, a maioria dos trabalhos mostra que o cádmio interage com outros fatores ambientais, e os efeitos do metal são modificados dependendo do agente com que interage. A maior parte dos estudos aponta que os efeitos do cádmio são potencializados pelo calor, depleção de oxigênio, limitação de comida e infecção por patógenos (Holmstrup, 2010).

A ABNT (2000) recomenda a remoção do íon cádmio de efluentes líquidos através da precipitação do metal como sulfeto ou como hidróxido, com posterior separação do precipitado através de processos físicos de filtração e/ou espessamento. Esse processo possui a vantagem de ser uma tecnologia disponível, de fácil controle, realizada à temperatura ambiente, com alta eficiência de tratamento do efluente (> 99,0%), além da eliminação de outros elementos presentes, tais como cobre, cobalto, manganês, chumbo e níquel. Porém, possui a desvantagem de necessitar de um local para armazenar o precipitado gerado no processo, além de que a primeira necessita de controle na adição do sulfeto, sendo aplicável apenas para soluções com concentração de cádmio menor que 0,7 ppm.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Moluscos para experimentação

Foram utilizados caramujos *B. glabrata* adultos, pigmentados, sexualmente maduros, com 5 a 6 meses de idade, e diâmetro médio de concha de 14,4 (± 1,7) mm; cultivados no Laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan durante várias gerações (FIG. 9). Esses moluscos foram originalmente coletados em Barreiro (Belo Horizonte, MG). Os caramujos estavam negativos quanto à presença do *S. mansoni* e foram mantidos em aquários plásticos (medindo 50 x 23 x 17 cm), com cerca de 20 litros de água filtrada, declorada e aerada, na proporção de ± 300 mL de água por caramujo, e com conchas no fundo para obtenção de cálcio (FIG. 10). A água de cultivo apresentou pH ≅ 7,0 e temperatura média de 25 °C (± 2 °C), ocorrendo a troca mensal durante a manutenção dos cultivos. Os animais foram submetidos a ciclos de 8 horas no escuro e 16 horas sob luz fria fluorescente, alimentados diariamente com alface fresca (*Lactuca sativa*) *ad libitum*, e complementados nutricionalmente uma vez por semana com ração para peixes.

FIGURA 9. Caramujo *Biomphalaria glabrata* selvagem utilizado nos experimentos.

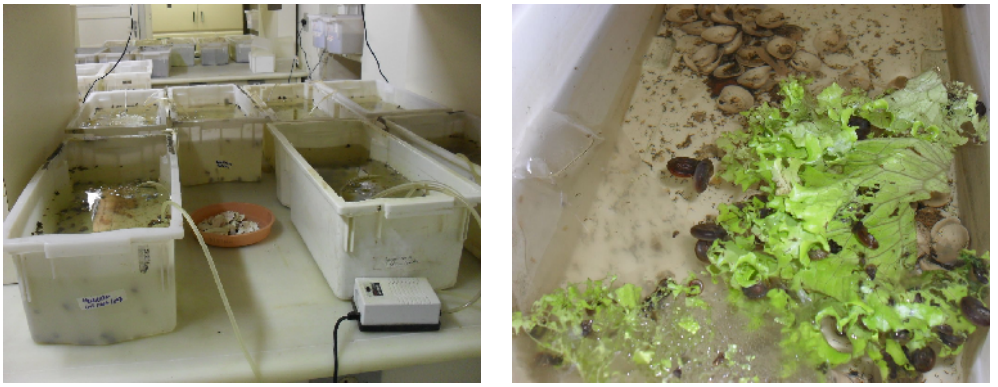

FIGURA 10. Criação de caramujos *Biomphalaria glabrata* no laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan.

4.2 Exposição dos animais ao calor para indução de termotolerância

Com base no protocolo estabelecido por Laursen et al. (1997), o estudo da resistência do caramujo *B. glabrata* ao calor e sua correlação com a proteína HSP70 foi realizado com grupos de 20 caramujos expostos às temperaturas de 30 (30,1 ±0,5), 33 (33,1 ±0,2) e 36 (35,9 ±0,1) °C por 120 horas, em estufa de demanda bioquímica de oxigênio (DBO), com um grupo de 20 caramujos não expostos ao calor mantido como controle (FIG. 11) para cada uma das temperaturas testadas. A alimentação dos animais foi administrada diariamente com alface *ad libitum*. Os caramujos foram mantidos em copos de vidro com capacidade para 180 mL vedados com tampa plástica, em água filtrada e declorada renovada a cada 48 horas, e mantida nas temperaturas de exposição à razão de 36 mL de água por caramujo.

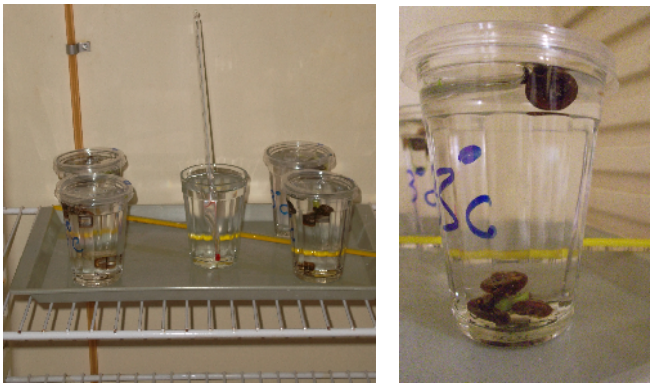

FIGURA 11. Caramujos *Biomphalaria glabrata* expostos ao calor em estufa DBO.

Ao fim de 120 horas os animais foram separados em dois grupos de 10 animais, um grupo exposto a 42 °C para análise da sobrevivência, e um grupo dissecado para extração da glândula digestiva, cabeça/pé e ovoteste para análise da proteína HSP70. A sobrevivência foi medida considerando o tempo médio de sobrevivência, caracterizado como o intervalo no qual metade dos animais sobreviveram à exposição à temperatura letal.

Os caramujos expostos a 42 °C, em banho-maria, foram mantidos em copos de vidro com capacidade para 180 mL vedados com tampa plástica, em água filtrada e declorada, à razão de 36 mL de água por caramujo (FIG. 12), e alimentados durante a exposição com alface *ad libtum*. A mortalidade foi registrada a cada hora a fim de comparar a resistência à temperatura letal entre os grupos pré-expostos a 30, 33 e 36 °C e o grupo controle não pré-exposto ao calor, sendo o batimento cardíaco o parâmetro de escolha para confirmação da morte do animal, observado sob microscópio estereoscópico.

FIGURA 12. Caramujos *Biomphalaria glabrata* expostos ao calor (42 °C) em banho-maria.

4.3 Exposição dos animais ao cádmio para determinação da $CL_{50/96h}$ e dos efeitos sobre a proteína HSP70

Para a escolha das concentrações subletais a serem utlilizadas no estudo da indução da HSP70 foi realizado inicialmente um ensaio de toxicidade.

De acordo com o protocolo seguido por Ansaldo et al. (2006), os caramujos, divididos em grupos de 40 e 50 animais, foram expostos ao cádmio na forma $CdCl_2$ (Sigma Aldrich - C3141) nas concentrações de 0,09; 0,15; 0,22; 0,33; 0,5 ppm para os grupos com 40 animais e 0,7 ppm para o grupo com 50 animais, durante 96 horas; com um grupo

mantido como controle com 40 animais não expostos ao cádmio. Os animais, divididos em grupos de 5 indivíduos, foram colocados em copos de vidro com capacidade para 180 ml, contendo as soluções de cloreto de cádmio nas concentrações teste, renovadas a cada 48 horas. O copo foi vedado com tampa plástica para que o animal permanecesse em contato com a solução (FIG. 13). A exposição ocorreu à temperatura ambiente, e a alimentação dos animais foi diária com alface *ad libitum*.

Em seguida, foi construída a curva de sobrevivência para determinação da concentração letal para 50% da população de caramujos *B. glabrata* em 96 horas de exposição ($CL_{50/96h}$) ao cloreto de cádmio, com a ausência de batimentos cardíacos como característica da morte do animal. Os animais sobreviventes foram dissecados para extração e análise da proteína HSP70 na glândula digestiva.

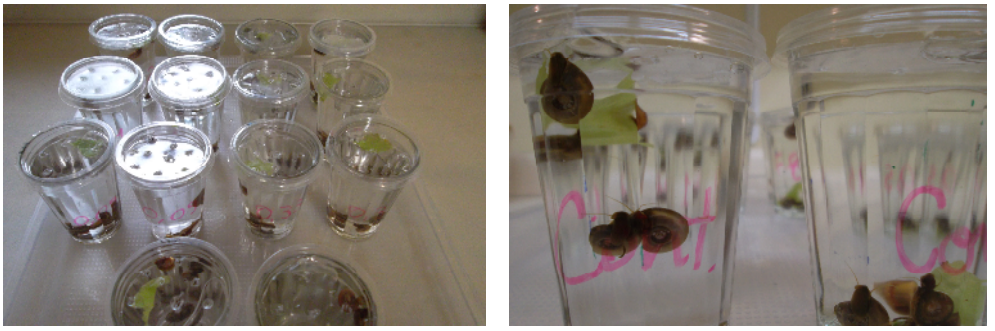

FIGURA 13. Exposição dos caramujos *Biomphalaria glabrata* ao cloreto de cádmio.

4.4 Estudos de resistência cruzada

Após a determinação nos experimentos anteriores da temperatura e concentração do metal cádmio ideais para indução da proteína HSP70 em condições subletais, os animais foram testados quanto à resistência aos estímulos do calor e metal em condições letais, também pré-determinadas em ensaios anteriores, após uma pré-exposição a esses estímulos, em condições subletais.

4.4.1 Calor/Cádmio

Após a pré-exposição ao calor em temperatura subletal, os caramujos foram submetidos ao cádmio em concentração letal, a fim de investigar se houve aumento na sobrevivência em relação ao grupo controle, não pré-submetido ao calor.

Os animais foram mantidos à temperatura de 33 °C por 120 horas em estufa DBO, mantidos em copos de vidro com capacidade para 180 mL vedados com tampa plástica, em água filtrada e declorada renovada a cada 48 horas, a uma proporção de 36 mL de água por indivíduo, e alimentados diariamente com alface fresca *ad libitum*.

Um grupo de 50 animais pré-expostos à temperatura de 33 °C foi exposto a 0,7 ppm de $CdCl_2$ dissolvido em água filtrada e declorada. A exposição foi realizada em copos de vidro com capacidade para 180 mL de solução, e outro grupo foi mantido como controle, não pré-exposto ao calor, porém exposto ao cádmio em concentração de 0,7 ppm. As soluções foram renovadas a cada 48 horas de exposição. Os animais foram mantidos a uma proporção de 5 animais por copo, totalizando 36 mL de solução por indivíduo, alimentados diariamente com alface fresca *ad libitum*. A mortalidade foi registrada diariamente para comparações entre o grupo pré-exposto ao calor e o grupo controle.

4.4.2 Cádmio/Calor

Após pré-exposição ao cádmio em concentração subletal, os animais foram submetidos ao calor em temperatura letal, a fim de investigar o aumento na sobrevivência em relação ao grupo controle, não pré-submetido ao cádmio.

Os animais foram mantidos por 96 horas em copos de vidro com 180 mL de solução a 0,22 ppm de $CdCl_2$, em uma proporção de 5 animais por copo, totalizando 36 mL de solução para cada indivíduo, e alimentados diariamente com alface fresca *ad libitum*. Os copos foram vedados com tampa plástica, e a solução foi renovada após 48 horas de exposição.

Um grupo de 35 animais pré-expostos a 0,22 ppm de $CdCl_2$ por 96 horas foi submetido a 42 °C em banho-maria a fim de avaliar a proteção à temperatura letal para o caramujo conferida pelo metal em concentrações subletais. A exposição foi realizada em copos de vidro com capacidade para 180 mL de água filtrada e declorada à temperatura de 42 °C, tampados com tampa plástica para que os caramujos ficassem em contato com a água. Durante a exposição ao calor os animais foram alimentados com alface *ad libitum*. Um grupo com 35 caramujos foi mantido por 96 horas como controle, sem pré-exposição ao cádmio, em seguida sendo submetido a 42 °C em banho-maria nas mesmas condições dos pré-expostos ao cádmio. A mortalidade dos animais foi registrada a cada hora a fim de comparar a resistência à temperatura letal entre o grupo pré-exposto a 0,22 ppm de cádmio e o grupo controle não pré-exposto ao metal.

4.5 Avaliação da proteína HSP70 na glândula digestiva dos caramujos

Após a exposição aos agentes estressores (calor e cádmio), os animais foram sacrificados para avaliação da presença da proteína HSP70 quando em condições letais e subletais, em relação aos grupos controle mantidos nas condições de criação, sem pré-exposição a nenhum estímulo físico ou químico.

Os caramujos foram sacrificados, e os tecidos extraídos e acondicionados em eppendorfs, na forma de pools de todos os animais testados. Para os animais testados no experimento para a determinação da $CL_{50/96h}$ do $CdCl_2$ os pools foram feitos com a glândula digestiva dos animais sobreviventes; entretanto, para os grupos que tinham mais de 5 animais sobreviventes à exposição ao cádmio os pools eram feitos com dois subgrupos dos sobreviventes. Nos experimentos nos quais os animais foram submetidos a estímulos subletais, a resposta da proteína HSP70 foi analisada nos pools de glândulas digestivas, cabeça/pé e ovoteste de 10 animais expostos ou mantidos como controle.

Os animais foram comprimidos entre duas placas de petri de vidro, para que a concha fosse quebrada pela pressão, cuidando para não esmagar o corpo do animal. Em seguida, os fragmentos de concha foram removidos sob visualização em microscópio estereoscópico (FIG. 14), e os caramujos foram dissecados para separação da glândula digestiva (cuidando para descartar as áreas de intersecção com o ovoteste), cabeça/pé e ovoteste (descartando as áreas de intersecção com a glândula digestiva), que foram acondicionados em eppendorfs a -80 °C até a realização da etapa de extração das proteínas totais.

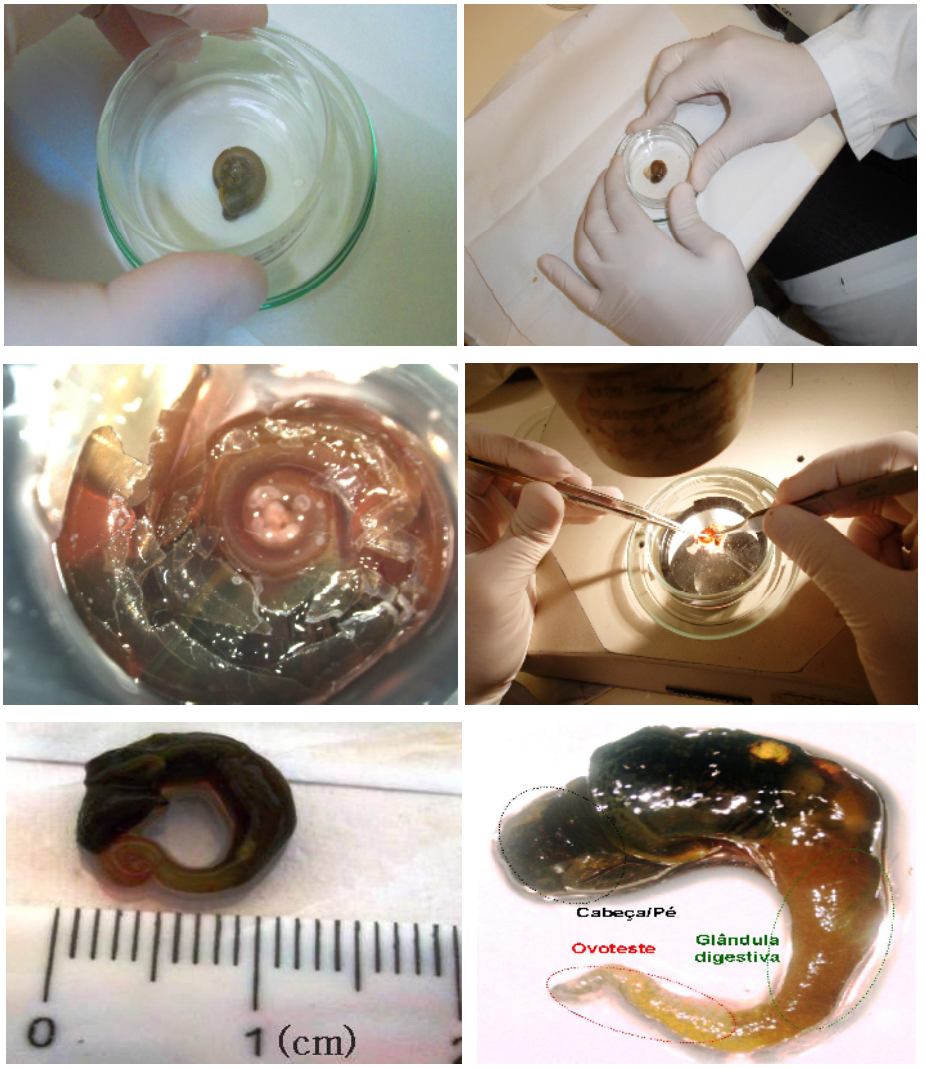

FIGURA 14. Dissecação do caramujo *Biomphalaria glabrata* para separação dos tecidos e extração das proteínas totais.

Seguindo a metodologia de Todeschini et al. (2007), as proteínas foram extraídas pela adição de tampão RIPA (25 mM Tris, pH 7,5; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA; 1% Triton X-100; 0,5% deoxicolato de sódio; 0,1% SDS) acrescido de coquetel inibidor de proteases (75 unidades aprotinina, 2 mM PMSF, 5 mM pirofosfato de sódio, 10 mM NaF e 5 mM ortovanadato de sódio). Após a adição do tampão RIPA, o tecido foi submetido a maceração, agitação em vórtex, permanência no gelo durante 45 minutos, e centrifugação a 14000 *g* por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi analisado em eletroforese SDS-PAGE, após quantificação das proteínas em espectrofotômetro NanoDrop.

A corrida eletroforética foi realizada com 100 µg de proteína para cada amostra, em gel de poliacrilamida a 10% durante 50 minutos sob uma ddp de 220 V e amperagem de

120 mA, em equipamento para mini-gel Mini-PROTEAN 3 Cell (BioRad). As proteínas foram transferidas do gel de corrida para uma membrana de nitrocelulose (0,45 µm) durante 60 minutos sob uma ddp de 150 V e amperagem de 350 mA em equipamento Mini Trans-Blot cell (Bio-Rad).

Em seguida, foi realizado o tratamento da membrana com anticorpo primário de coelho anti-HSP70 de *Trypanosoma brucei* (concentração de 1:1000), em seguida com anticorpo secundário de cabra anti-coelho (concentração de 1:2000), conjugado com peroxidase (Sigma Aldrich-A6154). O anticorpo primário foi gentilmente cedido pelo Dr. James D. Bangs da University of Wisconsin-Madison. A revelação foi feita com kit de quimioluminescência da Thermo Scientific (ECL Western Blot Substrate-32106). As imagens obtidas foram analisadas por meio do software ImageJ (Abramoff et al., 2004; Rasband, 2011), disponível para aquisição na internet via: http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html.

