UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia e Toxicologia

O anfípode marinho *Parhyale hawaiensis* como um modelo em ecotoxicologia

Mariana Coletty Artal

Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Orientadora: Profa. Dra. Gisela de Aragão Umbuzeiro

Coorientador: Prof. Dr. Theodore Burdick Henry

São Paulo

2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia e Toxicologia

O anfípode marinho *Parhyale hawaiensis* como um modelo em ecotoxicologia

Mariana Coletty Artal

Versão Original

Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Orientadora: Profa. Dra. Gisela de Aragão Umbuzeiro

Coorientador: Prof. Dr. Theodore Burdick Henry

São Paulo

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica

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

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

Artal, Mariana Coletty
A784o O anfípode marinho *Parhyale hawaiiensis* como um
modelo em ecotoxicologia / Mariana Coletty Artal. -- São
Paulo, 2018.
80p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.
Orientador: Umbuzeiro, Gisela de Aragão
Co-orientador: Henry, Theodore Burdick

1. Toxicologia ambiental. 2. Ecotoxicologia I. T. II.
Umbuzeiro, Gisela de Aragão, orientador. III. Henry, Theodore
Burdick, co-orientador.

615.9 CDD

Mariana Coletty Artal

O anfípode marinho *Parhyale hawaiiensis* como um modelo em ecotoxicologia

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Profa. Dra. Gisela de Aragão Umbuzeiro
orientadora/presidente

1º examinador

2º examinador

3º examinador

4º examinador

São Paulo, ____ de _____ de 2018.

*Dedico a minha mãe Silvia,
meu maior exemplo, mãe guerreira;
e mulher batalhadora.*

Agradecimentos

Aos meus pais, Silvia e Paulo, por me trazerem ao mundo e cuidarem com todo amor e carinho para que eu pudesse chegar até aqui. Por me darem os valores que eu tenho, pelo amor incondicional, pelo apoio, por proporcionarem as melhores oportunidades de estudo, e por me ensinarem a valorizar os estudos e a educação acima de tudo.

À minha irmã, Ana Carolina, por tantos anos de amor, carinho, atenção e dedicação à irmã mais nova. Por ser minha grande incentivadora, cúmplice e por torcer e gritar em todas as conquistas.

Ao Fernando, meu amor e parceiro de vida. Com seu amor, valores e paciência me inspira e motiva a querer ser sempre uma pessoa melhor. Obrigada por estar ao meu lado tanto nas conquistas, me incentivando e apoiando, e nos momentos de angústia e dificuldade. Obrigada também pela ajuda técnica e pela paciência em me auxiliar com gráficos, figuras e configurações. Também agradeço à sua família, por todo o carinho, apoio e incentivo que sempre me deram.

À Gisela, minha orientadora, também meu exemplo de mulher, mãe e pesquisadora. Agradeço pelas oportunidades que me deu, pela orientação e parceria, pelas broncas e pelas palavras de carinho. E, principalmente, pelos ensinamentos que foram além do ambiente acadêmico.

Ao Ted, meu orientador, por aceitar o desafio de me orientar, pelos ensinamentos e conversas, pela calma e paciência nas reuniões presenciais e por Skype. E agradeço por ter me recebido em seu laboratório.

Ao Laboratório de Ecotoxicologia e Genotoxicidade Ambiental (LAEG), por ter me proporcionado tantos anos de aprendizado, pela estrutura e aprendizado. Aos técnicos Anjaína, Josiane, Ádria, Gilberto e Geraldo pela disposição e ajuda nos momentos de necessidade.

Aos alunos de graduação e pós-graduação que participam ou que já participaram do LAEG, por manterem o laboratório sempre vivo, pelas horas de dedicação e trabalho. Aos alunos Francine, Bianca, Daniel, Aline, Monizze, Amanda, Tsai e Carina, meu muito obrigada. Um agradecimento especial a equipe do marinho, Amanda, Monizze e Leticia, que com dedicação e carinho cuidaram tão bem dos organismos usados nessa pesquisa.

À amiga Francine, pela parceria desde o primeiro dia da graduação, que tornou essa caminhada mais alegre e dividiu comigo as angústias, dúvidas e, principalmente as alegrias, tanto da vida acadêmica quanto da vida pessoal.

À amiga Anjaína, sempre presente, que me ajudou tanto nos aspectos acadêmicos e pessoais durante a minha caminhada. Agradeço pela generosidade, pelo carinho, por sempre se preocupar e torcer por mim durante esses anos.

Ao Laboratório de Biotecnologia (BIOTEC) da Faculdade de Ciências Aplicadas da UNICAMP, pela estrutura, pela oportunidade de aprender e trabalhar. Ao prof. Augusto pela generosidade de abrir as portas do seu laboratório, por me permitir fazer parte do seu grupo e pelos ensinamentos. Aos alunos do BIOTEC, Karina, Leticia M., Leticia T. e André, por me receberem com tanto carinho, me incluírem no grupo, pela amizade, pela ajuda nas análises, por responderem minhas dúvidas pacientemente, pelas conversas e momentos de descontração. Um agradecimento especial à Karina, pela generosidade, pelo carinho e por me ensinar e ajudar tanto nas análises.

Ao Laboratório EPAQUATIC, coordenado pelo prof. Ted, e as alunas Ana, Danae e Johanne, por terem me recebido tão bem, pelos ensinamentos, pelas conversas e momentos de descontração.

Ao professor Henrique do Instituto de Biologia da UNICAMP, pelo entusiasmo, pela ajuda nesse trabalho, por propor e ajudar em novas análises. Ao Vagner por ajudar nas análises de bioinformática.

Aos pesquisadores pioneiros, Cassandra e Patel, que trabalham e desenvolvem estudos tão brilhantes com a *Pahyale hawaiiensis* por nos inspirarem e nos receberem em seus laboratórios.

Às professoras Maurea e Valéria pela ajuda na coleta e obtenção dos organismos. Às professoras Fosca e Silvana pela ajuda na identificação dos organismos. À Melanie pela ajuda nas etapas iniciais de expressão gênica.

À Universidade de São Paulo, professores e funcionários, pela estrutura, pelas aulas, pela formação de tantos alunos e pesquisadores.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, professores e funcionários. Um agradecimento especial as professoras Silvia B. e Sylvia S., e seus alunos por me receberem nos estágios iniciais das análises de expressão gênica. Às funcionárias Samantha e Marilisa, pela paciência e ajuda em todos os processos.

À Universidade Estadual de Campinas, campus da Faculdade de Tecnologia, professores e funcionários pela estrutura para a realização do nosso trabalho e pela dedicação.