4.6 Determinação da curva tempo-resposta de indução da proteína HSP70

Sabendo que o calor e o cádmio induziram a proteína HSP70 no caramujo *B. glabrata*, foi realizado o experimento para determinar a curva tempo-resposta de indução da proteína.

Os caramujos, divididos em grupos de 10 indivíduos, foram expostos a 33 °C em estufa DBO, e 0,22 ppm de $CdCl_2$ à temperatura ambiente durante 120 e 96 horas, respectivamente. A exposição dos dois grupos foi realizada em copos de vidro com capacidade para 180 mL de solução. Outros 5 grupos de 10 caramujos foram mantidos como controle não expostos a nenhum agente estressor. Após a exposição ao metal e ao calor, os animais foram sacrificados para dissecação e extração da glândula digestiva para análise da proteína HSP70 a cada 24 horas, sendo que os grupos expostos ao cádmio foram sacrificados após 24, 48, 72 e 96 horas de exposição ao metal, e os grupos controle e expostos ao calor foram sacrificados após 24, 48, 72, 96 e 120 horas após o início do experimento.

4.7 Análise estatística dos resultados

Os valores obtidos nos estudos dos diferentes grupos experimentais foram submetidos à análise estatística no Departamento de Matemática e Estatística da

Universidade de São Paulo (USP).

A análise da termotolerância a 42 °C, após prévia exposição às temperaturas subletais de 30, 33 e 36 °C, foi realizada considerando o modelo Weibull para um intervalo de dados censurados. A análise estatística foi efetuada utilizando dois softwares: WinBUGS (Lunn et al., 2000) e R (R Development Core Team, 2010).

Para os demais experimentos de análise de sobrevivência dos caramujos aos estímulos letais e para a curva de sobrevivência ao cloreto de cádmio durante 96 horas de exposição, foram utilizados os modelos de Análise de Sobrevivência (Colosimo & Giolo, 2006), com base no modelo que melhor se ajustou para os dados entre os modelos testados: Weibull, exponencial e lognormal.

Os resultados para a análise inferencial da toxicidade do cádmio e construção da curva da $CL_{50/96h}$ para o $CdCl_2$ em caramujos *B. glabrata* foram analisados por meio de um gráfico Kaplan-Meier, com base no modelo exponencial, e a curva de sobrevivência calculada por meio do teste Trimmed Spearman-Karber (Hamilton et al., 1977), com correção de Abbott.

Também os resultados de resistência cruzada entre os caramujos pré-expostos ao calor e em seguida expostos à concentração letal de 0,7 ppm de cloreto de cádmio foram analisados utilizando o gráfico Kaplan-Meier, com base no modelo exponencial.

Os resultados de resistência cruzada entre os caramujos pré-expostos ao cádmio e em seguida expostos à temperatura letal de 42 °C, por outro lado, foram analisados utilizando o gráfico Kaplan-Meier, com base no modelo Weibull.

5 RESULTADOS

5.1 Análise da termotolerância e dos efeitos do cádmio sobre a sobrevivência do caramujo *B. glabrata*

5.1.1 Estudos da termotolerância no caramujo *B. glabrata*

Os resultados de sobrevivência à temperatura letal de 42 °C estão apresentados na TAB. 1 abaixo. Os dados mostraram que os animais pré-expostos às temperaturas subletais sobreviveram por um período maior à temperatura letal que os animais não pré-expostos.

As maiores diferenças na sobrevivência à temperatura letal em relação ao grupo controle foram observadas nos grupos pré-expostos a 33 e 36 °C por 120 horas, onde os tempos de sobrevivência foram expressivamente maiores, comparados aos caramujos pré-expostos a 30 °C durante 120 horas.

TABELA 1 - Mortalidade dos caramujos *Biomphalaria glabrata* em temperatura de 42 °C, após pré-exposição a temperaturas subletais por 120 horas.

Tempo de sobrevivência(h)	**Grupo Experimental**			
	Controle (%) (n_o=30)	**Pré-expostos a 30 °C (%) (n_o=10)**	**Pré-expostos a 33 °C (%) (n_o=10)**	**Pré-expostos a 36 °C (%) (n_o=10)**
0	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
1	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
2	5 (17)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
3	12 (40)	1 (10)	0 (0)	0 (0)
4	12 (40)	4 (40)	2 (20)	0 (0)
5	1 (3)	3 (30)	1 (10)	3 (30)
6	-	2 (20)	1 (10)	4 (40)
7	-	-	1 (10)	2 (20)
8	-	-	1 (10)	1 (10)
9	-	-	2 (20)	-

Continuação da TABELA 1 - Mortalidade dos caramujos *Biomphalaria glabrata* em temperatura de 42 °C, após pré-exposição a temperaturas subletais por 120 horas.

Tempo de sobrevivência(h)	**Grupo Experimental**			
	Controle (%) (n_o=30)	**Pré-expostos a 30 °C (%) (n_o=10)**	**Pré-expostos a 33 °C (%) (n_o=10)**	**Pré-expostos a 36 °C (%) (n_o=10)**
10	-	-	2 (20)	-
Total de caramujos mortos ao fim do experimento	30 (100)	10 (100)	10 (100)	10 (100)

A análise estatística para os tempos de sobrevivência foi realizada segundo o modelo Weibull e, de acordo com os dados obtidos, a sobrevivência foi ordenada da seguinte maneira: Controle < 30°C < 36°C < 33 °C, mostrando que existem diferenças entre os grupos experimentais, e que o grupo pré-exposto a 33 °C mostrou o maior tempo de médio de sobrevivência, enquanto que o grupo controle mostrou o menor tempo médio de sobrevivência, como mostrado na tabela 2.

TABELA 2 – Medidas descritivas do tempo de sobrevivência para cada grupo testado.

Grupo experimental	**Tempo médio de sobrevivência (h)**	**SD**	**IC 95%**	**IC 99%**
Controle	2.8283	0.1358	(2.547; 3.080)	(2.489; 3.205)
Pré-exposto a 30 ^oC	4.0943	0.3287	(3.439; 4.729)	(3.292; 5.012)
Pré-exposto a 33 ^oC	7.1317	0.5598	(6.005; 8.195)	(5.827; 8.832)
Pré-exposto a 36 ^oC	5.6557	0.4331	(4.798; 6.492)	(4.648; 6.873)

SD: Desvio Padrão; IC: Intervalo de confiança.

Após a estimativa do tempo de sobrevivência, a função da sobrevivência foi calculada para todos os grupos, e o resultado apresentado na Fig. 15.

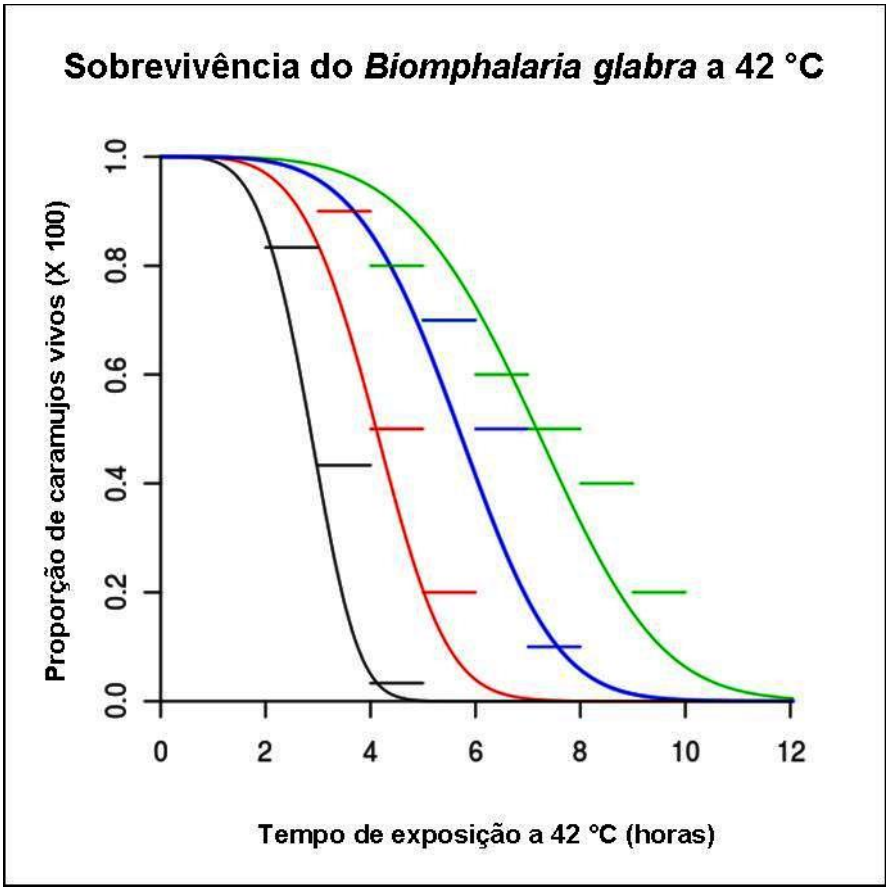

FIGURA 15. Curva de sobrevivência dos caramujos *Biomphalaria glabrata* a 42 °C. Grupos: Controle (preto); pré-expostos a 30 °C (vermelho); pré-expostos a 33 °C (verde); pré-expostos a 36 °C (azul) por 120 horas.

5.1.2 Estudos dos efeitos do cádmio sobre a sobrevivência do caramujo *B. glabrata*

5.1.2.1 Determinação da $CL_{50/96h}$ para o cloreto de cádmio no caramujo *B. glabrata*

Na TAB. 3 são observados os efeitos do cádmio sobre a sobrevivência dos caramujos *B. glabrata* em 96 horas de exposição. O método Trimmed Spearman-Karber, com correção de Abbott, mostrou com 95% de confiança que, para esta espécie de caramujo, o composto $CdCl_2$ apresenta uma concentração letal de 0,34 (0,30-0,37) ppm, nas condições deste estudo.

TABELA 3 - Mortalidade dos caramujos *Biomphalaria glabrata* expostos ao cádmio ($CdCl_2$) por 96 horas.

Tempo de exposição (h)	[$CdCl_2$]						
	Controle (n_o=40)	**0,09 ppm (n_o=40)**	**0,15 ppm (n_o=40)**	**0,22 ppm (n_o=40)**	**0,33 ppm (n_o=40)**	**0,5 ppm (n_o=40)**	**0,7 ppm (n_o=50)**
24	0	7	2	2	3	8	14
48	1	0	1	0	10	13	27
72	0	0	1	4	5	4	5
96	1	1	0	0	3	8	4
Total de mortes em 96 horas (%)	2(5)	8(20)	4(10)	6(15)	21(52,5)	33(82,5)	50(100)

No gráfico de Kaplan-Meier (Fig. 16) estão esquematizados os dados da tabela 3, mostrando a diferença no percentual de caramujos sobreviventes para cada concentração de cloreto de cádmio testada.

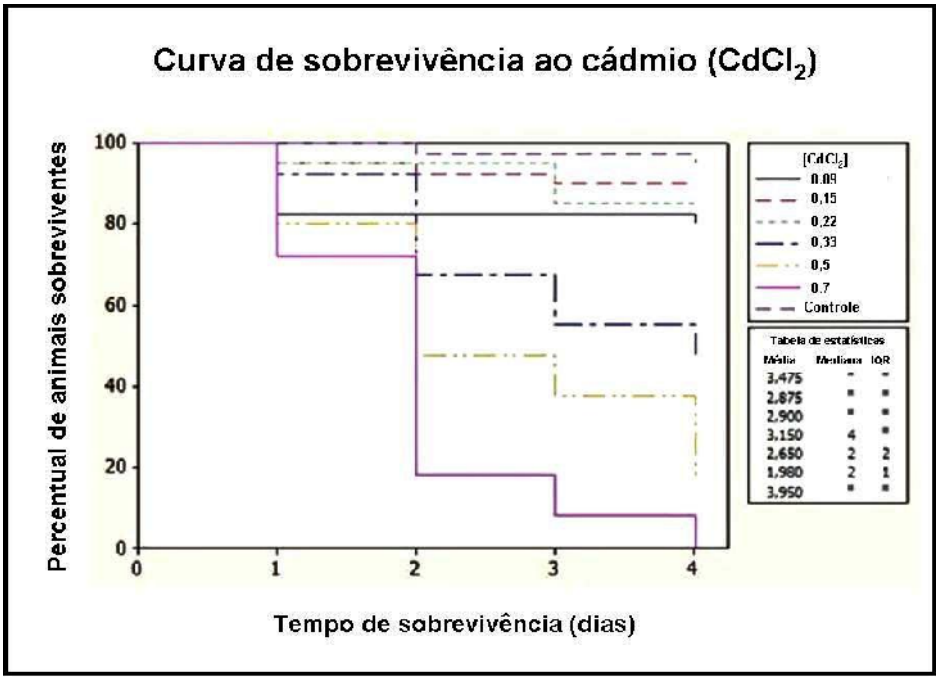

FIGURA 16. Curva de sobrevivência dos caramujos *Biomphalaria glabrata* expostos ao cloreto de cádmio durante 96 horas.

5.1.2.2 Estudos de resistência cruzada

Dois experimentos foram realizados para a avaliação da resistência cruzada em caramujos *B. glabrata*: no primeiro, os animais foram submetidos a 33 °C por 120 horas, e em seguida a 0,7 ppm de $CdCl_2$; no segundo experimento, os animais foram expostos a 0,22 ppm de $CdCl_2$ durante 96 horas, e em seguida a 42 °C.

5.1.2.2.1 Calor/Cádmio

Na TAB. 4, é mostrado o incremento da sobrevivência ao cádmio do grupo de caramujos pré-expostos ao calor de 33 °C em relação ao grupo controle. Os resultados mostram que a pré-exposição ao calor em temperatura subletal conferiu proteção significativa contra os efeitos tóxicos do cádmio a 0,7 ppm.

TABELA 4 - Mortalidade dos caramujos *Biomphalaria glabrata* pré-expostos à temperatura de 33 °C durante 120 horas (n_o=50), e em seguida a 0,7 ppm de $CdCl_2$.

Tempo de sobrevivência(h)	**Grupo experimental**	
	Controle (%)	**Pré-expostos a 33 °C (%)**
24	7 (14)	0
48	32 (64)	9 (18)
72	10 (20)	18 (36)
96	1 (2)	15 (30)
120	-	6 (12)
144	-	0
168	-	1 (2)
192	-	1 (2)
Total de caramujos mortos ao fim do experimento	50	50

No gráfico de Kaplan-Meier (Fig. 17) é evidenciada a diferença entre as curvas dos animais controles e dos pré-expostos a 33 °C. Pela análise do gráfico, observa-se a maior

sobrevida para os animais pré-expostos ao calor. A análise estatística indicou que os caramujos pré-expostos ao calor sobreviveram em média um dia e meio a mais que o grupo controle.

Os resultados da análise estatística indicaram que a sobrevivência do caramujo *B. glabrata* ao cloreto de cádmio na concentração letal de 0,7 ppm aumentou após uma pré-exposição à temperatura subletal de 33ºC, em relação ao grupo controle, ao nível de significância de 5%.

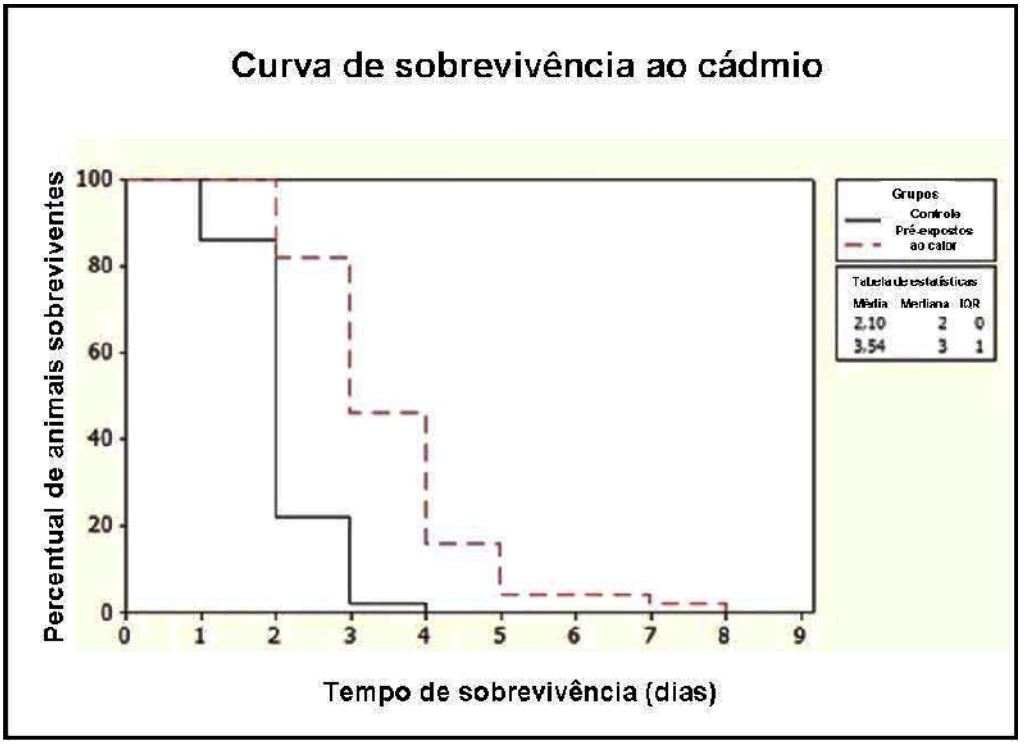

FIGURA 17. Gráfico Kaplan-Meier da sobrevivência dos caramujos *Biomphalaria glabrata* ao $CdCl_2$ (0,7 ppm), após pré-exposição a 33 °C por 120 horas.

5.1.2.2.2 Cádmio/Calor

Na TAB. 5 é apresentado o aumento da sobrevivência à temperatura de 42 °C dos caramujos pré-expostos ao cádmio na concentração de 0,22 ppm, em relação ao grupo controle. Observa-se que a pré-exposição ao metal em concentração subletal conferiu proteção ao caramujo contra a temperatura letal, comprovada pelos testes estatísticos.

TABELA 5 - Mortalidade dos caramujos *Biomphalaria glabrata* em temperatura de 42 °C, após pré-exposição a 0,22 ppm de $CdCl_2$ por 96 horas (n_o=35).

Tempo de sobrevivência (h)	**Grupo experimental**	
	Controle (%)	**Pré-expostos ao cádmio (%)**
0	0	0
1	9 (25,7)	7 (20)
2	8 (22,8)	5 (14,3)
3	14 (40)	6 (17,1)
4	3 (8,6)	14 (40)
5	1(2,9)	2 (5,7)
6	-	1 (2,9)
Total de caramujos mortos ao fim do experimento	35	35

No gráfico de Kaplan-Meier (Fig. 18) está esquematizada a curva de sobrevivência dos caramujos *B. glabrata* expostos à temperatura letal de 42 °C, mostrando o incremento na sobrevivência quando a exposição à temperatura ocorre após uma pré-exposição a uma concentração subletal de cloreto de cádmio (0,22 ppm). Segundo os dados estatísticos, o grupo pré-exposto ao cádmio sobreviveu em média 39 minutos a mais que o grupo controle. A análise estatística indicou que a pré-exposição ao cloreto de cádmio a 0,22 ppm, aumentou a resistência dos animais à temperatura letal a um nível de significância de 5%.

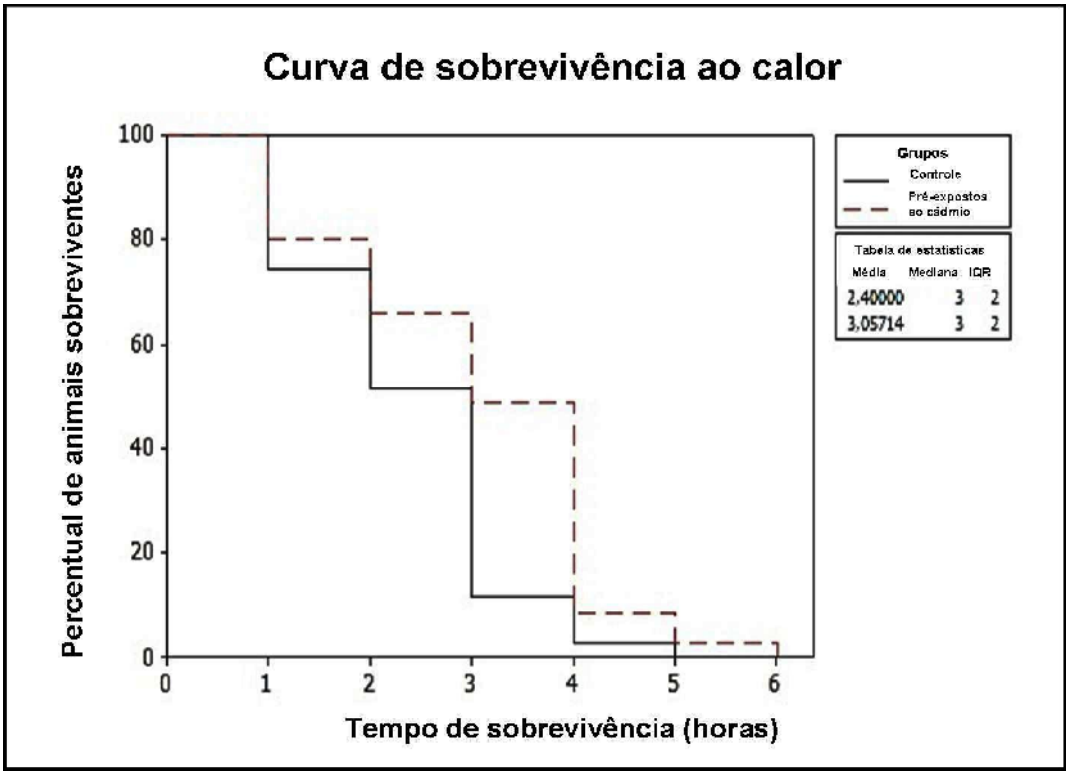

FIGURA 18. Gráfico Kaplan-Meier da sobrevivência dos caramujos *Biomphalaria glabrata* à temperatura de 42 °C, após pré-exposição a 0,22 ppm de $CdCl_2$ por 96 horas.

5.2 Análise da indução da proteína HSP70 pelo calor e pelo cádmio

5.2.1 Resposta da proteína HSP70 em caramujos *B. glabrata* expostos ao calor e ao cádmio

Os animais foram analisados quanto à indução da HSP70 como pools dos indivíduos expostos ao calor e ao cádmio. Na FIG. 19 é mostrada a indução da proteína HSP70 nos animais expostos às temperaturas sub-letais (30, 33 e 36 °C); na FIG. 21 é mostrada a indução da proteína nos animais sobreviventes ao cádmio nas concentrações testadas para estabelecimento da CL_{50} em 96 horas.

Com base nos valores apresentados pelo software ImageJ (FIG. 20), observou-se indução da HSP70 em todos os grupos expostos ao calor. Os animais submetidos a 30, 33 e 36 ºC apresentaram indução da proteína acima dos valores observados para o grupo controle, e o grupo pré-exposto a 30 °C apresentou maior indução da proteína, seguido pelo grupo pré-exposto a 33 °C e 36 °C, respectivamente.

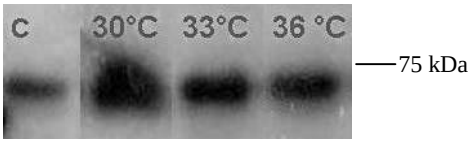

FIGURA 19 - Western blot da proteína HSP70 na glândula digestiva de caramujos *Biomphalaria glabrata* expostos ao calor por 120 horas. (C): Grupo controle; (30, 33, 36 °C): Temperaturas de exposição.

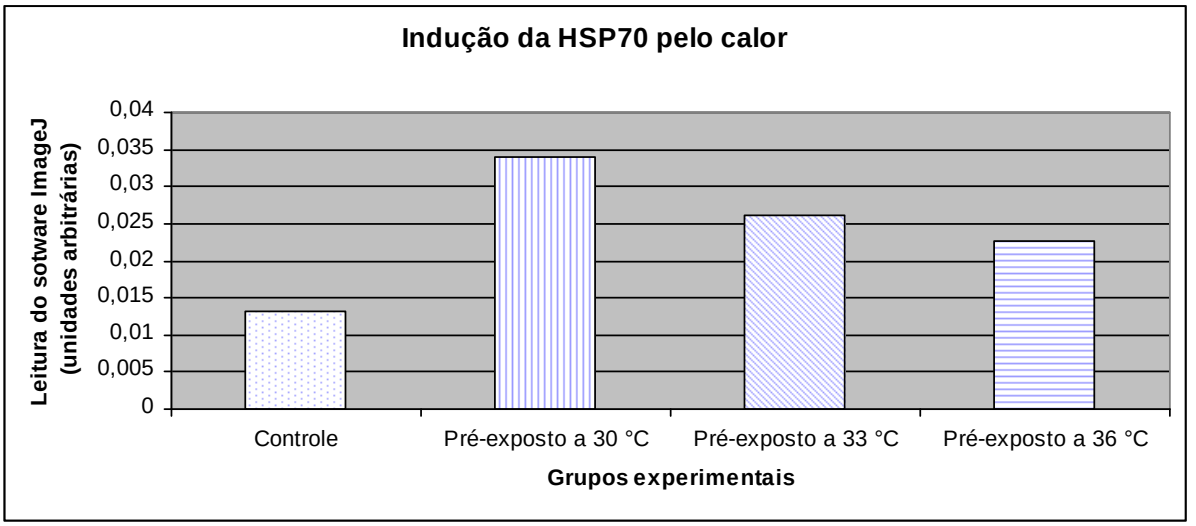

FIGURA 20 - Análise pelo software ImageJ da indução da proteína HSP70 na glândula digestiva de caramujos *Biomphalaria glabrata* expostos ao calor por 120 horas. Cada barra corresponde à leitura da indução da proteína HSP70 em um pool de glândulas digestivas de 10 caramujos (FIG. 19).

No que diz respeito à exposição ao cádmio, os animais expostos a 0,22; 0,33 e 0,15 ppm, respectivamente, apresentaram uma indução expressiva da proteína. O mesmo resultado não foi observado para os grupos submetidos a 0,09 e 0,5 ppm de $CdCl_2$, onde não se observou uma expressão da proteína HSP70 diferente dos resultados apresentados pelo grupo controle (Fig. 21 e 22). A concentração de 0,7 ppm de $CdCl_2$ não pôde ser testada quanto à indução da proteína HSP70 porque não houve animais sobreviventes.

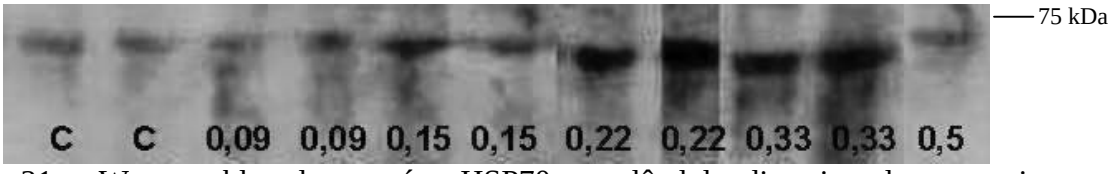

FIGURA 21 - Western blot da proteína HSP70 na glândula digestiva de caramujos *Biomphalaria glabrata* expostos ao cádmio ($CdCl_2$) por 96 horas. (C): Grupo controle; (0.09 - 0.5): Concentrações de $CdCl_2$.

A Análise do filme pelo software ImageJ resultou na leitura da expressão da proteína para cada grupo de concentrações testadas, confirmando a maior indução da HSP70 nos grupos expostos às concentrações de 0,22; 0,33 e 0,15 ppm de $CdCl_2$, respectivamente, enquanto que nos grupos expostos a 0,09 e 0,5 ppm a indução da HSP70 não diferiu do grupo controle.

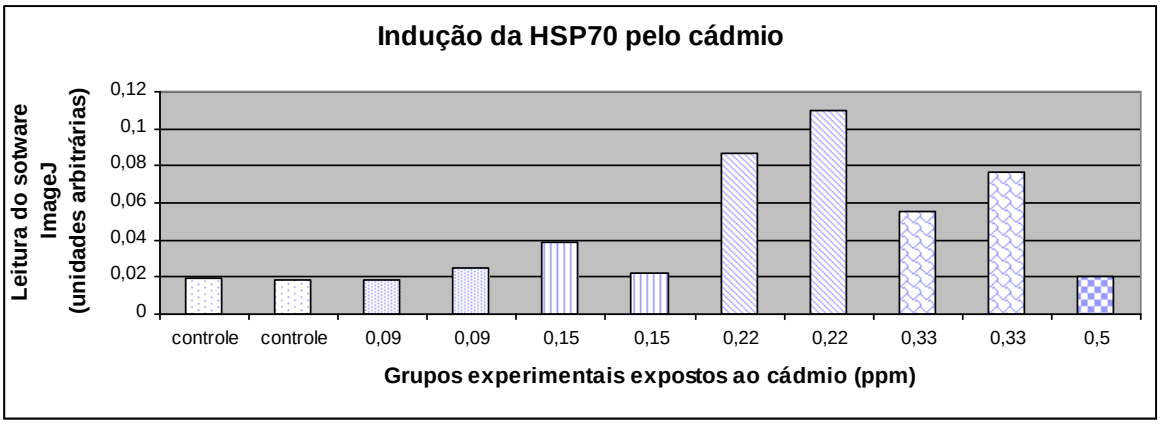

FIGURA 22 - Análise pelo software ImageJ da indução da proteína HSP70 na glândula digestiva de caramujos *Biomphalaria glabrata* expostos ao cádmio ($CdCl_2$) por 96 horas. Cada barra corresponde à leitura da indução da proteína HSP70 em um pool de glândulas digestivas dos caramujos sobreviventes à exposição ao cádmio em cada concentração testada (FIG. 21).

5.2.2 Indução da proteína HSP70 em diversos tecidos de caramujos *B. glabrata* expostos ao calor

Diferentes tecidos do caramujo *B. glabrata* (glândula digestiva, cabeça/pé e ovoteste) foram testados quanto à indução desta proteína pelo calor. A glândula digestiva foi o tecido mais responsivo, conforme observado na FIG. 23 e 24, ratificada na análise da imagem pelo software ImageJ (FIG. 25), enquanto que os tecidos de cabeça/pé e o ovoteste não demostraram correlação da indução da proteína HSP70 com a exposição ao calor.

O ovoteste não mostrou variação na expressão da proteína em relação ao grupo controle em todas as temperaturas analisadas, enquanto que para o tecido de cabeça/pé foi observado um decréscimo da HSP70 em relação ao grupo controle, exceto para a temperatura de 36 °C onde a expressão da proteína foi maior em relação ao grupo controle.

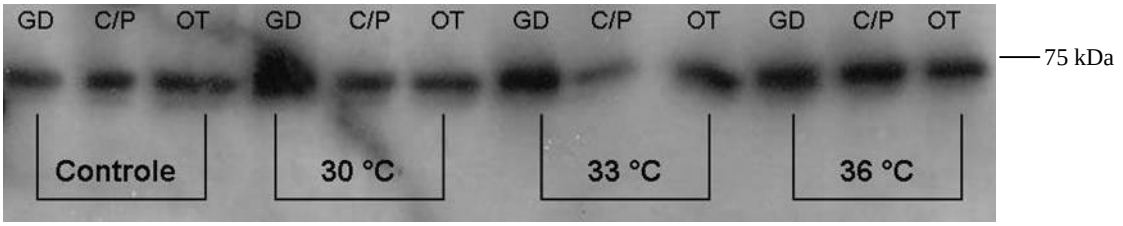

FIGURA 23 - Western blot da proteína HSP70 em diversos tecidos de caramujos *Biomphalaria glabrata* expostos ao calor por 120 horas. GD: Glândula digestiva. C/P: Cabeça/pé. OT: Ovoteste.

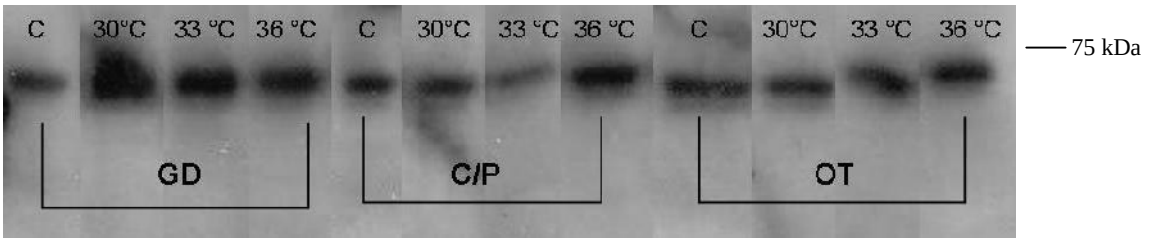

FIGURA 24 – Repetição da figura anterior, reestruturada, dando destaque aos tecidos analisados. Western blot da proteína HSP70 nos diversos tecidos de caramujos *Biomphalaria glabrata* expostos ao calor por 120 horas. GD: Glândula digestiva. C/P: Cabeça/pé. OT: Ovoteste.

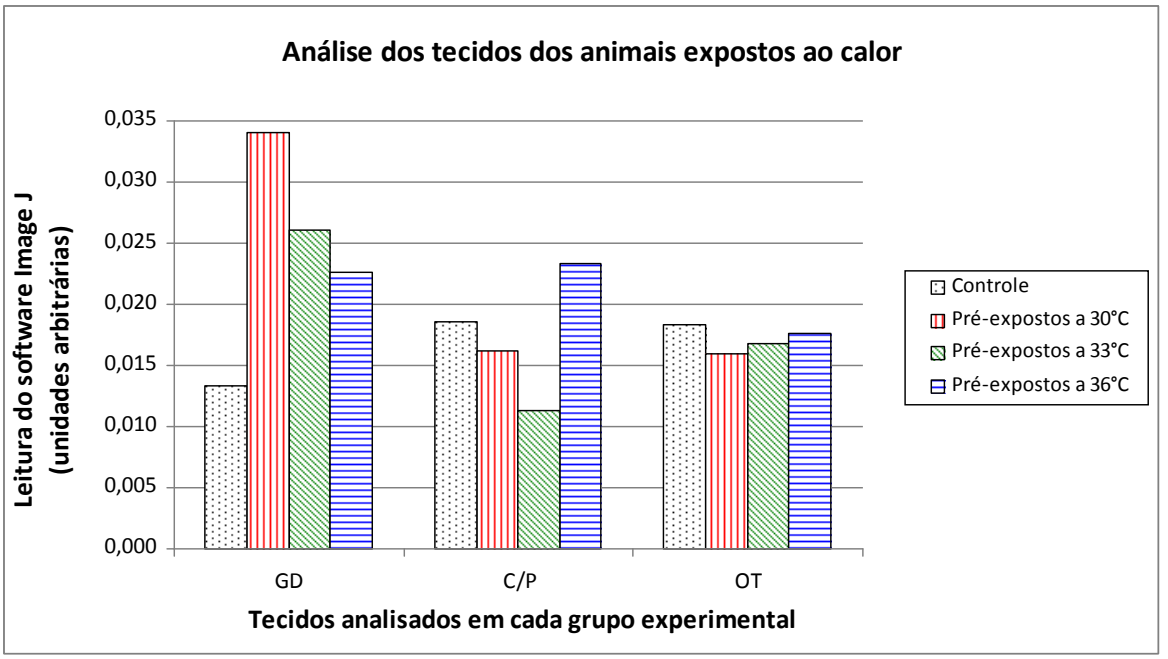

FIGURA 25 - Análise pelo software ImageJ da indução da proteína HSP70 nos diversos tecidos de caramujos *Biomphalaria glabrata* expostos ao calor por 120 horas. GD: Glândula digestiva. C/P: Cabeça/pé. OT: Ovoteste. Cada barra corresponde à leitura da indução da proteína HSP70 em um pool de tecidos de 10 caramujos (FIG. 23 e 24).

5.2.3 Diferenças interindividuais observadas na indução da proteína HSP70 nos caramujos *B. glabrata* expostos ao calor e ao cádmio

Foram analisados individualmente caramujos expostos aos estímulos que apresentaram maior efetividade na indução da proteína, segundo os resultados já alcançados; ou seja, a temperatura de 33 °C, e o cádmio ($CdCl_2$) em concentração de 0,22 ppm.

Conforme apresentado nas FIG. 26 e 27, houve diferença na expressão da proteína tanto entre os animais expostos ao calor, quanto entre os animais controle.

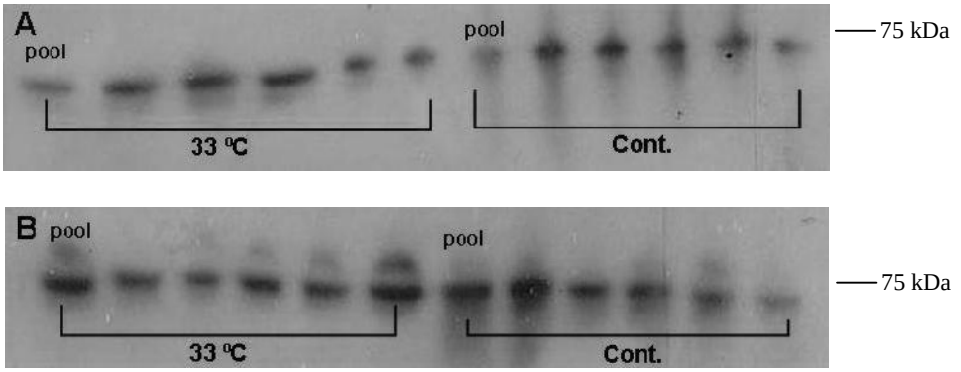

FIGURA 26 - Western blot da indução da proteína HSP70 na glândula digestiva de caramujos *Biomphalaria glabrata* individualizados expostos ao calor. A e B: Grupos controle e expostos a 33 °C por 120 horas.