Aos amigos de Limeira e de Ribeirão Preto, aos meus familiares, muito obrigada pelo carinho, amizade, momentos de descontração que ajudaram tanto ao longo do trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de doutorado (processo 2014/08829-7), pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa e pela oportunidade de realizar meus estudos. Ao parecerista anônimo da FAPESP e todos aqueles que trabalham para fazer a engrenagem funcionar.

Aos contribuintes do Estado de São Paulo, que trabalham e pagam com seu suor os impostos que, em parte, são destinados aos nossos estudos e formação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa inicial e por financiar o estudo de muitos alunos, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento do projeto (processo 400362/2014-7), ao Instituto Nacional de C, T&I em Materiais Complexos Funcionais (INOMAT) pelo auxílio financeiro ao laboratório.

Muito obrigada!

“O correr da vida embrulha tudo, a vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem.”

(ROSA, 1994, p. 448)

RESUMO

ARTAL, M. C. **O anfípode marinho *Parhyale hawaiiensis* como um modelo em ecotoxicologia.** 2018. 82 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Ecossistemas marinhos e estuarinos são o destino final de muitos contaminantes, e a ecotoxicologia ainda enfrenta a falta de organismos modelo para esses ambientes. Para desenvolver e apresentar um organismo teste adequado para ser utilizado em estudos de laboratório e campo, métodos para o cultivo, endpoints e biomarcadores devem ser avaliados. O anfípode marinho *Parhyale hawaiiensis* é um modelo para estudos de biologia evolutiva e embrionária, é mundialmente distribuído e fácil de manipular em laboratório e consequentemente um modelo interessante para estudos ecotoxicológicos. O objetivo desse trabalho é padronizar condições de cultivo, teste de toxicidade, e desenvolver biomarcadores no anfípode *P. hawaiiensis* e aplicá-los para avaliar os efeitos de nanopartículas metálicas na exposição via alimentação. As condições de cultivo foram estabelecidas em água salina reconstituída (salinidade 30 ± 2), temperatura de 24 ± 2 °C, fotoperíodo de 12-12h luz/escuro, coral triturado como substrato, alimentação diária com ração de peixe, troca de água parcial e aeração constante. As condições de teste compreendem a utilização de microplaca de 96-poços, organismos <7 dias, um organismo por poço com 200 µL de solução por 96 h. Zinco, cobre, prata, cádmio e amônia foram selecionados como substância teste e a sensibilidade de *P. hawaiiensis* foi similar e dentro da faixa de outros anfípodes marinhos. As condições para expressão gênica em *P. hawaiiensis* foram desenvolvidas para o gene de referência 18S, dois genes de metalotioneínas (MT) e dois genes de glutathione S-transferase (GST). Entretanto, os genes selecionados não foram diferencialmente expressos nas condições testadas. Sendo assim, a análise da expressão gênica global, RNA-seq, foi realizada com organismos adultos alimentados por 7 dias com alimento contaminado com nanopartículas de prata (Ag-NPs), AgCl e controle. A análise da expressão gênica global (RNA-seq) foi conduzida com sucesso e destacou diferenças na resposta entre machos e fêmeas, bem como nos tratamentos com AgCl e Ag-NP. A análise comparativa revelou genes comuns entre as duas formas de Ag estudadas, e mostrou respostas diferentes no tratamento com Ag-NP, portanto, efeitos adversos diferentes são esperados após a exposição à alimentação, e os genes diferencialmente expressos podem ser usados como potenciais biomarcadores. Os resultados demonstraram que *P. hawaiiensis* é um bom modelo para testes de toxicidade com um protocolo miniaturizado e o RNA-seq foi aplicado com sucesso para investigar as diferenças entre a exposição via alimentação com AgCl e Ag-NP e pode revelar potenciais biomarcadores. Além disso, este estudo desenvolveu protocolos e fornece informações moleculares que podem ser usadas em estudos futuros com *P. hawaiiensis*.

Palavras-chave: Expressão gênica. Nanopartículas de prata. RNA-seq. Teste de toxicidade. Toxicidade de metais. Transcriptoma.

ABSTRACT

ARTAL, M. C. **The marine amphipod *Parhyale hawaiiensis* as a model in ecotoxicology.** 2018. 82 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Marine and estuarine ecosystems are the final destinations of many contaminants and ecotoxicology still faces the lack of model organisms for these environments. To develop and present a suitable test organism to be used in laboratory and field studies, methods for husbandry, ecotoxicity endpoints and biomarkers should be evaluated. The marine amphipod *Parhyale hawaiiensis* is already a model for development and evolutionary studies, it is worldwide spread and easy to handle in the laboratory and so on an interesting model for ecotoxicology. The aim of this work is to standardize husbandry conditions, toxicity testing, and to develop molecular biomarkers in *P. hawaiiensis* and apply them to evaluate the effect of metal nanoparticles in dietary exposure. The conditions for culturing were established in reconstituted seawater (30 ± 2 salinity), 24 ± 2 °C temperature, photoperiod 12-12 h light/dark, crushed coral as substrate, daily feeding with fish food, partial water exchange and constant aeration. Testing conditions comprised 96-well microplate, <7 days age organisms, one organism in each well containing 200 µL of exposure media for 96 h. Zinc, copper, silver, cadmium and ammonia were selected as toxicants and sensitivity of *P. hawaiiensis* were within the range of other marine amphipods. Gene expression conditions for *P. hawaiiensis* were develop for the reference gene 18S, two metallothioneins (MT) and two glutathione-S-transferase (GST). However, selected target genes, analyzed by RT-qPCR, were not successful to detect differences in our treatment conditions. Thus, global gene expression analysis, RNA-seq, was conducted with adult organisms fed for 7 days to a contaminated food with silver nanoparticles (Ag-NPs), AgCl and control. Results highlighted differences between males and female's toxicity responses as well as AgCl and Ag-NP treatments. Comparison analysis revealed common genes expressed in both Ag forms, but also showed differences in Ag-NP treatment with both up and down regulated genes. Analysis are underway to better understand toxicity responses pathways. These results anticipate different responses to both Ag forms investigated, therefore different adverse effects are expected after feeding exposure to AgCl and Ag-NP and significative genes can be used as potential biomarkers. Our results demonstrated that *P. hawaiiensis* is a good model for ecotoxicity tests with a miniaturized protocol and RNA-seq were successful applied to investigate the differences between AgCl and Ag-NP feeding exposure and could reveal promising biomarkers. Moreover, this study developed protocols and provide molecular information that can be used in future studies with *P. hawaiiensis*.