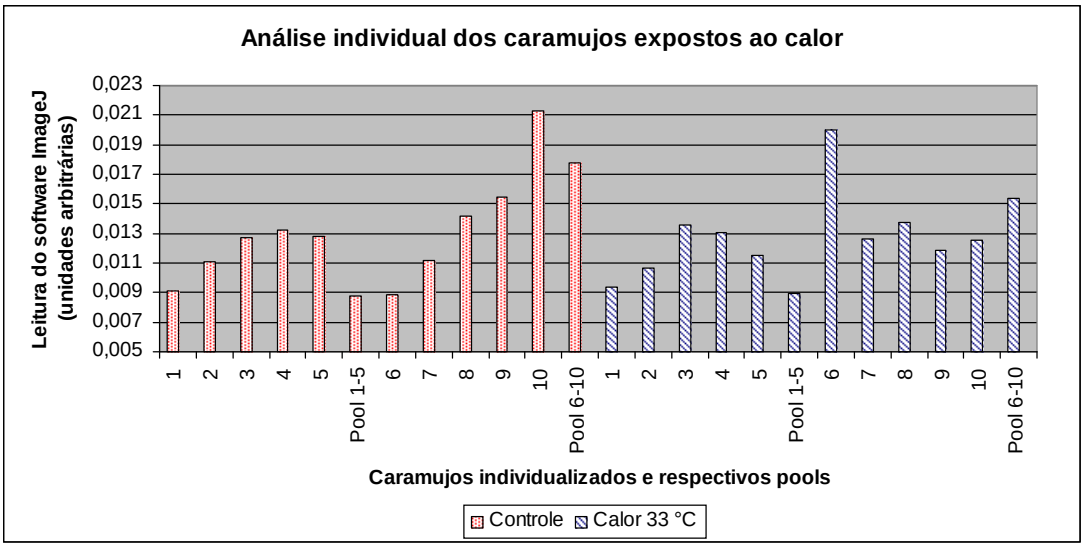

FIGURA 27 - Análise pelo software ImageJ da indução da proteína HSP70 na glândula digestiva de caramujos *Biomphalaria glabrata* individualizados e em pool, expostos ao calor de 33 °C por 120 horas. Cada barra corresponde à leitura da indução da proteína HSP70 no extrato de glândula digestiva (FIG. 26). Tomou-se como referência a figura 26A para os animais de 1 a 5, e a figura 26B para os animais de 6-10.

Os resultados apresentados nas FIG. 28 e 29 mostram que a indução da proteína após exposição ao cádmio não foi homogênea entre os indivíduos testados, observando-se também que o nível basal dos animais do grupo controle não foi igual para todos os indivíduos testados.

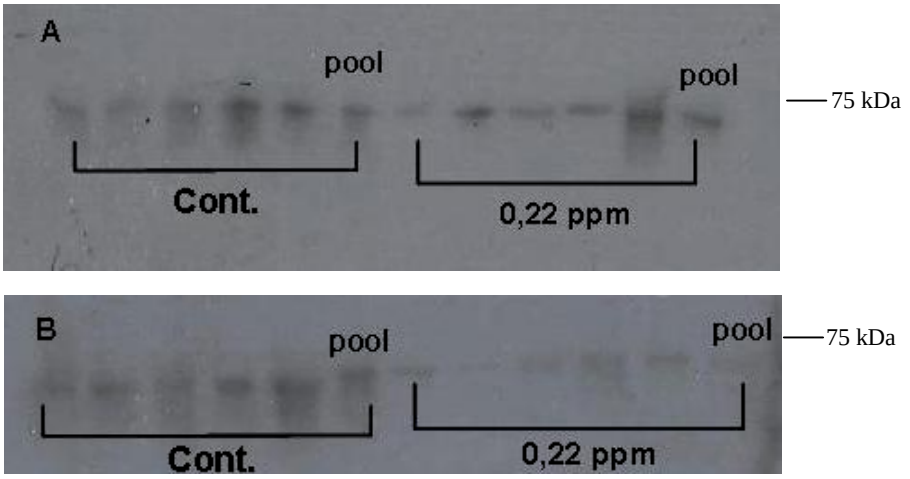

FIGURA 28 - Western blot da proteína HSP70 na glândula digestiva de caramujos *Biomphalaria glabrata* individualizados expostos ao cádmio. A e B: Grupos controle e expostos a 0,22 ppm de $CdCl_2$ por 96 horas.

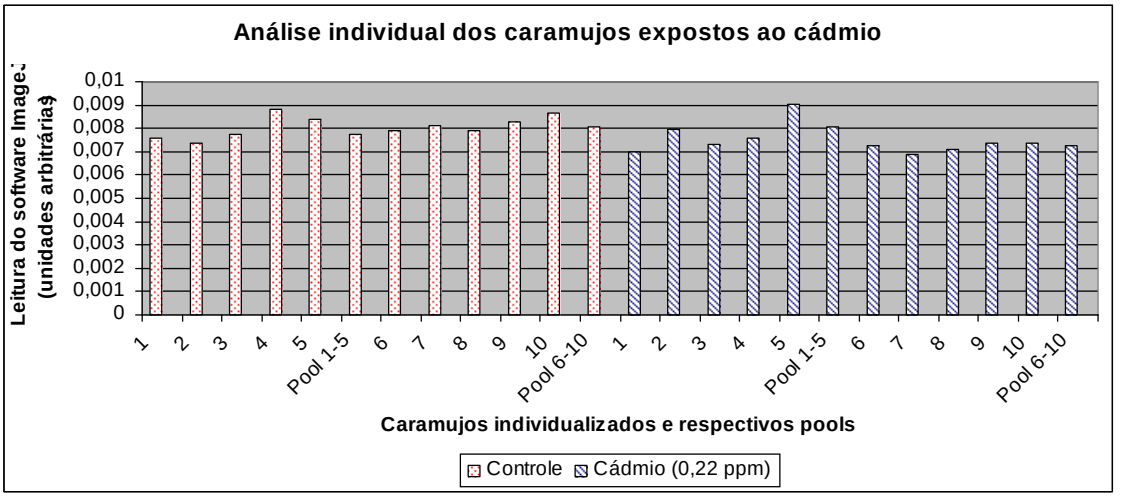

FIGURA 29 - Análise pelo software ImageJ da indução da proteína HSP70 na glândula digestiva de caramujos *Biomphalaria glabrata* individualizados expostos ao cádmio (0,22 ppm) por 96 horas. Cada barra corresponde à leitura da indução da proteína HSP70 no extrato de glândula digestiva (FIG. 28). Tomou-se como referência a figura 28A para os animais de 1 a 5, e a figura 28B para os animais de 6-10.

Em outro experimento, analisando as variações basais da proteína HSP70, onde foram testados apenas os indivíduos mantidos sob condições-padrão de criação, não expostos a agentes agressores, foi observada uma diferença na expressão da proteína entre os indivíduos estudados (FIG. 30 e 31), indicando uma variação basal inerente à espécie.

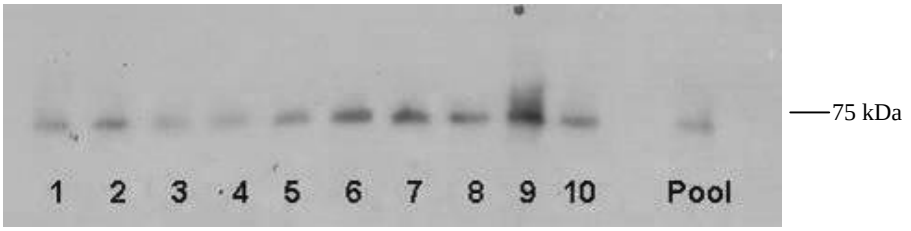

FIGURA 30 - Western blot da proteína HSP70 na glândula digestiva de caramujos *Biomphalaria glabrata* individualizados não expostos a agentes agressores (grupo controle).

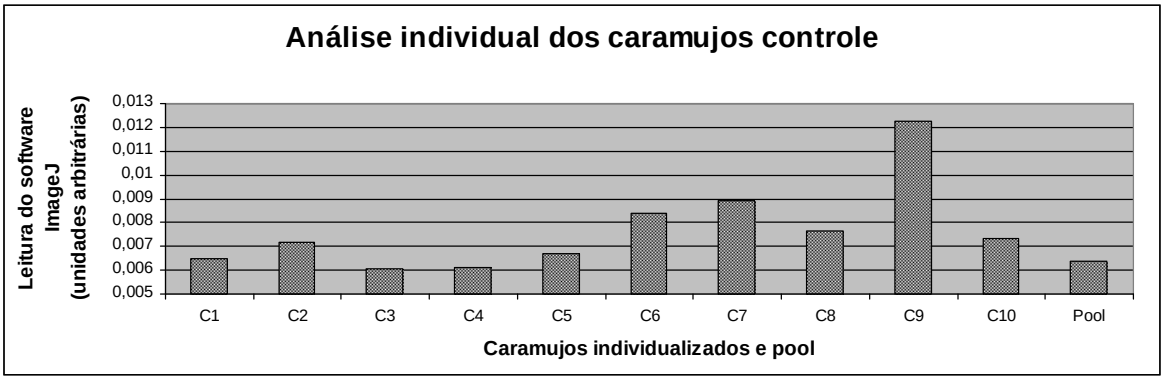

FIGURA 31 - Análise pelo software ImageJ da indução da proteína HSP70 na glândula digestiva de caramujos *Biomphalaria glabrata* individualizados, não expostos a agentes agressores (grupo controle). Cada barra corresponde à leitura da indução da proteína HSP70 no extrato de glândula digestiva de cada caramujo e no pool (FIG. 30).

5.3 Curva tempo-resposta da proteína HSP70 após exposição do caramujo *B. glabrata* ao calor e ao cádmio

Os resultados do Western blot (FIG. 32) mostraram que a proteína HSP70 alcança o valor máximo de indução nas primeiras 48 horas seguintes à exposição a 33°C. Em relação à exposição ao cloreto de cádmio, os resultados mostraram que a proteína alcançou seu nível máximo após 96 horas de exposição a 0,22 ppm deste metal, sendo que os dados não

concluem que este é o pico de expressão da proteína para este estímulo, visto que intervalos subsequentes não foram estudados neste trabalho.

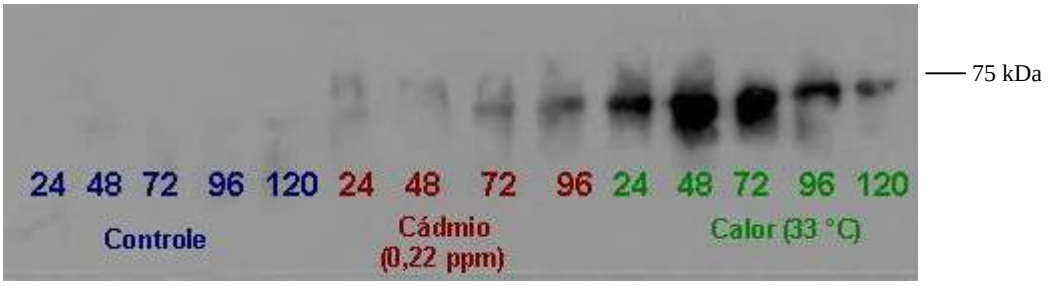

FIGURA 32. Indução da proteína HSP70 pelo cádmio e pelo calor em caramujos *Biomphalaria glabrata*, medida nos intervalos de 24, 48, 72, 96 e 120 horas de exposição.

Os resultados da análise do filme pelo software ImageJ mostram os valores máximos de indução da proteína após 48 horas de exposição à temperatura de 33 °C, e após 96 horas de exposição ao cloreto de cádmio (FIG. 33).

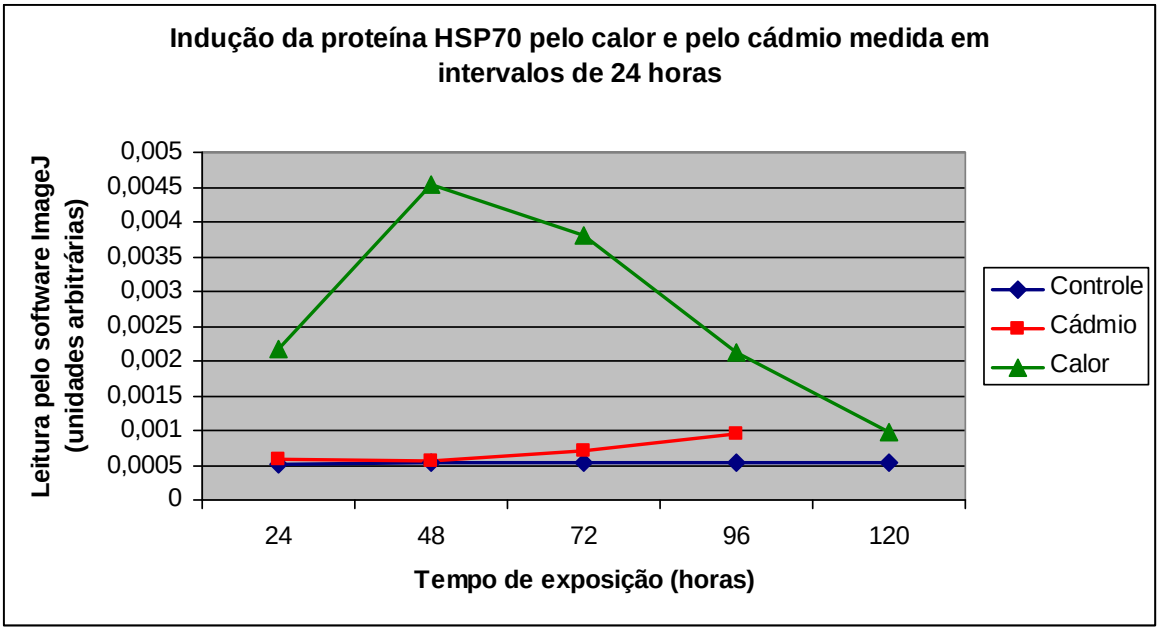

FIGURA 33 - Análise pelo software ImageJ da curva tempo-resposta (FIG. 32) da indução da proteína HSP70 na glândula digestiva de caramujos *Biomphalaria glabrata* expostos ao cádmio (0,22 ppm) e ao calor (33 °C).

6 DISCUSSÃO

O caramujo *B. glabrata* tem sido bastante utilizado em protocolos experimentais, notadamente em estudos de Parasitologia, visto seu papel como hospedeiro intermediário no ciclo da esquistossomose mansônica. Contudo, novas linhas de pesquisa têm se interessado pelo potencial da espécie em estudos de monitoramento ambiental, e vários trabalhos já investigaram os efeitos de agentes estressores sobre o caramujo, analisando biomarcadores diversos. Nesse contexto, a indução da proteína HSP70, potencial biomarcador de estresse ambiental, por um agente químico e em estudos de termotolerância demonstra o potencial experimental dessa espécie.

Os estímulos usados neste estudo em *B. glabrata* foram previamente descritos na literatura como indutores da HSP70, proteína relacionada à proteção contra danos provenientes de agressões, especificamente aquelas concernentes às proteínas que participam do arsenal fisiológico do organismo. A proteína HSP70 foi estudada por meio da técnica de Western blot, utilizando anticorpo específico para essa família de proteínas.

O caramujo *B. glabrata* é um animal que exibe bastante plasticidade, podendo ser encontrado em uma grande variedade de coleções de água doce, e são capazes de sobreviver em ambientes com ampla variação de temperatura, pH, irradiação UV e salinidade; também apresentam uma diversidade na alimentação, ingerindo muitos materiais diferentes como vegetais, fragmentos de animais e vegetais em decomposição e excrementos. Foi observado que este molusco sobrevive em torno de 4 horas a 40 °C e no máximo por alguns minutos a 50 °C. As temperaturas baixas, por outro lado, reduzem o metabolismo e as posturas (Rey, 1991).

Embora os estudos realizados até o momento sugiram uma proveitosa aplicação do caramujo *B. glabrata* em estudos de resposta ao estresse, a literatura carece ainda de muitas informações a respeito da resposta deste animal a estímulos ambientais em níveis subcelular, bioquímico e molecular; inclusive em estudos de resposta ao choque térmico, a despeito do grande interesse despertado por este campo da biologia celular. Este trabalho dá continuidade aos estudos do grupo de pesquisa do Laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan para estabelecimento da espécie *B. glabrata* como bioindicador em estudos ecotoxicológicos (Nakano et al., 2003; Tallarico et al., 2004; Estevam et al., 2006; Grazeffe et al., 2008).

A resposta do *B. glabrata* ao choque térmico e ao cádmio foi analisada correlacionando com os efeitos sobre a proteína HSP70, sabidamente responsiva a esse metal, considerado um poluente ambiental de importância; assim como ao calor, considerado o estímulo de referência para esta molécula. Os resultados obtidos mostram que o caramujo respondeu aos estímulos estressores, com indução de resistência às exposições letais, possivelmente ligada à indução da proteína HSP70.

Inicialmente, foi realizado um experimento piloto para estudar a termotolerância induzida e sua correlação com a indução da proteína HSP70 (TAB. 1 e FIG. 19 e 20).

Observou-se que a pré-exposição ao calor em temperaturas subletais ativou mecanismos de proteção do organismo, incrementando sua sobrevivência (TAB. 1). Os resultados demonstram que os animais pré-expostos a 33 °C obtiveram uma maior resistência à temperatura de 42 °C, descrita como letal para esta espécie em 4-5 horas de exposição (Rey, 1991), seguidos pelos pré-expostos a 36 °C e 30 °C.

Nossos resultados em relação à temperatura letal para o caramujo *B. glabrata* corroboram os dados da literatura (Rey, 1991), visto que para o grupo controle exposto a 42 °C não havia mais nenhum sobrevivente após 5 horas de exposição. Os resultados da sobrevivência a 42 °C após uma pré-exposição a temperaturas subletais indicam uma resposta biológica protetora contra os efeitos da temperatura letal, permitindo a extensão da sobrevivência dos animais. Essas observações corroboram a termotolerância como uma reação ubíqua dos organismos para adaptações às mudanças térmicas do ambiente.

A análise estatística pelo modelo Weibull confirmou nossos resultados, indicando que houve diferenças entre os grupos testados, e também que o grupo pré-exposto a 33 °C teve o maior tempo de sobrevivência, e o grupo controle o menor. Entretanto, os resultados foram tratados como um modelo de dados censurados, considerando que o desenho do experimento objetivou o número de mortes por hora, e não o momento exato de cada morte.

Contudo, foi observado que, embora tenha havido uma maior sobrevivência à temperatura letal de 42 °C nos animais pré-expostos às temperaturas subletais em relação ao grupo controle, os resultados da indução da proteína HSP70 não se correlacionaram diretamente aos encontrados no experimento de sobrevivência, onde a temperatura correspondente à maior sobrevivência não se correlacionou com a maior indução da proteína na glândula digestiva; ao contrário, a temperatura de menor sobrevivência dos animais apresentou a maior indução da proteína HSP70, o que nos leva a inferir que outras moléculas estejam envolvidas no incremento da resistência do caramujo à temperatura

letal, o que pode incluir, inclusive, outras classes de HSPs como observado por Smith et al. (2012).

A literatura demonstra diversos exemplos de termotolerância em várias classes de organismos. Apenas para citar alguns exemplos, podemos destacar os resultados de Frankberg et al. (2000) que observaram aumento nas proteínas totais, incluindo a proteína HSP70, do microcrustáceo *Artemia franciscana* quando submetido a choque térmico. Sconzo et al. (1986), por outro lado, observaram o fenômeno oposto, onde embriões do ouriço *Paracentrotus lividus* apresentaram diminuição em 50% da síntese de proteínas totais quando expostos ao choque térmico, porém com aumento na síntese de HSP70.

Jackson et al. (2011) estudando ostras *C. virginica* e *C. gigas*, detectaram duas isoformas constitutivas e uma indutível da família HSP70 nas duas ostras estudadas após exposição às temperaturas subletal, letal e combinações de ambas. A indução da proteína e a cronologia de expressão das proteínas variou conforme o tecido estudado. Os autores observaram ainda que a termotolerância persistiu por mais tempo, mesmo após o retorno das proteínas HSPs aos níveis basais. Também foi observada uma maior resistência à temperatura na espécie *C. gigas* em relação à *C. virginica*, diferindo também que a segunda não respondeu com indução de HSP70 à temperatura letal, exceto quando pré-exposta à temperatura subletal.

Kalosaka et al. (2009) comprovaram um aumento na resistência de insetos *Ceratitis capitata* a temperaturas letais, quando pré-expostos a diversas temperaturas subletais. Comparando as curvas de sobrevivência com as de expressão da HSP70 eles encontraram uma clara correlação entre a termotolerância induzida e a expressão da proteína. Essa correlação não foi observada para todos os estágios de vida do inseto; as melhores respostas foram obtidas com larvas de 6 dias de vida, seguidas pelos adultos e os embriões de 48 horas. Nesses estágios, foi observada correlação entre a termotolerância e a expressão da HSP70: a sobrevivência foi maior na temperatura de maior indução da proteína e acompanhou o declínio da HSP70. A correlação entre a HSP70 e a sobrevivência não foi tão evidente nos dois outros estágios de vida do inseto estudados (larvas de 3 dias e embriões de 24 horas).

Neste trabalho não foram estudados embriões de *B. glabrata*, embora resultados de outros estudos demonstrassem que os embriões mais jovens são mais sensíveis aos efeitos de agentes agressores que os embriões em estágios de desenvolvimento mais avançados (Perlowagora-Szumlewicz & Berry, 1964; Okazaki et al., 1996; Rapado et al., 2011; Miyasato et al., 2012).

Perlowagora-Szumlewicz (1964) verificaram em seu experimento com irradiação de espécimes de *B. glabrata* de várias idades que os animais mais jovens foram mais sensíveis que os animais adultos aos raios-x; assim como os animais menores foram mais sensíveis que os animais maiores.

Esses autores ecolheram os caramujos de modo a incluir uma faixa etária na qual os animais estivessem em plena maturidade sexual, com todas as suas funções biológicas plenamente desenvolvidas. Segundo relatos da literatura, o caramujo *B. glabrata* começa sua oviparidade por volta da 5ª a 7ª semana de vida (Perlowagora-Szumlewicz, 1966). Desse modo, neste trabalho a escolha dos animais para os experimentos com idade entre 5 e 6 meses de vida permitiu a experimentação com um organismo sabidamente adulto e de posse de todas as suas funções fisiológicas.

O tamanho dos caramujos também foi um fator de importância na escolha dos espécimes; foram selecionados animais com um tamanho entre 14-15 mm, compatível com a idade de 5-6 meses escolhida para os testes. Observa-se que alguns animais nessa faixa etária crescem menos ficando em torno de 11-12 mm, principalmente em decorrência da densidade populacional do aquário de criação. No entanto, a fim de padronizar os grupos experimentais e evitar a interferência do fator tamanho na resistência dos animais, foram utilizados animais mais robustos, provenientes de aquários com número de caramujos controlado.

A fim de investigar em que região anatômica a HSP70 estaria presente em maior quantidade, e direcionar os futuros estudos desta proteína no caramujo *B. glabrata*, extratos de diversos tecidos (glândula digestiva, cabeça/pé e ovoteste), mais comumente citados na literatura científica em estudos com moluscos foram testados neste trabalho quanto à indução da HSP70 por meio da marcação com anticorpo específico, e, como observado nas FIG. 23, 24 e 25, a expressão da proteína mostrou-se mais elevada na glândula digestiva dos animais estudados.

Nos demais tecidos, não foi observada correlação direta entre o processo de estresse pelo calor e a produção de proteína HSP70; além disso, não se observou diferenças apreciáveis na expressão da proteína nestes tecidos em relação ao grupo controle, mantido sob condições ambientais ideais, livre do estresse térmico.

A glândula digestiva, também chamada de hepatopâncreas, é um órgão de importância nas funções digestivas do molusco, onde são produzidas numerosas enzimas pelas células constituintes de seu epitélio, que também se encarrega da absorção, acúmulo de reservas nutritivas e excreção (Ruppert et al., 2005). No caso de contaminações

ambientais por metais pesados, como o cádmio, foi verificado o hepatopâncreas como órgão que retém as maiores quantidades do poluente (Verrengia Guerrero et al., 1997; Ansaldo et al., 2006; 2009).

Xuan et al. (2011) estudando o efeito do cádmio em caranguejos *Sinopotamon yangtsekiense* observaram depleção no nível de glicogênio no hepatopâncreas desse invertebrado após 21 dias de exposição ao metal. Considerando que este órgão é o sítio da gliconeogênese, a diminuição no nível de glicogênio sugere perda de função ocasionada pela exposição ao cádmio, possivelmente em decorrência de danos em sua ultra-estrutura.

Embora diversos grupos tenham observado a indução da proteína HSP70 em tecidos diferentes da glândula digestiva em outras espécies de moluscos, nossos resultados apontam este tecido como o mais indicado para estudos desta natureza em caramujos da espécie *B. glabrata*.

Tomanek e Sanford (2003) observaram indução de HSP70 em moluscos do gênero *Tegula*, submetidos à realocação para áreas de maré mais alta, onde foram submetidos a uma maior freqüência de ondas e maior temperatura conseqüente à exposição solar. Os testes foram realizados com proteína extraída da brânquia deste molusco que é um gastrópode herbívoro.

Os resultados de Piano et al. (2004) sobre os efeitos da temperatura, cádmio e zinco em ostras *O. edulis* nos tecidos de brânquia e glândula digestiva mostraram que, com relação ao calor, também as brânquias responderam mais satisfatoriamente à indução da HSP70 que a glândula digestiva; enquanto que as respostas aos metais foram similares nos dois tecidos após exposição ao cádmio. O zinco não ocasionou alterações expressivas nos tecidos do molusco, contudo a combinação cádmio+zinco mostrou aumento da expressão da família HSP70 nos dois tecidos, embora em níveis abaixo dos conseguidos com a exposição ao cádmio apenas. Embora as respostas nos dois tecidos tenham sido similares, observou-se que a expressão das proteínas de choque térmico estava levemente mais alta na glândula digestiva que nas brânquias após exposição ao cádmio e cádmio+zinco. Os autores sugerem que a glândula digestiva da ostra *O. edulis* não é afetada pelo calor e possivelmente a proteína HSP70 tenha função apenas constitutiva neste órgão.

Os resultados deste grupo contrastam com os de Jackson et al. (2011) que também avaliaram respostas ao estímulo térmico em ostras *C. virginica* e *C. gigas*, nas quais a glândula digestiva apresentou respostas satisfatórias em relação à indução de HSP70 em resposta ao calor.

Jackson et al. (2011) estudaram a resposta à temperatura letal e subletal de tecidos de glândula digestiva, brânquia, manto e músculo adutor em ostras C*rassostrea gigas*, concluindo que a glândula digestiva e a brânquia tiveram respostas similares em relação à indução da família HSP70, seguidas pelo manto, e o músculo adutor, que não apresentou uma diferença considerável na resposta aos tratamentos estudados.

Brun et al. (2009), verificaram que moluscos de baía *Argopecten irradians irradians* e oceânicos *Placopecten magellanicus* submetidos a estresse térmico apresentaram indução da HSP70 juntamente com HSP40 em tecido do manto. A escolha do tecido, segundo os autores, deu-se em decorrência da facilidade de obtenção das amostras, além de que este tecido encontra-se próximo ao ambiente externo, facilitando a interação do animal com o meio em que está inserido.

Sob este ponto de vista, a glândula digestiva do caramujo *B. glabrata* também é de fácil obtenção. A dissecação do caramujo e separação da glândula digestiva é extremamente simples; não obstante, em nossa experiência, esse é o tecido mais simples de ser dissecado neste animal. Sua identificação é facilitada pela localização anatômica na porção final do corpo do caramujo, e sua proximidade com o ovoteste constituindo dois tecidos de rápida visualização e identificação considerando sua cor e aspecto morfológico característicos.

A glândula digestiva é um dos órgãos mais expostos aos contaminantes ambientais, considerando que uma das principais vias de acesso do caramujo aos contaminantes dissolvidos no meio externo é pela ingestão, e sua função é produzir enzimas participantes da digestão, além de absorver, acumular as reservas nutritivas, e encaminhar os resíduos para excreção pelos intestinos.

Regoli et al. (2009) analisando os efeitos de contaminantes atmosféricos urbanos, utilizando como organismo sentinela o molusco *Helix aspersa*, também confirmou a glândula digestiva como alvo primordial de acúmulo de metais tóxicos, em relação aos demais órgãos estudados (pulmão e pé).

Considerando os resultados obtidos com a exposição ao calor e o papel da glândula digestiva na digestão, acúmulo e detoxificação de partículas ingeridas pelo molusco, esse foi o tecido de escolha para todos os experimentos subseqüentes.

Além de Regoli et al. (2009), Zhou et al. (2010) também elegeram a glândula digestiva como tecido de escolha para estudos de proteômica dos efeitos tóxicos de dois disruptores endócrinos (o ftalato de dialilo e o bisfenol A) em abalones (*Haliotis diversicolor supertexta*), observando alterações na expressão de diversos biomarcadores,

entre eles, a indução da proteína HSP70, o que reforça a nossa escolha do tecido e da metodologia.

Os experimentos para avaliação da toxicidade do cádmio no caramujo *B. glabrata* (TAB. 3) nortearam a escolha das doses de exposição para indução da proteína HSP70, e os experimentos subseqüentes mostraram que a exposição às concentrações de 0,15; 0,22 e 0,33 ppm de $CdCl_2$ induziu a HSP70 na glândula digestiva (FIG. 21 e 22).

Abd Allah et al. (1997) discutiram em seu trabalho que os moluscos acumulam metais rapidamente durante a alimentação com matéria contaminada (lodo, sedimentos, algas, plâncton). Quando expostos a níveis relativamente baixos de metais dissolvidos no meio aquático, os moluscos podem concentrá-los acima de cinco ordens de magnitude. Em alguns casos os metais dissolvidos na forma inorgânica parecem mais eficientemente acumulados do que quando os animais se alimentam da matéria contaminada. Deste modo, considerando que nas nossas condições experimentais os caramujos foram expostos em solução do metal dissociado em água, podemos ter a segurança que o metal foi acumulado de maneira eficiente para o estabelecimento de seus efeitos e desenvolvimento do estresse para indução da proteína HSP70.

A faixa de concentrações de cloreto de cádmio testada no caramujo *B. glabrata* foi escolhida com base nos resultados de Ansaldo et al. (2006; 2009) que deram indicativos que as concentrações ideais de teste com esse metal estariam em torno de 0,5 ppm para o molusco *B. glabrata*. Com base nos resultados de Ansaldo et al. (2006; 2009), a curva de sobrevivência ao cádmio na forma cloreto ($CdCl_2$) foi realizada partindo da concentração de 0,5 ppm, onde se observou alta mortalidade, embora ainda não se caracterizasse como a concentração letal para 100% da população nesta espécie em exposições de 96 horas (TAB. 3 e FIG. 16). Os experimentos subseqüentes permitiram concluir que a concentração de 0,7 ppm de $CdCl_2$ foi eficiente para eliminar 100% de uma população de *B. glabrata* em 96 horas de exposição.

A análise estatística da $CL_{50/96h}$ teve que ser ajustada para um modelo de dados censurados, considerando que o experimento objetivou verificar a sobrevivência do caramujo *B. glabrata* ao cloreto de cádmio durante uma exposição de 96 horas, portanto foi encerrado antes da morte de todos os caramujos. O teste dos dados nos modelos Weibull, exponencial e lognormal mostrou que o modelo exponencial se mostrou mais bem ajustado para o resultado encontrado na curva de sobrevivência dos caramujos ao $CdCl_2$ durante 96 horas de exposição.

Os experimentos mostraram que o cádmio é tóxico para *B. glabrata*, e sua exposição em níveis subletais induz uma resposta protetora na qual a HSP70 parece estar envolvida. A indução da proteína na glândula digestiva, analisada no software de imagem ImageJ, foi observada na seguinte ordem: 0,22 > 0,33 > 0,15 > 0,09 = 0,5 = Controle (FIG. 21 e 22). Considerando a elevada toxicidade do cádmio, intervalos muito pequenos entre as concentrações tiveram que ser estabelecidos para que fosse construída a curva de sobrevivência e determinada a $CL_{50/96h}$.

Ansaldo et al. (2006; 2009) já haviam observado que o cádmio acumula-se predominantemente na glândula digestiva do caramujo *B. glabrata*, em relação aos demais órgãos estudados (gônadas, região cefalopedal e pulmões); o cádmio também modifica a expressão das HSPs, induzindo sua síntese em decorrência da desnaturação e oxidação proteica ocasionada por este metal (Bertin & Averbeck, 2006). Com base nessas informações, uma possível explicação para o aumento da HSP70 na glândula digestiva dos caramujos expostos ao cloreto de cádmio se dá em decorrência do acúmulo do metal por este órgão, além da maior expressão da proteína neste tecido, conforme demonstrado nas figuras 23, 24 e 25.

No presente trabalho observou-se ainda que nas concentrações de 0,33 e 0,5 ppm os animais diminuíam (muito provavelmente alguns cessavam) a alimentação antes de morrerem. Esta observação também foi realizada por Abd Allah et al., (2003) com caramujos *B. glabrata* expostos ao cádmio, chumbo e mercúrio, e por Ruelas et al. (2006) em caramujos *B. glabrata* expostos à radiação ultravioleta.

Xuan et al. (2011) também observaram redução da ingestão de comida em caranguejos expostos ao cádmio. Como bem colocado por esses autores, a diminuição da alimentação é, em muitos casos, uma das primeiras respostas às perturbações ambientais, sendo um indicador sensível de estresse ambiental. A redução nutricional pode afetar o status de reserva energética do organismo, interferindo com os processos fisiológicos; assim a diminuição da ingestão de alimento, muito além de um sinal de redução no metabolismo, é um indicativo de envenenamento pelo cádmio.

O grande problema associado à redução na alimentação quando o organismo está exposto ao cádmio é a necessidade de um aporte maior de energia nesta situação, afinal a resistência a agentes agressores é um processo energeticamente custoso para a manutenção das funções vitais, tais como crescimento, reprodução e resistência parasitária (Schreck, 2010).

Abd Allah et al. (2003) obtiveram efeitos sobre a sobrevivência do caramujo *B. glabrata* em concentrações de cádmio abaixo das utilizadas neste trabalho. Os autores relatam mortalidade de 100% dos animais em 96 horas, após exposição a 0,55 ppm de cloreto de cádmio. Os animais utilizados no estudo, entretanto eram menores (11,5-12,5 mm) que os utilizados nesse trabalho, e foram criados em água artificial, o que diminui a probabilidade de exposição dos caramujos a interferentes externos, mesmo que em níveis considerados abaixo do limiar de efeitos. Além disso, a exposição ao metal deste grupo foi conduzida em incubadora (28 °C) e não à temperatura ambiente como foi o nosso teste. Em nossa opinião, o tamanho menor dos caramujos, e a criação em água extremamente controlada diminuiu a resistência dos animais ao metal, assim uma concentração menor do metal foi suficiente para eliminar 100% da população em 96 horas.

Os autores observaram também aumento da sensibilidade dos animais mantidos à temperatura de experimentação (28 °C), em relação aos animais nas condições de criação (24 °C), mesmo quando foram realizadas tentativas de aclimatar os animais antes dos experimentos.

A análise estatística neste trabalho confirmou a escolha da temperatura de 33 °C e da concentração de 0,22 ppm como as mais adequadas para os experimentos de resistência cruzada. Verificou-se que a concentração de cádmio de 0,22 ppm, foi a maior concentração que não causou efeito letal significativo sobre os caramujos a um nível de significância de 5%; sendo observado um salto expressivo na mortalidade entre as concentrações de 0,22 ppm e 0,33 ppm (TAB. 3 e FIG. 16).

Após confirmação da indução da HSP70 pelo calor e pelo cádmio no molusco *B. glabrata*, e determinação da temperatura e concentração do metal nas quais sua expressão era maior, os experimentos de resistência cruzada foram conduzidos com base nesses resultados.

Neste trabalho, a ocorrência de resistência cruzada foi observada quando os moluscos pré-expostos a uma temperatura subletal de 33 °C apresentaram maior resistência ao cádmio em concentração letal que o grupo controle não pré-exposto ao calor. Os resultados do Western blot (FIG. 19 e 20) mostraram que essa temperatura induz a expressão da proteína HSP70. Assim, esse parece ser um dos fatores envolvidos nesse incremento da resistência dos animais ao metal, embora provavelmente não seja o único.

Os resultados confirmaram uma clara indução de resistência à concentração de 0,7 ppm de cádmio nos animais pré-expostos ao calor. Os animais controle, conforme esperado segundo o experimento da curva para determinação da $Cl_{50/96h}$ (TAB. 3), sobreviveram por

96 horas a esta concentração do metal, enquanto que os grupos pré-expostos a 33°C apresentaram sobrevivência aumentada até 192 horas, demonstrando a indução de resistência pela exposição prévia ao calor (TAB. 4).