Keywords: Gene expression. Metal toxicity. RNA-seq. Silver nanoparticles. Toxicity test. Transcriptome.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Macho e fêmea adultos de <i>Parhyale hawaiiensis</i> cultivados no Laboratório de Ecotoxicologia e Genotoxicidade Ambiental (LAEG).....	18
--	----

Capítulo I

Figure 1- Mortality of <i>P. hawaiiensis</i> of age <24 h-old (solid circles) and <7 days-old (crosses) exposed to different Zn concentrations after 96-h exposure. Each point represents the mean (with standard error) and the line represents the logistic regression model for both ages.....	36
---	----

Figure 2 - Mortality of <i>P. hawaiiensis</i> relative to metals concentration for organisms exposed (96 h) in 80-mL vial (solid line) and 96-well microplates (dashed line). Each point represents the mean (with standard error) for independent replicates Ag (a n = 3 independent test for each condition), Cd (b n = 3 independent test for each condition), Cu (c n = 3 independent test for each condition) and Zn (d n = 10 for microplates and 12 for vials). A hashtag (#) indicates points removed from the calculation because of metal salt precipitation within the test media.....	38
---	----

Figure 3 - Comparison of <i>P. hawaiiensis</i> LC50 (96 h) for the 80-mL vials (solid circle) and 96-well microplates (open circle) protocols and the literature for Cd, Cu, Zn and ammonia (solid lines represents maximum and minimum values reported in the literature for marine amphipods, please see supplementary material for details).....	39
---	----

Capítulo II

Figure 1 - PCR products from 18S, GST1 and GST2 genes used for DNA cloning and sequencing.....	57
--	----

Figure 2 - Relative fold change of GST1 and GST2 genes in adults of <i>P. hawaiiensis</i> fed with control, AgCl and Ag-NP contaminated foods for 4, 7 and 14 days.....	59
---	----

Figure 3 - Relative fold change of GST1 and GST2 genes in adults of <i>P. hawaiiensis</i> exposed to 0.1 and 1 µg L ⁻¹ of benzo(a)pyrene (BaP) for 8, 24 and 48 hours.....	59
---	----

Figure 4 - Numbers of genes in each gender and treatment that differed significantly from the control. Numbers that fall into both circle were common to both gender. Upward green arrows represent up-regulated genes and downward red arrows the down-regulated genes.....	61
--	----

Figure 5 - Numbers of genes in each treatment that differed significantly from the control. Numbers that fall into both circle were common to both treatment. Upward green arrows represent up-regulated genes and downward red arrows the down-regulated genes.....	62
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Iniciadores específicos de genes de <i>Parhyale hawaiiensis</i> para RNA ribossomal (18S), metalotioneínas (MT) e glutatona S-transferase (GST).....	22
---	----

Capítulo I

Table 1 - Comparison of the toxicity of metals and ammonia with different marine amphipods.....	41
---	----

Capítulo II

Table 1 - <i>Parhyale hawaiiensis</i> gene specific primer sequences used for quantitative real time PCR.....	52
---	----

Table 2 - Comparison among reference (subject) and sequenced genes (query) from the 18S, GST1 and GST2 genes from <i>P. hawaiiensis</i> (underlined – forward and reverse primer; red and underlined – differences between sequences).....	58
--	----

Table 3 - Predicted function of differentially expressed genes after feeding exposure to AgCl and Ag-NP. Numbers highlighted in red or green represent sequences that were significantly up-regulated (green) or down-regulated (red) by the treatment.....	63
---	----

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS.....	17
3	METODOLOGIA	18
3.1	Desenvolvimento do teste agudo	18
3.1.1	Obtenção e manutenção das culturas de <i>P. hawaiiensis</i>	18
3.1.2	Teste de toxicidade aguda	19
3.1.3	Análises estatísticas.....	19
3.2	Desenvolvimento de biomarcadores	20
3.2.1	Alimentos contaminados com Ag-NP e AgCl	20
3.2.2	Genes de interesse em <i>P. hawaiiensis</i> e desenho dos iniciadores	21
3.2.3	Extração de RNA, Síntese de cDNA e RT-qPCR.....	22
3.2.4	Clonagem e sequenciamento utilizando os produtos de PCR.....	23
3.2.5	Design Experimental - RT-qPCR.....	25
3.2.6	Design experimental - RNA-seq	26
4	RESULTADOS	28
4.1	Capítulo I	29
4.2	Capítulo II	47
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	70
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

1 INTRODUÇÃO

Ecossistemas marinhos são importantes devido ao alto valor econômico, relacionado as atividades industriais e de pesca, e por concentrar grande parte da biodiversidade do planeta. Tendo em vista que esses ecossistemas são muitas vezes prejudicados em detrimento das atividades humanas, esforços mundiais estão sendo conduzidos nas últimas décadas para garantir a conservação desses ecossistemas. A União Européia, por meio da Marine Strategy Framework Directive, visa proteger os ambientes marinhos em toda a Europa, e seu objetivo é garantir oceanos e mares ecologicamente diversos, limpos e saudáveis até 2020 (EU Water Framework Directive, 2000/60/EC) (MSFD, 2008). O Brasil por sua vez, integra a Convenção da Diversidade Biológica (CDB) através do Plano Estratégico de Biodiversidade 2011–2020, que inclui as Metas de Aichi, que preconiza metas para a redução da perda da biodiversidade em âmbito mundial (CBD, 2010).

Para garantir que esses ambientes estejam saudáveis e que não haja a perda da biodiversidade, são necessárias ferramentas robustas para a avaliação ambiental, combinando o monitoramento das concentrações de contaminantes químicos e medidas de efeito biológico (LYONS et al., 2010; CHAPMAN, 2015). Entre as medidas de efeito biológico, são necessárias medidas de alerta precoce que possam prever mudanças na função do ecossistema, essas medidas podem ser realizadas através da utilização de biomarcadores e bioindicadores (CHAPMAN, 2015). Biomarcadores são necessários para prover alerta precoce de um contaminante que pode afetar funções específicas de um organismo e consequentemente da sua função no ecossistema e, portanto, afetá-lo negativamente. Os bioindicadores são respostas do organismo inteiro usadas para medir potenciais efeitos de estressores em populações ou comunidades de organismos. Os bioindicadores incluem testes de toxicidade, geralmente conduzidos em laboratório e tipicamente medindo efeitos de sobrevivência, crescimento e reprodução (CHAPMAN, 2015).