Tedengren et al. (2000) também observaram aumento na resistência de moluscos *M. edulis* ao cloreto de cádmio após pré-exposição a um choque térmico subletal. Os efeitos do cádmio foram avaliados em relação aos parâmetros fisiológicos de consumo de oxigênio, excreção de amônia, clearance e crescimento; além da expressão da HSP70 nas brânquias dos moluscos. O pré-aquecimento não apenas aumentou os níveis da HSP70, como também conferiu maior resistência ao cádmio, mantendo as taxas de filtração do animal; e apenas uma alteração leve no crescimento foi observada subseqüente à exposição ao cádmio. Embora o anticorpo utilizado pelo grupo fosse sabidamente efetivo para o reconhecimento da proteína HSP70 e suas isoformas, e da proteína HSP90, esse grupo encontrou apenas uma isoforma da HSP70. Os autores reportaram ainda que a temperatura foi mais efetiva em induzir a HSP70 que o cádmio, o que também foi observado neste trabalho.

Resultados de resistência cruzada após exposição dos organismos à temperatura subletal foram encontrados também por Bond e Bradley (1995), que investigando a toxicidade do malation em *Daphnia magna*, concluíram que exposições prévias às temperaturas subletais proporcionaram maior proteção contra os efeitos tóxicos do inseticida, correlacionando essa maior proteção com a indução da proteína HSP70.

A plotagem dos resultados no gráfico de Kaplan-Meier mostrou que a curva de sobrevivência dos indivíduos pré-expostos a 33°C foi maior que a curva dos animais controle, não pré-expostos ao calor, confirmando a proteção conferida pelo estímulo subletal, resultando em incremento da sobrevida (FIG. 17).

Como feito para os outros experimentos, foi efetuada a análise com base em três métodos gráficos diferentes para verificar qual dos modelos (Exponencial, Weibull e Lognormal) seria o mais adequado para os dados de sobrevivência do caramujo *B. glabrata* ao cloreto de cádmio na concentração de 0,7 ppm após pré-exposição à temperatura de 33 °C. O modelo exponencial mostrou-se como o mais adequado, pois seu gráfico apresentou a curva mais aproximada da curva de Kaplan-Meier construída a partir dos dados do experimento.

Quando analisado o efeito contrário, ou seja, a indução de resistência à temperatura letal pelo cádmio, os animais também apresentaram um incremento na sobrevivência, observado na proporção de animais que morriam ao longo do experimento. A

sobrevivência esteve aumentada no que concerne ao tempo, considerando que o grupo pré-exposto ao metal sobreviveu uma hora a mais em relação ao controle não pré-exposto ao cádmio, e a taxa de mortalidade foi mais lenta nos animais pré-expostos ao metal. Nas três primeiras horas 88,5% dos animais controles já haviam morrido, enquanto que nos animais pré-expostos ao cádmio a mortalidade foi de 51,4%. Após a morte de todos os animais controle, ainda restavam 2,9% dos pré-expostos ao cádmio.

A comparação entre os três modelos (Exponencial, Weibull e Lognormal) feita com base em três métodos gráficos diferentes, com o intuito de determinar o modelo mais adequado aos dados, mostrou o modelo Weibull como o mais pertinente, pois este apresentou o gráfico que continha os pontos que mais se aproximaram da curva de Kaplan-Meier dos dados estudados (FIG. 18).

Durante a realização dos experimentos com o cádmio foram observadas também variações entre as replicatas. Embora a proteína HSP70 tenha se mostrado mais elevada nos animais expostos a 0,22 ppm seguidos pelos expostos a 0,33 e 0,15 ppm, respectivamente, em algumas réplicas essa diferença se mostrou mais discreta, inclusive para o grupo controle, que em alguns experimentos apresentarou valores basais da proteína HSP70 bastante elevados se comparados aos grupos pré-induzidos com os estímulos estressores. Da mesma forma, em alguns grupos expostos a concentrações mais baixas do metal, que antes não haviam apresentado resposta expressiva da proteína HSP70, foi observada uma expressão maior da proteína, levando-nos a acreditar que existe uma variação natural desta proteína na espécie de caramujos *B. glabrata*. Os testes estatísticos, entretanto, confirmaram similaridades entre as replicatas experimentais em um nível de significância de 5%.

Levando-se em conta que os níveis basais de expressão da HSP70 em *B. glabrata* não são conhecidos, foi feita a avaliação individual da HSP70. Conforme observado nas FIG. 26, 27, 28 e 29 a exposição aos agentes agressores selecionados para a indução da HSP70 (calor de 33 °C e cloreto de cádmio a 0,22 ppm), ocasionou respostas diferentes nos indivíduos, com maior indução em alguns e quase nenhuma indução em outros; nestes, os níveis eram comparáveis aos dos grupos controles. Mesmo dentro do grupo controle negativo, foi observado que alguns indivíduos apresentavam um nível consideravelmente alto do que se imagina ser a forma constitutiva da proteína HSP70 (FIG. 30 e 31).

Com base em tais observações, ficou estabelecido neste trabalho que um mínimo de 10 animais deveria ser analisado como um pool por grupo experimental, visando

homogeneizar as respostas para as condições testadas, e minimizar erros de interpretação dos resultados. Acreditamos que a variação que observamos nos experimentos de indução da proteína HSP70 pelo cádmio foi devido à análise da proteína em pool de 5 animais, o que não seria suficiente para uniformizar a variação natural desta proteína na espécie *B. glabrata*. Regoli et al. (2006), na discussão de seu trabalho com moluscos terrestres também assinalou a importância de análises replicadas, em pool de animais, contudo para estes autores a análise de 5 réplicas de pelo menos 4 animais cada uma seria suficiente para evitar interpretaçãoes errôneas dos dados experimentais.

Há que ser levado em consideração ainda, que a família HSP, como proteína ubíqua que é, está presente naturalmente na célula tanto na forma constitutiva como na forma induzida, mantendo o funcionamento celular. Embora seja uma família bem conservada filogeneticamente e responsiva a uma grande variedade de estímulos, as diversas isoformas da proteína nem sempre são bem distinguidas em um único experimento, o que depende da metodologia empregada e dos marcadores escolhidos, principalmente quando se trata de anticorpos, como bem colocado por Jackson et al. (2011) na discussão de seu trabalho com ostras *C. virginica* e *C. gigas*, onde observaram que a detecção de todas as isoformas da proteína HSP70 presentes em um organismo pode se mostrar variável conforme o anticorpo utilizado. Os autores comparando seus resultados com outros trabalhos apontaram para as discrepâncias observadas entre os resultados da indução da proteína HSP70 em ostras *C. virginica* e *C. gigas* nos trabalhos que utilizaram outro clone do anticorpo, embora do mesmo fabricante.

Nem todos os anticorpos comercialmente disponíveis oferecem uma distinção precisa entre as diversas isoformas da HSP70, e neste trabalho o anticorpo primário utilizado para identificação da proteína no caramujo foi um anticorpo policlonal, que embora reconheça a porção conservada filogeneticamente da proteína HSP70, pode não diferenciar muito bem a porção constitutiva da induzida.

Isso nos leva a deduzir duas hipóteses para a expressão aumentada da proteína encontrada em alguns dos nossos experimentos: talvez esses níveis elevados sejam uma expressão basal da isoforma constitutiva, que nesta espécie seja naturalmente elevada, o que não se relacionaria com a indução desta proteína por estímulos agressores. Fato este que poderia ser elucidado com o desenvolvimento de um anticorpo específico para reconhecimento da porção induzida da proteína HSP70 em *B. glabrata*, tal como fez Kalosaka et al.(2009) em seu estudo com o inseto *Ceratitis capitata*. Outra explicação seria

a inexistência da porção induzida da proteína HSP70 no caramujo, sendo uma mesma proteína com função constitutiva e de resposta a agressões.

Tedengren et al. (2000) também observaram discrepâncias em seus experimentos em relação ao anticorpo. Este grupo utilizou anticorpo policlonal de vertebrado para estudar a proteína HSP70 da brânquia de moluscos *M. edulis* com base nos achados de outros autores que o aumento da HSP70 foi maior neste tecido do molusco que em outros. Embora este anticorpo seja sabidamente reativo não apenas para a HSP70 em várias isoformas, como também para a HSP90, os autores encontraram apenas uma isoforma de HSP70 indutível no Western blot.

Lee et al. (2006) por outro lado observaram um fenômeno diferente com larvas de *Chironomus tentans*: em relação à exposição ao cádmio, a isoforma indutível apresentou níveis mais elevados, embora também tenha sido observada uma resposta dose-dependente na isoforma constitutiva. Tanto a HSP70 quanto a HSC70 foram induzidas em resposta a estressores ambientais neste organismo.

Webb & Gagnon (2009) observaram diferenças na resposta da HSP70 entre os tecidos e entre os indivíduos de peixes *Acanthopagrus butcheri* coletados de ambientes estuarinos com alta variabilidade de poluentes. Os autores concluíram que, devido a essa grande intervariabilidade tecidual e individual, o ensaio com a proteína deveria ser complementado com os resultados de alterações em outros biomarcadores.

De fato, a proteína HSP70 não tem especificidade para nenhum agente agressor, como já foi pontuado por Mukhopadhyay et al. (2003) e Lee et al. (2006). Isso, entretanto, não invalida sua aplicabilidade em um *screening* inicial de possíveis efeitos decorrentes de uma exposição ambiental a agentes agressores, dando subsídios para estudos mais aprofundados e direcionados para marcadores específicos de interesse, conforme cada caso investigado.

Qualquer organismo que apresente boa correlação entre a indução de proteínas HSPs e estímulos do ambiente pode representar um potencial bioindicador para estudos ambientais, visto a função das proteínas HSPs na resposta de proteção do organismo, servindo como marcador de danos fisiológicos.

Os experimentos da curva de resposta correlacionada ao tempo de exposição neste trabalho (FIG. 32 e 33) apontaram para um pico de indução da proteína HSP70 pelo calor após 48 horas de exposição a 33 °C; enquanto que o cloreto de cádmio apresentou o pico de indução a partir de 96 horas após a exposição ao metal, embora não seja possível

afirmar este como o momento exato de maior indução da proteína durante uma exposição prolongada ao metal, visto que o experimento não foi continuado além das 96 horas.

Os resultados da curva tempo-resposta nesse trabalho, de certo modo, não surpreenderam visto que se esperava que o pico de indução pelo calor aparecesse mais precocemente que pela indução pelo cádmio, considerando que este último sofre absorção e transformações químicas no organismo, antes de ser bioacumulado pelo molusco.

Visto que não havia referências anteriores sobre as temperaturas subletais e tempo de exposição ao calor para o molusco *B. glabrata*, e do mesmo modo a literatura carecia de informações sobre os efeitos subletais do cádmio neste animal, o esquema experimental de exposição durante 120 horas ao calor e 96 horas ao cloreto de cádmio teve o propósito de garantir que houvesse tempo suficiente para que esses estímulos interagissem com o caramujo, induzindo resposta de defesa, o que inclui indução da proteína HSP70.

Embora seja sabido que a indução de termotolerância não seja um efeito exclusivo do calor, com indução de HSPs (Carretero et al., 1991; Boutibonnes et al., 1992), neste trabalho os melhores resultados foram observados com este estímulo.

Concordando com outros autores (Abd Allah, et al., 1997; Aisemberg et al., 2005; Ansaldo et al., 2006), nosso estudo também aponta para a potencial utilização do caramujo *B. glabrata* como bioindicador de contaminação ambiental aquática, em particular para metais (Ansaldo et al., 2009).

Outros autores já haviam apontado para o potencial deste molusco no monitoramento ambietal: Aisemberg et al. (2005) comparando a resposta enzimática e de acumulação de metal na exposição ao chumbo entre o caramujo *B. glabrata* e o poliqueta *Lumbriculus variegatus*, concluiu que o caramujo se mostrou melhor modelo para estudos de contaminação ambiental pelo metal; enquanto que Kristoff et al. (2006) utilizando os mesmos organismos para estudar o efeito de pesticidas organofosforados observou este poliqueta mais responsivo, inclusive com recuperação mais rápida e acentuada que o molusco (2006).

Aisemberg et al. (2005) e Kristoff et al. (2006) descreveram um tempo longo de recuperação dos efeitos de agentes agressores (entre 5-11 dias) apresentado pelo caramujo *B. glabrata* quando exposto a metal e inseticida. Acreditamos que em relação ao cádmio o caramujo também necessitaria de um tempo prolongado para recuperação dos efeitos, embora seja difícil precisar este tempo. Para o calor imaginamos que este tempo seria menor em relação ao cádmio. Um dos objetivos iniciais deste trabalho era determinar a cronologia de recuperação dos níveis basais da proteína HSP70, que daria um indicativo da

recuperação do caramujo em relação aos efeitos do metal e do calor, entretanto não foi possível realizar este experimento até o prazo final da tese.

O monitoramento com o caramujo ganha importância considerando que este animal se mostrou sensível a metais em concentrações abaixo dos limites permidos em legislação, e que os caramujos pulmonados habitam regiões litorâneas, que normalmente são as mais expostas à contaminação, como bem colocado por Abd Allah et al. (2003).

Os resultados apresentados neste trabalho representam um ponto de partida para o estudo da proteína HSP70 em caramujos *B. glabrata*. Contudo, os dados obtidos mostram limitações na metodologia de Western blot para a padronização desta molécula como biomarcador de estresse ambiental neste caramujo.

A investigação com novas metodologias, que forneçam outras informações sobre a resposta das HSPs deste molusco frente a estresses ambientais, será de grande valia no campo da ecotoxicologia. Uma das nossas sugestões é a análise da indução da proteína por meio de estudos da transcrição do mRNA utilizando a técnica de PCR em tempo real.

Também acreditamos que a produção de um anticorpo específico para a proteína HSP70 do caramujo *B. glabrata* favoreceria um melhor reconhecimento de sua porção indutível, possibilitando, inclusive, a aplicação de ensaios mais quantitativos como o ELISA.

Outra metodologia que acreditamos ser de grande valia é a análise proteômica do caramujo, correlacionando todas as proteínas responsivas aos diferentes estímulos. Esse estudo possibilitaria, além da investigação da resposta da proteína HSP70 aos estímulos agressores, a construção de um panorama de todas as demais proteínas alteradas no processo, seja por indução ou por inibição, por meio da comparação entre o grupo controle e o grupo exposto.

A utilização de aminoácidos marcados constitui outra alternativa para a identificação de proteínas recém sintetizadas após um estresse ambiental, o que permitiria monitorar as proteínas que seriam produzidas após a exposição do animal.

Uma vez definida a melhor metodologia de análise da proteína HSP70 neste organismo, a investigação de uma ampla variedade de estímulos, de diferentes classes (químicos, físicos e biológicos) faz-se necessária para o conhecimento mais profundo do comportamento da proteína no caramujo, e sua aplicação rotineira como biomarcador de estresses ambientais. Este é um procedimento padrão no estabelecimento de biomarcadores, como pode ser visto em citações de outros autores (p. ex.: Lee et al., 2006).

Esta varredura da resposta do molusco *B. glabrata* a diversos estímulos permitiria o seu maior conhecimento e padronização como bioindicador.

7 CONCLUSÕES

- A pré-exposição do caramujo *B. glabrata* a estímulos subletais é capaz de induzir resistência a estímulos normalmente letais para a espécie;

- A proteína HSP70 parece estar correlacionada com o aumento nesta resistência dos caramujos aos agentes letais, após pré-exposição a estímulos subletais;

- A proteína HSP70 parece não ser o único fator envolvido no processo de resistência do molusco nos fenômenos de termotolerância e tolerância cruzada;

- A proteína HSP70 alcança seu pico de indução no caramujo *B. glabrata* após 48 horas de exposição ao calor e não antes de 96 horas de exposição ao $CdCl_2$;

- A glândula digestiva é o melhor tecido para estudos da resposta da proteína HSP70 ao calor e ao cádmio em caramujos *B. glabrata*;

- A proteína HSP70 apresenta-se como um potencial biomarcador para estresse ambiental.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD ALLAH, A. T.; WANAS, M. Q. S.; THOMPSON, S. N. Effects of heavy metals on survival and growth of *Biomphalaria glabrata* Say (Gastropoda: Pulmonata) and interaction with schistosome infection. **J. Moll. Stud.**, v. 63, p. 79-86. 1997.

ABD ALLAH, A. T.; WANAS, M. Q. S.; THOMPSON, S. N. Dissolved heavy metals, lead, cadmium and mercury, accumulate in the body of the schistosome vector *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda: Pulmonata). **J. Moll. Stud.**, v. 69, p. 35-41. 2003.

ABNT-ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 14571, Cádmio - Processo de tratamento em efluentes líquidos.** São Paulo: ABNT, 2000. 6 p.

ABNT-ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 12713, Ecotoxicologia aquática - toxicidade aguda - método de ensaio com *Daphnia spp* (Cladocera, Crustacea)**. São Paulo: ABNT, 2004. 21 p. (a)

ABNT-ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 15088, Ecotoxicologia aquática - toxicidade aguda - método de ensaio com peixes**. São Paulo: ABNT, 2004. 17 p. (b)

ABNT-ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 15350, Ecotoxicologia aquática - toxicidade crônica de curta duração - método de ensaio com ouriço-do-mar (Echinodermata: Echinoidea)**. São Paulo: ABNT, 2006. 19 p.

ABNT-ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 15470, Ecotoxicologia aquática - toxicidade em sedimento - método de ensaio com *Hyalella spp* (Amphipoda)**. São Paulo: ABNT, 2007. 20 p.

ABRAMOFF, M. D.; MAGALHAES, P. J.; RAM, S. J. Image Processing with ImageJ. **Biophotonics Int.**, v. 11, p. 36-42. 2004.

AHN, Y. J.; CLAUSSEN, K.; ZIMMERMAN, J. L. Genotypic differences in the heat-shock response and thermotolerance in four potato cultivars. **Plant Sci.**, v. 166, p. 901-911. 2004.

AISEMBERG, J.; NAHABEDIAN, D. E.; WIDER, E. A.; VERRENGIA GUERRERO, N. R. Comparative study in two freshwater invertebrates for monitoring environmental lead exposure. **Toxicology**, v. 210, p. 45-53. 2005.

AL-WHAIBI, M. H. Plant heat shock proteins: A mini review. **Journal of King Saud University – Science**, v. 23, p. 139-150. 2011.

ALVES, L. A. & UTURBEY, W. Environmental degradation costs in electricity generation: The case of the Brazilian electrical matrix. **Energ. Policy**, v. 38, p. 6204-6214. 2010.

AMANO, M.; LIDA, S.; KOSUGE, K. Comparative studies of thermotolerance: different modes of heat acclimation between tolerant and intolerant aquatic plants of the genus *Potamogeton*. **Ann. Bot.**, v. 109, p. 443-452. 2012.

AMORIM, L. C. A. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. **Rev. Bras. Epidemiol.**, v. 6, p. 158-170. 2003.