Os metais são contaminantes conhecidos, bastante estudados e amplamente distribuídos em ecossistemas aquáticos. Entre os metais, a prata representa um dos elementos mais tóxicos para organismos aquáticos (RATTE, 1999) e, devido a sua atividade antimicrobiana tem sido amplamente empregada em nanopartículas (Ag-NPs). Os produtos contendo Ag-NP são os mais abundantes e introduzidos no mercado, e podem ser encontrados em produtos como tintas, tecidos, combustíveis, e produtos de uso pessoal (GERANIO; HEUBERGER; NOWACK, 2009; HOLTZ et al., 2012; NOWACK et al., 2012; REN et al., 2014), e, portanto, possuem, entre as NPs, maiores chances de atingirem o meio ambiente (FABREGA et al., 2011). Sendo assim, as principais fontes de NPs nos ambientes marinhos são através de produtos de cuidado

pessoal, do esgoto e principalmente da aplicação de tintas incrustantes em barcos e navios (MATRANGA; CORSI, 2012). Uma vez no ambiente, as características físico-química das NPs são importantes para prever seu comportamento, pois as condições da água do mar aumentam a taxa de sedimentação das NPs que podem se mover rapidamente da coluna de água para o sedimento (KELLER et al., 2010; FAIRBAIRN et al., 2011). Portanto, a avaliação dos efeitos das NPs em ecossistemas marinho é especialmente relevante em organismos que estão em contato com o sedimento.

Dada a necessidade da avaliação dos efeitos biológicos em ambientes marinhos, pouco são os organismos estabelecidos e representativos desse ecossistema no Brasil. Os critérios recomendados para a seleção de um organismo modelo para avaliação ambiental incluem uma ampla distribuição geográfica, curto ciclo de vida, deve ser abundante, alto potencial reprodutivo, relevante para os ecossistemas ou habitats de interesse e de fácil cultivo em laboratório (RAISUDDIN et al., 2007). Entre os organismos aquáticos, os anfípodes são frequentemente utilizados em testes de toxicidade devido à posição na cadeia alimentar, abundância no meio ambiente, sensibilidade a poluentes e facilidade de cultivo em laboratório (BORGMANN et al., 2005; ASTM, 2014; TRAPP et al., 2016)

Parhyale hawaiiensis é um anfípode marinho que se alimenta de material depositado e representa um importante consumidor de detritos no manguezal (POOVACHIRANON; BOTO; DUKE, 1986; FLYNN; WAKABARA; TARARAM, 1998). Sua distribuição ocorre mundialmente, e esses organismos encontram-se distribuídos entre os trópicos nas regiões entre marés e de águas rasas em grandes densidades populacionais (SHOEMAKER, 1956; BARNARD, 1965; POOVACHIRANON; BOTO; DUKE, 1986), toleram uma ampla faixa de salinidade (5-40%) e temperatura (20-30° C) (POOVACHIRANON; BOTO; DUKE, 1986; NAST; EXTAVOUR, 2014). *P. hawaiiensis* é um organismo pequeno (<2 cm), fácil de ser mantido em laboratório, apresenta alto potencial reprodutivo ao longo do ano todo e possui diferenças morfológicas fáceis de serem distinguidas entre machos e fêmeas (NAST; EXTAVOUR, 2014). Adicionalmente, *P. hawaiiensis* é um modelo para o estudo do desenvolvimento embrionário e evolutivo de crustáceos, tendo seu genoma publicado recentemente (KAO et al., 2016) e várias técnicas moleculares, como transgênese e knockdown de genes, foram aplicadas nesse organismo (MARTIN et al., 2016).

Dada a representatividade e relevância ecológica de *P. hawaiiensis*, poucos estudos foram realizados utilizando esse organismo como ferramenta na avaliação da toxicidade. Lee; Nicol, (1978) avaliaram o comportamento e a mortalidade de organismos adultos expostos ao naftaleno, e observaram efeitos adversos em ambos os *endpoints* investigados. Em outro estudo,

organismos adultos também foram empregados com sucesso para avaliar e determinar a concentração letal (50%) (CL50) de toxinas de corais (LEE; MACKO; CIERESZKO, 1981). Além da utilização dos adultos, embriões e juvenis de *P. hawaiiensis* também já foram empregados na avaliação da toxicidade da fração solúvel em água de óleo combustível (LEE; NICOL, 1980). Entretanto, não foram encontrados na literatura procedimentos padronizados para a utilização de *P. hawaiiensis* em testes de toxicidade, assim como não foram encontrados biomarcadores e análises de expressão gênica com contaminantes ambientais. Portanto, para explorar e ampliar a utilização de *Parhyale hawaiiensis* como um organismo modelo para estudos ecotoxicológicos, esse trabalho tem como objetivo desenvolver e padronizar protocolos para testes de toxicidade aguda e explorar biomarcadores no anfípode *P. hawaiiensis*, provendo ferramentas importantes para estudos de monitoramento e avaliação ambiental. Para as avaliações realizadas nesse trabalho, serão utilizadas substâncias de referência na determinação da toxicidade aguda (Ag, Cd, Cu, Zn e amônia), e, nanopartículas metálicas (Ag-NP) para explorar biomarcadores por meio de análises de expressão gênica.

2 OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho é utilizar o anfípode marinho *Parhyale hawaiiensis* como um modelo para a avaliação da toxicidade.

Os objetivos específicos são:

- Desenvolver um protocolo para cultura em laboratório e teste de toxicidade aguda miniaturizado.
- Explorar o uso de biomarcadores moleculares em organismos expostos via alimentação a sal e nanopartículas de prata.

3 METODOLOGIA

3.1 DESENVOLVIMENTO DO TESTE AGUDO

3.1.1 OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DAS CULTURAS DE *P. HAWAIENSIS*

Os anfípodes foram coletados em 2010 na praia do Poço do Anchieta, localizada no município de Itanhaém (24 ° 12'6.42 "S, 46 ° 48'38.47" W), Estado de São Paulo, Brasil. Os organismos foram identificados como *P. hawaiiensis* pelo grupo da Profa. Dra. Fosca Pedini Pereira Leite da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), e, desde então, são cultivados no Laboratório de Ecotoxicologia e Genotoxicidade (LAEG), localizado na Faculdade de Tecnologia da Universidade Estadual de Campinas, no município de Limeira (Figura 1).

Figura 1 - Macho e fêmea adultos de *Parhyale hawaiiensis* cultivados no Laboratório de Ecotoxicologia e Genotoxicidade Ambiental (LAEG)

Fonte: Figura elaborada pela autora (2018)

Os organismos foram cultivados com uma densidade de 125 neonatos por litro (consistente com as recomendações da US EPA (US EPA 2001)) em recipientes de plástico de 5 L (33 cm x 21,8 cm) contendo coral triturado substrato com 1 cm de profundidade [(Granulometria # 8) Extavour (2004)] e 2 L de água salina reconstituída (salinidade 30 ± 2 , Red Sea Salt®). As culturas foram mantidas em incubadoras com temperatura (24 ± 2 ° C) e fotoperíodo (12-12 h luz/escuro) controlados, e as condições da água foram verificadas a cada novo lote com os seguintes parâmetros, 6 ± 2 mg de oxigênio dissolvido L⁻¹, pH 8 ± 1 e salinidade 30 ± 2 . Os organismos foram alimentados diariamente com ração para peixe de fundo

(por exemplo, JBL® Novo Fect), com aproximadamente 0,15 g para adultos e 0,08 g para recém-nascidos em cada recipiente, trocas parciais de água (50% volume) foram conduzidas duas vezes por semana, e trocas totais de água e limpeza dos recipientes ocorreram mensalmente.

3.1.2 TESTE DE TOXICIDADE AGUDA

Para obter neonatos com idade conhecida, adultos foram separados e colocados em um recipiente de plástico de 2,5 L com 1 L de água reconstituída contendo rochas naturais (10-15 cm) para facilitar a coleta dos neonatos. Duas condições foram padronizadas para a exposição de neonatos em testes agudos. Inicialmente, os neonatos foram expostos por 96 h, sem alimento, em condições estáticas utilizando 25 mL de solução em frascos plásticos de 80 mL (um neonato por frasco, 10 repetições para cada concentração de teste). E, posteriormente, foi estabelecido um protocolo para viabilizar a redução de volume para 200 µL de solução por poço em microplacas de 96 poços (um neonato por poço, com 32 repetições para cada concentração). Os resultados entre os dois protocolos foram comparados. A temperatura, a salinidade, o fotoperíodo e a qualidade da água foram as mesmas das culturas (descritos no item 3.1.1). Os testes foram considerados válidos quando a mortalidade no controle não excedeu 10%, e a mortalidade dos organismos em microplaca foi registrada com microscópio estereoscópico.

3.1.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Dados de mortalidade de testes independentes (dados binários) foram combinados e modelados por regressão logística para o cálculo da CL50 de acordo com o modelo logístico $\text{logit}(P) = \mu + b(\text{concentração}) + c(\text{procedimento do teste}) + d[(\text{concentração}) \times (\text{procedimento do teste})]$, onde $\text{logit}(P)$ é a probabilidade de um organismo morrer, μ é o valor de interceptação, b concentração, c efeito do procedimento do teste e d efeito da interação entre os termos. O modelo foi estimado utilizando uma estimativa iterativa da função de verossimilhança, e apenas os termos que contribuíram significativamente ($p \leq 0,05$) foram incluídos no modelo selecionado (IHAKA; GENTLEMAN, 1996; R CORE TEAM, 2015). A estimativa de $\text{logit}(P)$ foi utilizada para obter a probabilidade de mortalidade $(P) = e^{\text{logit}(P)} / (1 + e^{\text{logit}(P)})$. As diferenças entre os níveis de variável independente "procedimento de teste" (ou seja, microplaca de 96 poços em comparação com o frasco de 80 mL) foram testadas por meio de declarações contrastantes após seleção do modelo logístico e consideradas significativamente diferentes em $p \leq 0,05$. (Teste de Shapiro-Wilks, $p > 0,05$) com variância

homogênea (teste de Bartlett $p > 0,05$), e as diferenças entre os níveis da variável independente foram determinadas pelo teste post hoc de Tukey. Os gráficos foram realizados usando a planilha do software Excel (Microsoft).

3.2 DESENVOLVIMENTO DE BIOMARCADORES

3.2.1 ALIMENTOS CONTAMINADOS COM AG-NP E AGCL

Nesse estudo serão investigados os efeitos da exposição de AgCl e AgNP via alimentação, simulando uma via mais representativa da exposição de NPs em ambientes aquáticos, onde NPs estarão sedimentadas e em contato com organismos bentônicos. O alimento contaminado utilizado nesse estudo é o mesmo utilizado por Merrifield et al. (2013), e os principais dados de produção e caracterização para este lote de alimento foram descritos pelos autores. Os alimentos contaminados foram produzidos a partir de uma dieta basal formulada para prover aproximadamente 40% de proteína e 6% de gordura (ex. ração de peixe, óleo de peixe, soja e gelatina, mais detalhes em Merrifield et al. (2013)) e, essa dieta foi usada como controle e como base para os alimentos contaminados. As dietas contendo nanopartículas (NPs) foram preparadas adicionando a forma em pó e não modificada de NP, sem camada estabilizadora ou superfície funcionalizada, aos ingredientes da dieta basal para garantir a distribuição uniforme das NPs nas pastilhas de alimento na concentração de 500 mg kg^{-1} . Essa concentração foi baseada em estudos anteriores com a exposição de peixes (RAMSDEN et al., 2009; FRASER et al., 2011). As Ag-NPs (nano prata $<100 \text{ nm}$, Sigma Aldrich) são idênticas e do mesmo lote reportado em Bradford et al. (2009), com partículas de diâmetro médio de $58,6 \pm 18,6 \text{ nm}$ (média $\pm$ desvio padrão, $n = 64$). Para diferenciar o efeito de nanopartículas da forma elementar de Ag (AgCl, Sigma Aldrich) 500 mg kg^{-1} de Ag foram adicionados aos ingredientes da dieta basal. Para o preparo da pastilha, os ingredientes da dieta foram misturados com água quente até obter uma consistência suave e ligeiramente úmida, que foi posteriormente comprimido para produzir pastilhas de 2 mm de diâmetro que foram secas a 40°C por 24 h . As pastilhas foram peneiradas e moídas para produzir uma ração de tamanho consistente ($\sim 1 \text{ mm}$) adequado para alimentar os organismos (MERRIFIELD et al., 2013). As concentrações de metais nas pastilhas foram avaliadas por espectrometria de emissão atômica por plasma acoplado (ICP-OES) e as análises por ICP-OES indicaram que as concentrações de metal estavam de acordo com a concentração nominal do alimento preparado (MERRIFIELD et al., 2013). Adicionalmente, as pastilhas foram avaliadas usando Field Emission SEM (FESEM) que confirmou a distribuição

uniforme de NPs em grânulos e indicou que NPs estavam presentes de tamanhos de escala nano (<100 nm) a aglomerados maiores (500-1000 nm) (MERRIFIELD et al., 2013).