ANDERSON, R. L., HERMAN, T. S., VAN KERSEN, I., HAHN, G. M. Thermotolerance and heat shock protein induction by slow rates of heating. **Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.**, v. 15, p. 717-725. 1988.

ANSALDO, M.; NAHABEDIAN, D. E.; BROWN, E. H.; AGOTE, M.; ANSAY, C. V.; VERRENGIA GUERRERO, N. R.; WIDER, E. A. Potential use of glycogen level as biomarker of chemical stress in *Biomphalaria glabrata*. **Toxicology**, v. 224, p. 119-127. 2006.

ANSALDO, M.; NAHABEDIAN, D. E.; DI FONZO, C.; WIDER, E. A. Effect of cadmium, lead and arsenic on the oviposition, hatching and embryonic survival of *Biomphalaria glabrata*. **Sci. Total Environ.**, v. 407, p. 1923-1928. 2009.

ATSDR- Agency for Toxic Substances and Disease Registry. **Interaction profile for: arsenic, cadmium, chromium, and lead.** Buford Hwy, NE: ATSDR, 2004. p. 147-153.

AZEVEDO, F. A. & CHASIN, A. A. M. (Coord.) **As bases toxicológicas da ecotoxicologia**. São Carlos: RiMa, 2003. p. 167-220.

AZEVEDO, C. M.; BORGES, C. C.; ANDRADE, Z. A. Behavior of *Schistosoma mansoni*-induced histopathological lesions in *Biomphalaria glabrata* submitted to ionizing radiation. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 37, p. 218-221. 2004.

BARBOSA, F. S. (org.) **Tópicos em malacologia médica**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz. 1995. p. 15-17, 25-36, 42, 80-84, 96-98, 115-154.

BEHESHTI, H. The prospective environmental impacts of Iran nuclear energy expansion. **Energ. Policy**, v. 39, p. 6351-6359. 2011.

BERNARD, A. Cadmium & its effects on human health. **Indian J. Med. Res.**, v.128, p. 557-564. 2008.

BERTIN G.; AVERBECK D. Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). **Biochimie**, v. 88, p. 1549-1559. 2006.

BIERKENS, J. G. E. A. Applications and pitfalls of stress-proteins in biomonitoring. **Toxicology**, v. 153, p. 61-72. 2000.

BOND, J. A. & BRADLEY, B. P. Heat-shock reduces the toxicity of malathion in *Daphnia magna*. **Mar. Environ. Res.**, v. 39, p. 209-212. 1995.

BOND, H. W. & NOLAN, M. O. Results of laboratory screening tests of chemical compounds for molluscicidal activity: II. Compounds of mercury. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 3, p.187-190. 1954.

BORÉM, A. & VIEIRA, M. L. C. **Glossário de biotecnologia**. Viçosa: Editora Folha de Viçosa, 2005. 183 p. Disponível em: <http://www.cib.org.br/glossario.php>. Acesso em: 11 Ago 2008.

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

BOUTIBONNES, P.; TRANCHARD, C.; HARTKE, A.; THAMMAVONGS, B.; AUFFRAY, Y.. Is thermotolerance correlated to heat-shock protein synthesis in *Lactococcus lactis* subsp, *lactis*? **Int. J. Food Microbiol.**, v. 16, p. 227-236. 1992.

BRADLEY, B. P. & WARD, J. B. Detection of a major stress protein using a peptide antibody. **Mar. Environ. Res.**, v. 28, p. 471-475. 1989.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. COORDENAÇÃO GERAL DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE AMBIENTAL. **Avaliação de risco à saúde humana por metais pesados: Santo Amaro da Purificação, Bahia**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2003. p. 169-171.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. **Vigilância e controle de moluscos de importância epidemiológica: diretrizes técnicas: Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose (PCE) / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica**. 2ª. ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2007. p. 13-29.

BRUGNOLI, E.; CLEMENTE, L. B.; BORTHAGARAY, A.; SCARABINO, F. Golden mussel *Limnoperna fortunei* (Bivalvia: Mytilidae) distribution in the main hydrographical basins of Uruguay: update and predictions. **An. Acad. Bras. Ciênc.**, v. 77, p. 235-244. 2005.

BRUN, N. T.; BRICELJ, V. M.; MACRAE, T. H.; ROSS, N. W. Heat shock protein responses in thermally stressed bay scallops, *Argopecten irradians*, and sea scallops, *Placopecten magellanicus*. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, v. 358, p. 151-162. 2008.

CAMPOS, A. Comitê de Bacia quer participar de debate sobre usina nuclear. **Repórter Brasil**, São Paulo, 22 jun. 2007. Disponível em: <http://www.reporterbrasil.com.br/exibe.php?id=1094>. Acesso em 23 fev. 2009.

CANTINHA, R. S.; BORRELY, S. I.; NAKANO, E.; AMARAL, A.; SILVA, L. R. S.; MELO, A. M. M. A. Effects of high dose rate gamma radiation on survival and reproduction of *Biomphalaria glabrata*. **Int. J. Low Radiation**, v. 7, p. 245-252. 2010.

CARRETERO, M. T.; CARMONA, M. J.; DÍEZ, J. L. Thermotolerance and heat shock proteins in *Chironomus*. **J. Insect Physiol.**, v. 37, p. 239-246. 1991.

CELLURA, C.; TOUBIANA, M.; PARRINELLO, N.; ROCH, P. HSP70 gene expression in *Mytilus galloprovincialis* hemocytes is triggered by moderate heat shock and V*ibrio anguillarum*, but not by *V. splendidus* or *Micrococcus lysodeikticus*. **Dev. Comp. Immunol.**, v. 30, p. 984-997. 2006.

CHENG, T. C. & SULLIVAN, J. T. A comparative study of the effects of two copper compounds on the respiration and survival of *Biomphalaria glabrata* (mollusca: pulmonata). **Comp. Gen. Pharmacol.**, v. 4, p. 315-320. 1973.

CHENG, T. C. & SULLIVAN, J. T. Alterations in the osmoregulation of the pulmonate gastropod *Biomphalaria glabrata* due to copper. **J. Invertebr. Pathol.**, v. 29, p. 101-104. 1977.

COCHÓN, A. C.; DELLA PENNA, A. B.; KRISTOFF, G.; PIOL, M. N.; SAN MARTÍN DE VIALE, L. C.; VERRENGIA GUERRERO, N. R. Differential effects of paraquat on oxidative stress parameters and polyamine levels in two freshwater invertebrates. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 68, p. 286-292. 2007.

COLLINS, M. V.; FLICK, G. J.; SMITH, S. A.; FAYER, R.; RUBENDALL, E.; LINDSAY, D. S. The effects of E-beam irradiation and microwave energy on eastern oysters (*Crassostrea virginica*) experimentally infected with *Cryptosporidium parvum*. **J. Eukaryot. Microbiol.**, v. 52, p. 484-488. 2006.

COLOSIMO, E. A. & GIOLO, S. R. **Análise de Sobrevivência Aplicada.** São Paulo: Edgard Blücher. 2006. 392p.

CONAMA-CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE, **Resolução Nº 357/2005**. "Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências." CONAMA-CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE, Brasília, DF. Data da legislação: 17/03/2005 - Publicação DOU nº 053, de 18/03/2005, págs. 58-63.

CONSIDINE, T.; PATEL, H. A.; ANEMA, S. G.; SINGH, H.; CREAMER, L. K. Interactions of milk proteins during heat and high hydrostatic pressure treatments-a review. **Innov. Food Sci. Emerg.**, v. 8, p. 1-23. 2007.

DAVID, E.; TANGUY, A.; PICHAVANT, K.; MORAGA, D. Response of the pacific oyster *Crassostrea gigas* to hypoxia exposure under experimental conditions. **FEBS J.**, v. 272, p. 5635-5652. 2005.

DEJONG, R. J.; MORGAN, J. A. T.; PARAENSE, W. L.; POINTIER, J; AMARISTA, M.; AYEH-KUMI, P. F. K.; BABIKER, A.; BARBOSA, C. S.; BRÉMOND, P.; CANESE, A. P.; SOUZA, C. P.; DOMINGUEZ, C.; FILE, S.; GUTIERREZ, A.; INCANI, R. N.; KAWANO, T.; KAZIBWE, F.; KPIKPI, J.; LWAMBO, N. J. S..; MIMPFOUNDI, R.; NJIOKOU, F.; PODA, J. N.; SENE, M.; VELÁSQUEZ, L. E.; YONG, M.; ADEMA, C. M.; HOFKIN, B. V.; MKOJI, G. M.; LOKER, E. S. Evolutionary relationships and biogeography of *Biomphalaria* (Gastropoda: Planorbidae) with implications regarding its role as host of the human bloodfluke, *Schistosoma mansoni*. **Mol. Biol. Evol.**, v. 18, p. 2225-2239. 2001.

DUFFY, L. K.; SCOFIELD, E.; RODGERS, T.; PATTON, M.; BOWYER, R. T.; Comparative baseline levels of mercury, HSP70 and HSP60 in subsistence fish from Yukon-Kuskokwim delta region of Alaska. **Comp. Biochem. Physiol. Part C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.**, v. 124, p.181-186. 1999.

EEA-EUROPEAN ENVIRONMENTAL AGENCY. **Environment and Health, EEA Report n° 10/2005**. Luxembourg: EEA. 2005. 35 p.

EDER, K. J.; LEUTENEGGER, C. M.; KÖHLER, H. R.; WERNER, I. Effects of neurotoxic insecticides on heat-shock proteins and cytokine transcription in Chinook salmon (Oncorhynchus Tshawytscha). **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 72, p. 182-190. 2009.

ESTEVAM, E. C.; NAKANO, E.; KAWANO, T.; PEREIRA, C. A. B.; AMANCIO, F. F.; MELO, A. M. M. A. Dominant lethal effects of 2,4-D in *Biomphalaria glabrata*. **Mutat. Res.**, v. 611, p. 83-88. 2006.

FARCY, E.; VOISEUX, C.; LEBEL, J.; FIEVET, B. Seasonal changes in mRNA encoding for cell stress markers in the oyster *Crassostrea gigas* exposed to radioactive discharges in their natural environment. **Sci. Total Environ.**, v. 374, p. 328-341. 2007.

FEI, G. H. & FENG, Z. P. Chronic hypoxia-induced alteration of presynaptic protein profiles and neurobehavioral dysfunction are averted by supplemental oxygen in *lymnaea stagnalis*. **Neuroscience**, v. 153, p. 318-328. 2008.

FERNANDEZ, M. A.; LIMAVERDE, A. M.; CASTRO, I. B.; ALMEIDA, A. C. M.; WAGENER, A. L. R. Occurrence of imposex in *Thais haemastoma*: possible evidence of environmental contamination derived from organotin compounds in Rio de Janeiro and Fortaleza, Brazil. **Cad. Saúde Pública**, v. 12, p. 463-476. 2002.

FERREIRA, A. S.; TÓTOLA, M. R.; KASUYA, M. C. M.; ARAÚJO, E. F.; BORGES, A. C. Small heat shock proteins in the development of thermotolerance in *Pisolithus sp*. **J. Therm. Biol.**, v. 30, p. 595-602. 2005.

FRANKENBERG, M. M.; JACKSON, S. A.; CLEGG, J. S. The heat shock response of adult *Artemia franciscana*. **J. Therm. Biol.**, v. 25, p.481-490. 2000.

FRANTSEVICH, L. I.; PAN'KOV, I. V.; ERMAKOV, A. A.; KORNYUSHIN, A. V.; ZAKHARCHUK, T. N. Molluscs as indicators of environmental pollution by radionuclides. **Russ. J. Ecol.**, v. 26, p. 47-52. 1995.

FRANZELLITTI, S.; BURATTI, S.; DONNINI, F.; FABBRI, E. Exposure of mussels to a polluted environment - Insights into the stress. **Comp. Biochem. Physiol. Part C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol**, v.152, p. 24-33. 2010.

GONZALEZ, C.; GREENWOOD, R.; QUEVAUVILLER, P. **Rapid chemical and biological techniques for water monitoring**. Chichester: Wiley. 2009. p. 39-50; 125; 134; 221-239.

GRAZEFFE, V. S.; TALLARICO, L. F.; PINHEIRO, A. S.; KAWANO, T.; SUZUKI, M. F.; OKAZAKI, K.; PEREIRA, C. A. B.; NAKANO, E. Establishment of the comet assay in the freshwater snail *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). **Mutat. Res**, v. 654, p. 58-63. 2008.

GUPTA, R. C. (ed.) **Veterinary Toxicology: Basic and clinical principles**. London: Elsevier, 2007. p. 422-426.

GUPTA, S. C.; SHARMA, A.; MISHRA, M.; MISHRA, R. K.; CHOWDHURI, D. K. Heat shock proteins in toxicology: How close and how far? **Life Sci.**, v. 86, p. 377-384. 2010.

HAMILTON, M. A.; RUSSO, R. C.; THURSTOS, R.V. Trimmed Spearman-Karber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environ. Sci. Technol.**, v.11, p. 714-719. 1977.

HOFFMAN, D. O. & ZAKHARY, R. The relationship of exposure time to the molluscicidal activity of copper sulfate, **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 2, p.332-336. 1953.

HOLMSTRUP, M.; BINDESBOL, A.M.; OOSTINGH, G. J.; DUSCHI, A.; SCHEIL, V.; KOHLER, H.R.; LOUREIRO, S.; SOARES, A. M. V. M.; FERREIRA, A. L G.; KIENLE, C.; GERHARDT, A.; LASKOWSKI, R.; KRAMARZ, P. E.; BAYLEY, M.; SVENDSEN, C.; SPURGEON, D. J. Interactions between effects of environmental chemicals and natural stressors: A review. **Sci. Total Environ.**, v. 408, p. 3746-3762. 2010.

IARC-International Agency for Research on Cancer. **IARC Summary & Evaluations**. Lyon: IARC, v. 58, p.119. 1993. Disponível em: <http://www.inchem.org/pages/iarc.html>. Acesso em: 30 Ago. 2010.

ImageJ [internet]. Bethesda: National Institute of Health (NIH). Disponível em: <http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>. Acesso em 22 Jul 2012.

ITTIPRASERT, W.; NENE, R.; MILLER, A.; RAGHAVAN, N.; LEWIS, F.; HODGSON, J.; KNIGHT, M. *Schistosoma mansoni* infection of juvenile *Biomphalaria glabrata* induces a differential stress response between resistant and susceptible snails. **Exp. Parasitol.**, v. 123, p. 203-211. 2009.

IVANINA, A. V.; TAYLOR, C.; SOKOLOVA, I. M. Effects of elevated temperature and cadmium exposure on stress protein response in eastern oysters *Crassostrea virginica* (Gmelin). **Aquat. Toxicol.**, v. 91, p. 245-254. 2009.

JACKSON, S. A.; UHLINGER, K. R.; CLEGG, J. S. Duration of induced thermal tolerance and tissue-specific expression of *hsp/hsc70* in the eastern oyster**,** *Crassostrea virginica* and the pacific oyster**,** *Crassostrea gigas*. **Aquaculture**, v. 317, p. 168-174. 2011.

JARA, V. C. & WIEGAND, C. Molecular biomarkers of *Dreissena polymorpha* for evaluation of renaturation success of a formerly sewage polluted stream. **Environ. Pollut.**, v. 155, p. 182-189. 2008.

JOSEPH, P.; MACDONELL, M.; HAROUN, L.; MONETTE, F. **Radiological and Chemical Fact Sheets to Support Health Risk Analyses for Contaminated Areas**. Washington: U.S. Department of Energy. 2007. p. 5-6.

JOSEPH, P. Mechanisms of cadmium carcinogenesis. **Toxicol. Appl. Pharmacol**., v. 238, p.272-279. 2009.

KALOSAKA, K.; SOUMAKA, E.; POLITIS, N.; MINTZAS, A. C. Thermotolerance and HSP70 expression in the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata*. **J. Insect physiol.**, v. 55, p.568-573, 2009.

KAWANO, T.; OKAZAKI, K.; RÉ, L. Embryonic development of *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) (Mollusca, Gastropoda, Planorbidae): a practical guide to the main stages. **Malacologia**, v. 34, p. 25-32. 1992.

KIM, Y. K.; YOO, W. I.; LEE, S. H.; LEE, M. Y. Proteomic analysis of cadmium-induced protein profile alterations from marine alga *nannochloropsis oculata*. **Ecotoxicology**, v. 14, p.589-596. 2005.

KIM, H. J.; HWANG, N. R.; LEE, K. J. Heat shock responses for understanding diseases of protein denaturation. **Mol.Cells**, v. 23, p. 123-131. 2007.

KIMBROUGH, K. L.; JOHNSON W. E; LAUENSTEIN G. G.; CHRISTENSEN J. D.; APETI D. A. **An Assessment of Two Decades of Contaminant Monitoring in the Nation's Coastal Zone. Silver Spring, MD. NOAA Technical Memorandum**. **NOS NCCOS 74.** Silver Springer: NOS NCCOS. 2008. 105 pp. Disponível em: <http://ccma.nos.noaa.gov/about/coast/nsandt/welcome.html>. Acesso em: 14 out. 2010.

KOMIYA, Y. The prevention of Schistosomiasis japonica. In: MORISHITA, K.; KOMIYA,Y. MATSUBAYASHI, H. (ed.). **Progress of Medical Parasitology in Japan**. Vol. 1. Tokyo: Meguro Parasitological Museum. 1964. p. 245-274.

KREGEL, K. C. Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. **J. Appl. Physiol.**, v. 92, p. 2177-2186. 2002.

KRISTOFF, G.; VERRENGIA GUERRERO, N. R.; D'ANGELO, A. M. P.; COCHÓN, A. C. Inhibition of cholinesterase activity by azinphos-methyl in two freshwater invertebrates: *Biomphalaria glabrata* and *Lumbriculus variegatus*. **Toxicology**, v. 222, p. 185-194. 2006.

KRISTOFF, G.; VERRENGIA GUERRERO, N. R.; COCHÓN, A. C. Inhibition of cholinesterase and carboxylesterases of two invertebrates species, *Biomphalaria glabrata* and *Lumbriculus variegates* by carbamate pesticide carbaryl. **Toxicology**, v. 96, p. 115-123. 2010.

KUMAR, N.; ZHENG, H. Evidence for epitope-specific thymus-independent response against repeat sequence in a protein antigen. **Immunology**, v. 94, p 28-34. 1998

LACOSTE, A.; CIAN, M. C.; CUEFF, A.; POUYLET, S. A. Noradrenaline and α-adrenergic signaling the *hsp70* gene in mollusk immune cells. **J. Cell Sci.**, v. 14, p. 3557-3564. 2001.

LAURSEN, J. R.; LIU, H.; WU, X. J.; YOSHINO, T. P. Heat shock response in a molluscan cell line: characterization of the response and cloning of an inducible HSP70 cDNA. **J. Invertebr. Pathol.**, v. 70, p. 226-233. 1997.