3.2.2 GENES DE INTERESSE EM *P. HAWAIIENSIS* E DESENHO DOS INICIADORES

Os genes de interesse selecionados nesse estudo são genes-alvo para toxicologia, e estão associados a processos de detoxificação de contaminantes, são eles as metalotioneínas (MT) e a glutathione S-transferase (GST). As sequências dos genes de interesse foram obtidas durante uma visita da aluna ao laboratório do prof. Nipam Patel (UC Berkeley, EUA) e, foram gentilmente cedidas pelo grupo. As sequências foram blastadas no banco de dados do NCBI e foram encontradas identidades com os mesmos genes em outras espécies, mostrando assim evidências que se tratavam dos genes de interesse. Como gene de referência foi escolhido o RNA ribossomal 18S, cuja sequência estava disponível no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (número de acesso AY826957.1). Os iniciadores para as sequências foram desenhados utilizando os programas NCBI Online Primer-Designing Tool e Primer Express 3.0 (Applied Biosystems), seguindo as recomendações e protocolos para desenho dos iniciadores. Os iniciadores foram obtidos da Sigma-Aldrich e Exxtend Biotecnologia e estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 - Iniciadores específicos de genes de *Parhyale hawaiiensis* para RNA ribossomal (18S), metalotioneínas (MT) e glutathione S-transferase (GST)

Nome da sequência	Número de bases	Sequência 5'-3'
18SF	20	CGTGAGCACCTATCTAACG
18SR	20	TTCAGCTTTGCAACCAGACT
MT1F	18	CGGAGGGTGCAAGATGTA
MT1R	18	CGCCCATGATGACAGTCT
MT3F	21	GGCAAGATGTACCCTGACCTT
MT3R	18	AGTGGCCGGCCTTCTTCT
GST1F	22	GCCGATCCTCAGAAGAAAGAAA
GST1R	18	CCGTCCGCTTGAAATGCT
GST2F	19	TGGCCGGTGATGAAATCTC
GST2R	21	GCGGGTTGGTAGAGTTCACAA

(F- forward; R- reverse)

3.2.3 EXTRAÇÃO DE RNA, SÍNTESE DE CDNA E RT-QPCR

Todas as etapas a seguir (extração RNA, cDNA, RT-qPCR, clonagem) foram realizadas em parceria com o Laboratório de Biotecnologia (BIOTEC), localizado na Faculdade de Ciências Aplicadas da UNICAMP- Limeira. sob a coordenação do prof. Augusto Ducati Luchessi.

O RNA total foi extraído utilizando o kit RNeasy Mini Kit (Qiagen), seguindo o protocolo do fabricante. Resumidamente, os organismos foram mecanicamente homogeneizados em 700 µL de tampão RLT (solução de lise), e centrifugados a 8.000 g por 3 min descartando-se o líquido ao final. Foram adicionados 700 µL de etanol (70%), e, posteriormente agitados com a pipeta para a lavagem do RNA. A solução foi transferida para um tubo de coluna, e, centrifugada a 8.000 g por 15 s a 4 °C, descartando-se o líquido. Em seguida, 700 µL de tampão RW1 (solução de lavagem) foram adicionados e centrifugados a 8.000 g por 15 s a 4 °C. A coluna foi colocada em um novo tubo, adicionou-se 500 µL de tampão RPE (solução de lavagem) e centrifugou-se a 8000 g por 15 s a 4 °C. Adicionou-se 500 µL de tampão RPE e centrifugou-se a 8.000 g por 2 min a 4 °C. A coluna foi transferida para outro tubo de 1,5 mL e 40 µL de água ultrapura autoclavada foram adicionados. Centrifugou-se a 8.000 g por 1 min a 4 °C, e, ao final do procedimento a concentração e a qualidade do RNA total foram determinadas por espectrofotômetro (Microplate Spectrophotometer Epoch, BioTek). As amostras foram armazenadas em ultrafreezer a -80 °C ou imediatamente utilizadas na síntese de cDNA.

Todas as amostras para a obtenção do cDNA, a partir do RNA total, foram tratadas com enzima DNase I (Thermo Fischer), de acordo com as especificações do fabricante, para a remoção do DNA genômico. O procedimento foi realizado com 600 ng de RNA total

adicionando-se 1 µL de tampão de DNase I 10x (100 mM Tris-HCl pH 7,5; 25 mM MgCl₂ e 1 mM CaCl₂), 1 µL da enzima DNase I e o volume foi completado com água ultrapura estéril para 10 µL. As amostras foram incubadas no termociclador (Veriti Thermal Cycler, ThermoFisher) por 30 minutos a 37 °C e a inibição da DNase I foi realizada pela adição de 1 µL de EDTA (25 mM) e incubação por 10 minutos a 65 °C. Posteriormente, o cDNA foi sintetizado utilizando o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (ThermoFisher), seguindo o protocolo do fabricante. Foram adicionadas as amostras 2 µL de 10X RT buffer, 0,8 µL de 25X dNTP mix (100 mM), 2 µL 10X RT Random primer, 1 µL de MultiScribe Reverse Transcriptase, e água ultrapura estéril para totalizar o volume da reação (20 µL). O cDNA foi sintetizado nas seguintes condições: 25 °C por 10 min, 37 °C por 120 min e 85 °C por 5 min em termociclador (Veriti Thermal Cycler, ThermoFisher). O cDNA foi armazenado a -20 °C até a análise quantitativa da transcriptase reversa-PCR (qRT-PCR).

A PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR) foi realizada usando o sistema de PCR em tempo real StepOnePlus Real-Time PCR System (ThermoFisher). As reações foram realizadas com 2 µL de cDNA, 2 µL (7,5 µM) de iniciadores (senso e anti-senso), 12,5 µL Master Mix (SYBR Green, ThermoFisher) e 6,5 µL de água ultrapura, totalizando um volume final de 25 µL. As condições de PCR em tempo real foram 95 °C por 10 min e 95 °C por 15 s, 60 °C por 30 s, 72 °C por 30 s por 40 ciclos. A eficiência da reação de PCR foi calculada para cada par de iniciadores a partir da curva padrão pela equação $[(e = 10^{(-1 / \text{slope})} - 1) \times 100]$ e a eficiência entre 90 e 110 % foi considerada aceitável. A quantidade de cDNA utilizada nas reações foi otimizada a partir de uma curva-padrão, realizada com diferentes concentrações de amostra de cDNA.