LEE, S. M.; LEE, S. B.; PARK, C. H.; CHOI, J. Expression of heat shock protein and hemoglobin genes in *Chironomus tentans* (Diptera, chironomidae) larvae exposed to various environmental pollutants: a potential biomarker of freshwater monitoring. **Chemosphere**, v. 65, p. 1074-1081. 2006.

LEUNG, P. T. Y.; WANG, Y.; MAK, S. S. T.; NG, W. C.; LEUNG, K. M. Y. Differential proteomic responses in hepatopancreas and adductor muscles of the green-lipped mussel *Perna viridis* to stresses induced by cadmium and hydrogen peroxide. **Aquat. Toxicol.**, v. 105, p. 49-61. 2001.

LIBEREK, K.; LEWANDOWSKA, A.; ZIETKIEWICZ, S. Chaperones in control of protein disaggregation. **EMBO J.**, v. 27, p. 328-335. 2008.

LINDQUIST, S. The heat shock response. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 55, p. 1151-1191. 1986.

LINDQUIST, S. & CRAIG, E. A. The heat shock proteins. **Annu. Rev. Genet.**, v. 22, p. 631-677. 1988.

LOCKYER,A. E.; NOBLE, L. R.; ROLLINSON, D.; JONES, C. S. *Schistosoma mansoni*: resistant specific infection-induced gene expression in *Biomphalaria glabrata* identified by fluorescent-based differential display. **Exp. Parasitol.**, v.107, p. 97-104. 2004.

LOCKYER,A. E.; SPINKS, J.; KANE, R. A.; HOFFMANN, K. F.; FITZPATRICK, J. M.; ROLLINSON, D.; NOBLE, L. R.; JONES, C. S. *Biomphalaria glabrata* transcriptome: cDNA microarray profiling identifies resistant-and susceptible-specific gene expression in haemocytes from snail strais exposed to *Schistosoma mansoni*. **BMC Genomics**, v.9, 17 p. 2008.

LUNN, D. J.; THOMAS, A.; BEST, N.; SPIEGELHALTER, D. Winbugs - a bayesian modelling framework: Concepts, structure, and extensibility. **Stat. Comput.**, v. 10, p. 325-337. 2000.

MANZONI, G. C. & SCHMITT, J. F. Cultivo de ostras japonesas *Crassostrea gigas* (Mollusca: Bivalvia), na Armação de Itapocoroy, Penha, SC. In: BRANCO, J. O. & MARENZI, A. W. C. (Org.). **Bases ecológicas para um desenvolvimento sustentável: estudo de caso em Penha, SC**. Itajaí: Editora da UNIVALI, 2006. p. 245-252.

MCCARTY, L. S. & MUNKITTRICK, K. R. Environmental biomarkers in aquatic toxicology: Fiction, fantasy, or functional? **Hum. Ecol. Risk Assess.** v. 2, p. 268-274. 1996.

MEYER, T. N. & SILVA, A. L. Resposta celular ao estresse. **Rev. Assoc. Med. Brás.**, v. 45, p. 181-188. 1999.

MOSELEY, P. Stress proteins and the immune response. **Immunopharmacology**, v. 48, p. 299-302. 2000.

MUKHOPADHYAY, I.; NAZIR, A.; SAXENA, D. K.; CHOWDHURI D. K. Heat Shock Response: *hsp70* in Environmental monitoring. **J. Biochem. Mol. Toxicol.**, v. 17, p. 249-254. 2003.

MÜNZINGER, A. *Biomphalaria glabrata* (Say), a suitable organism for a biotest. **Environ. Technol. Lett.**, v. 8, p. 141-148. 1987.

NAKANO, E.; WATANABE, L. C.; OHLWEILER, F. P.; PEREIRA, C. A. B.; KAWANO, T. Establishment of the dominant lethal test in the freshwater mollusk *Biomphalaria glabrata* (SAY, 1818). **Mutat. Res.**, v. 536, p. 145-154. 2003.

NAS/NRC (National Academy of Sciences/National Research Council). **Biologic Markers in Reproductive Toxicology**, Washington, DC: National Academy Press. 1989. p. 15-29.

NEVES, D. P. **Parasitologia humana**. 12ª ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2011. p. 231-240.

NOLAN, M. O.; BOND, H. W.; MANN, E. R. Results of laboratory screening tests of chemical compounds for molluscicidal activity: I. Phenols and Related Compounds. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 2, p.716-752. 1953.

NOLAN, M. O. & BOND, H. W. Results of laboratory screening tests of chemical compounds for molluscicidal activity: III. Derivatives of abietic acid. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 4, p.152-155. 1955.

NOYES, P. D.; MCELWEE, M. K.; MILLER, H. D.; CLARK, B. W.; TIEM, L. A. V.; WALCOTT, K. C.; ERWIN, K. N.; LEVIN, E. D. The toxicology of climate change: Environmental contaminants in a warming world. **Environ. Int.**, v. 35, p. 971-986. 2009.

OEHLMANN, J. & OEHLMANN, U. S. Molluscs as boindicators. In: MARKET, B. A.; BREURE, A. M.; ZECHMEISTER, H. G. **Bioindicators and biomonitors: Principles, concepts and applications.** London: Elsevier, 2004. p. 577-635.

OKAZAKI, K.; ANDRADE JR., H. F.; KAWANO, T. Effect of ^{60}Co gamma radiation on *Biomphalaria glabrata* (Mollusca, Gastropoda) embryos: mortality, malformation and hatching. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 29, p. 1057-1067. 1996.

OLIVEIRA-FILHO, E. C.; LOPES, R. M.; PAUMGARTTEN, F. J. R. Comparative study on the susceptibility of freshwater species to copper-based pesticides. **Chemosphere**, v. 56, p. 369-374. 2004.

PAAVOLA, J. Sewage pollution and institutional and technological change in the United States, 1830-1915. **Ecol. Econ.**, v. 70, p. 1289-1296. 2011.

PARAENSE, W. L. Planorbídeos hospedeiros intermediários do *Schistosoma mansoni*. In: CUNHA, A. S. (org.) **Esquistossomose mansoni**. São Paulo: Sarvier. 1970. p. 13-30.

PARAENSE, W. L. Histórico do Gênero *Biomphalaria*, Morfologia e Sistemática Morfológica. In: CARVALHO, O. S.; COELHO, P. M. Z.; LENZI, H. L. (org.). **Schistosoma mansoni & Esquistossomose: uma visão multidisciplinar**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2008. p. 287-295.

PAULINI, E. & CAMEY, T. Ensaios de campo e de laboratório com o Planticuivre como moluscicida. **Rev. Brás. Malariol. Doenças Trop.**, v. 17, p. 49-53. 1965a.

PAULINI, E. & CAMEY, T. Um novo tipo de moluscicida com ação sistêmica. **Rev. Brás. Malariol. Doenças Trop.**, v. 17, p. 349-353. 1965b.

PELEGRINE, D. H. G. & GASPARETTO, C. A. Whey proteins solubility as function of temperature and pH. **LWT-Food Sci. Technol.**, v.38, p. 77-80. 2005.

PENA, L. B.; PASQUINI, L. A.; TOMARO, M. L.; GALLEGO, S. M. 20S proteasome and accumulation of oxidized and ubiquitinated proteins in maize leaves subjected to cadmium stress. **Phytochemistry**, v. 68, p. 1139-1146. 2007.

PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ, A. Estudos relativos aos efeitos da radiação ionizante sobre caramujos com vistas ao combate a estes hospedeiros do *Schistosoma mansoni*. **Rev. Brás. Malariol. Doenças Trop.**, v. 18, p. 139-152. 1966.

PESSÔA, S. B. & MARTINS, A. V. **Parasitologia médica**. 11ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988. p. 407-420.

PIANO, A.; ASIRELLI, C..; CASELLI, F.; FABBRI, E. HSP70 expression in thermally stressed *Ostrea edulis*, a commercially important oyster in Europe. **Cell Stress & Chaperones**, v. 7, p. 250-257, 2002.

PIANO, A.; VALBONESI, P.; FABBRI, E. Expression of cytoprotective proteins, heat shock protein 70 and metallothioneins, in tissues of *Ostrea edulis* exposed to heat and heavy metals. **Cell Stress & Chaperones**, v. 9, p. 134-142. 2004.

POINTIER, J.- P. Invading freshwater snails and biological control in Martinique Island, French west Indies. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 67-74. 2001.

POWERS, M. V. & WORKMAN, P. Inhibitors of the heat shock response: Biology and pharmacology. **FEBS Lett.**, v. 581, p. 3758-3769. 2007.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2010. Disponível em: <http://www.R-project.org>. Acesso em: 22 jul. 2012.

RAVERA, O. Influence of heavy metals on the reproduction and embryonic development of freshwater pulmonates (gastropoda; mollusca) and cladocerans (crustacea; Arthropoda). **Comp. Biochem. Physiol. Part C: Comp. Pharmacol.**, v.100, p. 215-219. 1991.

RASBAND, W. S. **ImageJ**, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, http://imagej.nih.gov/ij/, 1997-2012.

REGOLI, F.; GORBI, S.; FATTORINI, D.; TEDESCO, S.; NOTTI, A.; MACHELLA, N.; BOCCHETTI, R.; BENEDETTI, M.; PIVA, F. Use of the land snail *Helix aspersa* as sentinel organism for monitoring ecotoxicology effects of urban pollution: an integrated approach. **Environ. Health Perspect.**, v. 144, p. 63-69. 2006.

RENUGADEVI, J.; PRABU, S. M. Cadmium-induced hepatotoxicity in rats and the protective effect of naringenin. **Exp. Toxicol. Pathol.**, v. 62, p. 171-181. 2010.

REY, L. **Parasitologia**: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais. 4ª ed. (reimpr.). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2011. p. 489-492, 793-805.

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese ambiental**, Canoas: Editora ULBRA, 2003. p. 49-75.

RITTSCHOF, D.; MCCLELLAN-GREEN, P. Molluscs as multidisciplinary models in environment toxicology. **Mar. Pollut. Bull.**, v. 50, p. 369-373. 2005

RITOSSA, F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 18, p. 571-573. 1962.

RITOSSA, F. M. Experimental activation of specific loci in polytene chromosomes of *Drosophila*. **Exp. Cell Res.**, v. 35, p. 601-607. 1964.

RUELAS, D. S.; KARENTZ, D.; SULLIVAN, J. T. Lethal and sub-lethal effects of UVB on juvenile *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Pulmonata). **J. Invertebr. Pathol.**,v. 93, p. 192-200. 2006.

RUPPERT, E. E.; FOX, R. S.; BARNES, R, D. **Zoologia dos invertebrados**. 7ª ed. São Paulo: Roca. 2005. p. 323-481.

SAFA, H. Heat recovery from nuclear Power plants. **Int. J. Elec. Power**, v. 42, p. 553-559. 2012.

SALÁNKI J.; FARKAS, A.; KAMARDINA, T.; RÓZSA, K. S. Molluscs in biological monitoring of water quality. **Toxicol. Lett.**, v. 140-141, p. 403-410. 2003.

SAMALI, A.; HOLMBERG, C. I.; SISTONEN, L.; ORRENIUS, S. Thermotolerance and cell death are distinct cellular responses to stress: dependence on heat shock proteins. **FEBS Lett.**, v. 461, p. 306-310. 1999.

SANDERS, B. Stress proteins in aquatic organisms: an environmental perspective. **Crit. Rev. Toxicol.**, v. 23, p. 49-75. 1993.

SANDERS, B. M. & MARTIN, L. S. Stress proteins as biomarkers of contaminant exposure in archived environmental samples. **Sci. Total Environ.**, v. 139/140, p. 459-470. 1993.

SANTOS, M. M.; TEN HALLERS-TJABBES, C. C.; VIEIRA, N.; BOON, J. P.; PORTE C. Cytochrome P450 differences in normal and imposex-affected female whelk *Buccinum undatum* from the open North Sea. **Mar. Environ. Res.**, v. 54, p. 661-665. 2002.

SCHRECK, C. B. Stress and fish reproduction: The roles of allostasis and hormesis. **Gen. Comp. Endocrinol.**, v. 165, p. 549-556. 2010.

SCOFIELD, E.; BOWYER, R. T.; DUFFY, L. K. Baseline levels of HSP70, a stress protein and biomarker, in a halibut from the Cook Inlet region of Alaska. **Sci. Total Environ.**, v. 226, p. 85-88. 1999.

SCONZO, G.; ROCCHERI, M. C.; LA ROSA M.; OLIVA D.; ABRIGNANI A.; GIUDICE G. Acquisition of thermotolerance in sea urchin embryos correlates with the synthesis and age of the heat shock proteins. **Cell differ.**, v. 19, p. 173-177. 1986.

SHASHIKUMAR, S. & RAJINI, P. S. Cypermethrin elicited responses in heat shock protein and feeding in *Caenorhabditis elegans*. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 73, p. 1057-1062. 2010.

SHAW, J. P.; LAWRENCE, D. P.; CHIPMAN, J. K. CYP1A- and CYP3A-immunopositive protein levels in digestive gland of the mussel *Mytilus galloprovincialis* from the Mediterranean Sea. **Mar. Environ. Res.**, v. 58, p. 649-653. 2004.

SMITH, H. A.; BURNS, A. R.; SHEARER, T. L.; SNELL, T. W. Three heat shock proteins are essential for the rotifer thermotolerance. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, v. 413, p. 1-6. 2012.

SOMERO, G. N. Proteins and temperature. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 57, p. 43-68. 1995.

SOMERO, G. N. Protein adaptations to temperature and pressure: complementary roles of adaptive changes in amino acid sequence and internal milieu. **Comp. Biochem. Physiol., B Biochem. Mol. Biol.**, v. 136, p. 577-591. 2003.

SOUZA, C. P.; CALDEIRA, R. L.; DRUMMOND, S. C.; MELO, A. L.; GUIMARÃES, C. T.; SOARES, D. M.; CARVALHO, O. S. Geographical distribution of *Biomphalaria* snails in the state of Minas Gerais, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 293-302. 2001.

STATE OF NEW YORK, **Petition submitted to the U.S. Nuclear Regulatory Commission, November 30, 2007 on the Application f Energy Nuclear operations, INC., for the 20-year relicensing of Indian Point Nuclear Power Plants 1 & 2, Buchanan, New York.** Washington: U.S. Nuclear Regulatory Comission. 2007. Disponível em: <http://www.dec.ny.gov/docs/permits_ej_operations_pdf/deccontensum.pdf>. Acesso em: 30 Ago. 2010.

TALLARICO, L. F.; OKAZAKI, K.; KAWANO, T.; PEREIRA, C. A. B.; NAKANO, E. Dominant lethal effect of ^{60}Co gamma irradiation in *Biomphalaria glabrata* (SAY, 1818). **Mutat. Res.**, v. 561, p. 139-145. 2004.

TARTAGLIA, G. G.; PECHMANN, S.; DOBSON, C. M.; VENDRUSCOLO, M. Life on the edge: a link between gene expression levels and aggregation rates of human proteins. **Trends in Biochem. Sci.**, v. 32, p. 204-206. 2007.

TEDENGREN, M.; OLSSON, B.; REIMER, O.; BROWN, D. C.; BRADLEY, B. P. Heat pretreatment increases cadmium resistance and HSP70 levels in Baltic sea mussels. **Aquat. Toxicol.**, v. 48, p. 1-12. 2000.

TISSIÉRES, A.; MITCHELL, H. K. TRACY, U. M. Proteins synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: Relation to chromosome puffs. **J. Mol. Biol.**, v. 84, p. 389-392. 1974.

TODESCHINI, A. R.; SANTOS, J. N.; HANDA, K.; HAKOMORI, S. I. Ganglioside GM2-Tetraspanin CD82 Complex Inhibits Met and Its Cross-talk with Integrins, Providing a Basis for Control of Cell Motility through Glycosynapse. **J. Biol. Chem.**, v. 282, p. 8123–8133. 2007.

TOMANEK, L. & SANFORD, E. Heat shock protein 70 (Hsp 70) as a biochemical stress indicator: an experimental field test in two congeneric intertidal gastropods (Genus: *Tegula*). **Biol. Bull.**, v. 205, p. 276-284. 2003.

UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA. Instituto de Geociências e Ciências Exatas. Departamento de Petrologia e Metalogenia. Museu de Minerais e Rochas Heinz Ebert. [internet]. Disponível em: <http://www.rc.unesp.br/museudpm/banco/grm.html>. Acesso em 29 Jul 2012.

VASQUEZ, R. E. & SULLIVAN, J. T. Hematopoietic tissue allografts in *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Pulmonata) induce humoral immunity to *Schistosoma mansoni*. **Dev. Comp. Immunol.**, v.25, p. 561-564. 2001.

VERRENGIA GUERRERO, N. R.; MOZZARELLI, M. N.; GIANCARLO, H.; NAHABEDIAN, D.; WIDER, E. *Biomphalaria glabrata*: Relevance of albino organisms as useful tool for environmental lead monitoring. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 59, p. 822-827. 1997.

WEBB, D.; GAGNON, M. M. The value of stress protein 70 as an environmental biomarker of fish health under field conditions. **Environ. Toxicol.**, v. 24, p. 287-295. 2009.

WEBBE, G. Molluscicides in control of Schistosomiasis. In: MOTT, K. E. **Plant molluscicides**. New York: Wiley. 1987. p. 1-5.

WIRTH D.; CHRISTIANS, E.; MUNAUT, C.; DESSY, C.; FOIDART, J. M.; GUSTIN, P. Differential heat shock gene *hsp70-1* response to toxicants revealed by in vivo study of lungs in transgenic mice. **Cell Stress Chaperones**, v. 7, p. 387-395. 2002.

WOOD, D. W. **Princípios de fisiologia anima**l. São Paulo: Editora Polígono, Editora da Universidade de São Paulo. 1973. p. 130-144.

XUAN, R.; WANG, L.; SUN, M.; REN, G.; JIANG, M. Effects of cadmium on carbohydrate and protein metabolism in the freshwater crab *Sinopotamon yangtsekiense*. **Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pahrmacol.**, v. 154, p. 268-274. 2011.

YOUNG, J. C.; AGASHE, V. R.; SIEGERS, K.; HARTL, F. U. Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol. **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.**, v. 5, p.781-791. 2004.

ZAHOR, Z. DAVIES, A. J.; KIRK, R. S.; ROLLINSON, D.; WALKER, A. J. Larval excretory-secretory products from the parasite *Schistosoma mansoni* modulates HSP70 protein expression in defence cell of its snail host, *Biomphalaria glabrata*. **Cell Stress Chaperones**, v. 15, p. 639-650. 2010.

ZHOU, J.; CAI, Z. H.; LI, L.; GAO, Y. F.; HUTCHINSON, T. H. A proteomics based approach to assessing the toxicity of bisphenol A and diallyl phthalate to the abalone (*Haliotis diversicolor* supertexta). **Chemosphere**, v. 79, p. 595-604. 2010.