3.2.4 CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO UTILIZANDO OS PRODUTOS DE PCR

A identidade dos fragmentos gerados pelos iniciadores foi assegurada por clonagem e sequenciamento das amostras de 18S, GST1 e GST2. Uma reação de amplificação foi conduzida (como descrito no item 3.2.3), e ao término da reação as amostras foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 2%. Após a separação no gel, a banda obtida foi isolada com o auxílio de um bisturi e o DNA foi purificado utilizando o kit GenElute Extraction Kit (Sigma-Aldrich), e, posteriormente, a ligação dos fragmentos amplificados foi realizada em vetores de clonagem pGEM-T Easy PCR Product Cloning Kit (Promega) seguindo as especificações do fabricante. A ligação foi mantida a 4 °C *overnight*, e, após esse período, 10 µL da ligação foram

transferidos para um tubo contendo 150 μL de células competentes de *E. coli*. As ligações foram mantidas por 20 min no gelo, depois ficaram 50 s a 42 °C no banho-maria, mais 2 min no gelo, e, posteriormente foram adicionados 850 μL meio LB (Meio de cultura Luria-Bertani, 10 g L^{-1} triptona; 5 g L^{-1} extrato de levedura e 10 g L^{-1} NaCl), para então serem incubados por 1.5 h no shaker a 37 °C (~150 rpm). Após o período de incubação, adicionou-se X-Gal nas placas de LB com ágar e ampicilina e adicionou-se 100 μL da amostra. Incubou-se na estufa a 37 °C *overnight* para o crescimento das colônias. As colônias brancas foram selecionadas e crescidas em 2 mL de LB com 2 μL de ampicilina (100 mg L^{-1}), sendo mantidas em agitação constante a 37 °C até turvar. Após o período de incubação, as amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 3 min, tiveram o sobrenadante removido e o pellet foi armazenado em ultrafreezer -80 °C até seguir para a preparação de DNA plasmidial de *E. coli* em pequena escala (Miniprep), método de lise alcalina. Esse procedimento foi realizado utilizando o kit GenElute HP Plasmid Miniprep (Sigma-Aldrich), seguindo os procedimentos do fabricante. O pellet foi suspenso com 200 μL da solução de ressuspensão com a utilização de um vortex. Em seguida, foram adicionados 200 μL da solução de lise e os tubos foram invertidos (homogeneizados) 8 vezes. Posteriormente, foram adicionados 350 μL da solução de neutralização, os tubos foram invertidos 6 vezes e centrifugados a 12.000 g por 10 min. Em seguida, foram adicionadas as colunas aos microtubos e adicionados 500 μL da solução de preparação da coluna e centrifugados a 12.000 g por 1 min. As amostras foram transferidas para a coluna e centrifugadas a 12.000 g por 1 min. Foram adicionados 500 μL da solução de lavagem I e centrifugados a 12.000 g por 1 min. Posteriormente, adicionou-se 750 μL da solução de lavagem II e centrifugou-se a 12.000 g por 1 min, repetiu-se a etapa de centrifugação novamente para remover o excesso da solução. Foram adicionados 100 μL da solução de eluição na coluna e centrifugados a 12.000 g por 1 min. Ao final do procedimento, o DNA foi quantificado (Microplate Spectrophotometer Epoch, BioTek) e posteriormente, foi digerido com as enzimas de restrição ApA e NDE (ThermoFisher), que foram incubados em banho-maria por 2 h a 37 °C. Ao final do procedimento realizou-se a análise de restrição do plasmídeo por eletroforese em gel de agarose (1%).

Os DNAs produzidos a partir da clonagem dos genes de interesse (18S, GST1 e GST2) foram enviados para sequenciamento na empresa Biotecnologia, Pesquisa e Inovação (BPI, Botucatu, SP, Brasil), e foi utilizado o sequenciador Life ABI 3500 (ThermoFisher) pelo método Sanger. As amostras de DNA foram enviadas em uma concentração de ~20 ng/ μL , e, foi utilizado 1000 ng de DNA por reação de sequenciamento e os iniciadores para sequenciamento foram enviados em concentração de 5 μM . As sequências obtidas foram

alinhas e comparadas com a sequência de referência, utilizada para a construção dos iniciadores.

3.2.5 DESIGN EXPERIMENTAL - RT-QPCR

Como não haviam dados na literatura sobre a expressão dos genes selecionados em *P. hawaiiensis*, experimentos foram inicialmente conduzidos com contaminantes de referência via água. Para verificar a expressão das MTs, que são proteínas reconhecidamente relacionadas à detoxificação de metais, três experimentos independentes foram conduzidos com diferentes metais, tempo de exposição e concentrações. Primeiramente, 20 neonatas (<7 dias) foram expostas a 0,25 mg L⁻¹ de Zn por 24 h em 100 mL. Posteriormente, um outro experimento foi realizado utilizando 10 adultos expostos a 16 mg L⁻¹ de Zn (ZnSO₄.7H₂O, Sigma-Aldrich, ≥ 99%), por 24 h em 100 mL. E, finalmente, 4 adultos por tratamento foram individualmente expostos a 1 mg L⁻¹ de Cd (Cd(NO₃)₂.4H₂O, Vetec, 99%) por 24 e 48 h em 25 mL. As concentrações utilizadas basearam-se nas concentrações letais de testes agudos e os experimentos foram conduzidos com controles negativos em paralelo e condições controladas de temperatura 24 ± 2 ° C, salinidade 30 ± 2, fotoperíodo 12-12 h luz/escuro. Os organismos adultos utilizados nos experimentos tinham 8 meses de idade e a proporção de 1: 1 macho/fêmea foi adotada.

Para analisar a expressão das GSTs, experimentos iniciais foram realizados com Ag e benzo(a)pireno (BaP), na exposição via água. Nesse caso, o BaP também foi utilizado por se tratar de um contaminante de referência e ser reconhecido por induzir a expressão de GSTs (HOARAU et al., 2006; TURJA et al., 2014). Para o experimento com Ag, as concentrações utilizadas foram 0; 1; 10 e 100 µg L⁻¹ de Ag (AgNO₃, Sigma-Aldrich, ≥ 99%), com exposição de 8, 24 e 48 h, e 4 organismos adultos foram utilizados em cada tratamento. Para a exposição do BaP, organismos adultos, 4 por tratamento, foram expostos individualmente a 0; 0,1 e 1 µg L⁻¹ de BaP (Sigma-Aldrich) em 100 mL, por 8 e 24 h, na ausência de luz e um controle do dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich, 0,1%), utilizado como solvente, foi realizado em paralelo.

A partir dos resultados iniciais, foram realizados outros dois experimentos, uma exposição, via alimentação, aos alimentos contaminados com AgCl e Ag-NP, e uma exposição via água ao BaP. Para a exposição via alimentação, adultos foram mantidos individualmente em 100 mL de água salina reconstituída e foram alimentados em dias alternados com alimento controle, e alimentos contaminados com AgCl e Ag-NP por 4, 7 e 14 dias. Após uma hora que

o alimento foi adicionado, os organismos foram enxaguados e colocados em novos recipientes teste e água para garantir que a absorção de Ag fosse exclusivamente por exposição via alimentação. Para a exposição ao BaP, organismos adultos foram individualmente expostos em 100 mL a 0; 0,1 e 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ de BaP por 8, 24 e 48 h. As condições de exposição eram estáticas e foram conduzidas na ausência de luz para evitar a degradação do BaP. A solução de BaP foi realizada em DMSO e um controle do solvente foi conduzido em paralelo (0,1%). Condições controladas de temperatura 24 ± 2 °C, salinidade 30 ± 2 , e fotoperíodo 12-12 h luz/escuro foram mantidas nos experimentos. A proporção de 1: 1 macho/fêmea foi utilizada em todos os experimentos e ao final da exposição, 2 organismos do mesmo tratamento foram armazenados em microtubo mantendo a proporção (1: 1 proporção macho/fêmea). As amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultrafreezer a - 80 °C.

A expressão relativa de cada gene foi calculada usando o método de $\Delta\Delta\text{Ct}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) e normalizado com 18S como genes de referência. Os níveis de expressão gênica foram expressos como expressão relativa em relação à média do controle. Antes da análise todos os dados foram testados quanto à normalidade e à homogeneidade das variâncias. Somente quando os dados eram aceitáveis, a ANOVA (Modelo Linear Geral) foi usada para testar as diferenças de expressão dos genes, e o teste pós-hoc de Tukey foi usado para comparações múltiplas. Os dados que não foram normalmente distribuídos foram avaliados com teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para detectar a diferença entre os tratamentos.

3.2.6 DESIGN EXPERIMENTAL - RNA-SEQ

Antecipando que os genes selecionados não foram diferencialmente expressos nas condições testadas (descritas no item 3.2.5), uma análise de expressão gênica global foi realizada para investigar os genes diferencialmente expressos na exposição via alimentação à AgCl e Ag-NP. Para isso, organismos adultos, com 8 meses de idade, foram mantidos individualmente em 100 mL com água salina reconstituída, e foram alimentados em dias alternados por 7 dias com alimentos contaminados com AgCl, Ag-NP e controle. Os organismos permaneceram com o alimento por 1 hora e, em seguida foram enxaguados e colocados em um novo recipiente e nova água, para garantir que a exposição seria somente via alimento. Os organismos foram alimentados 4 vezes durante este período e as condições de exposição (temperatura, salinidade, fotoperíodo e qualidade da água) foram as mesmas empregadas na cultura e descritas anteriormente. A proporção entre machos e fêmeas nesse

experimento foi de 1: 1, mas os sexos foram armazenados e analisados separadamente, pois diferenças entre os sexos são esperadas. Ao final da exposição, 4 organismos do mesmo tratamento e sexo foram reunidos em um microtubo. Três repetições biológicas para cada tratamento e sexo foram realizadas. As amostras foram congeladas rapidamente em nitrogênio líquido e armazenadas a - 80 °C.

O RNA foi extraído usando uma abordagem combinada de Trizol (Invitrogen) e do kit RNeasy Mini Kit (Qiagen). Os organismos foram mecanicamente homogeneizados em 1 mL de Trizol e incubados por 5 min em temperatura ambiente. Foram adicionados 200 µL de clorofórmio, misturados com a utilização de um vortex e incubado em temperatura ambiente por 2 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 8.000 g por 20 min a 4 °C. O líquido foi removido cuidadosamente com a pipeta e adicionado 700 µL de etanol (70%). As amostras foram transferidas para a coluna do RNeasy kit e centrifugadas a 8.000 g por 30 s a 4 °C. Adicionou-se 700 µL da solução RWI, centrifugou-se a 8.000 g por 30 s a 4 °C, e descartou-se o líquido. Adicionou-se 500 µL da solução RPE, centrifugou-se a 8.000 g por 30 s a 4 °C e descartou-se o líquido, esse procedimento foi repetido mais uma vez e ao final, a coluna foi centrifugada mais uma vez sem líquido a 8.000 g por 2 min a 4 °C para secar a coluna. Colocou-se a coluna em um novo microtubo e adicionou-se 50 µL de água ultrapura estéril, incubou-se por 1 min em temperatura ambiente e centrifugou-se a 8.000 g por 2 min a 4 °C. O RNA foi quantificado usando espectrofotômetro (Microplate Spectrophotometer Epoch, BioTek) e a integridade foi verificada no Bioanalyzer (Agilent).

A análise de expressão gênica global, RNA-seq, foi realizada no laboratório de Biotecnologia Animal, coordenado pelo prof. Luiz Lehmann Coutinho, localizado Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ), na Universidade de São Paulo, campus Piracicaba. As bibliotecas de RNAseq paired-end foram construídas seguindo o protocolo do kit TruSeq Stranded mRNA LT Sample Prep (Illumina). O sequenciamento foi realizado no sequenciador Illumina HiSeq 2500 Flow Cell v4 com HiSeq SBS Kit v4 utilizando 100 paired end reads (100 bp).

As análises dos dados do RNA-seq foram realizadas no Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida (LaCTAD), localizado na Universidade Estadual de Campinas, com a colaboração do Dr. Henrique Marques-Souza e Dr. Vagner Katsumi Okura, e compreenderam as etapas de montagem e mapeamento de transcriptoma de novo, anotação funcional de transcritos e análise diferencial de expressão gênica.

4 RESULTADOS

Os resultados obtidos neste trabalho foram organizados em dois capítulos, apresentados a seguir. O Capítulo I “*Development of an acute toxicity test with the tropical marine amphipod Parhyale hawaiiensis*” já foi publicado na revista Ecotoxicology e apresenta os procedimentos padronizados para o cultivo e manutenção dos organismos no laboratório, define as condições para teste miniaturizado de toxicidade aguda e apresenta resultados para contaminantes de referência como metais e amônia.

O Capítulo II - “*Development of ecotoxicity biomarkers in the amphipod Parhyale hawaiiensis*” está estruturado na forma de artigo, mas será submetido futuramente com alterações. Nesse capítulo estão descritas as análises de expressão gênica de genes-alvo, sendo eles metalotioneínas (MT) e glutathione S-transferase (GST), e resultados do transcriptoma (RNA-seq) de organismos adultos expostos via alimentação com alimentos contaminados com AgCl e Ag-NP.

4.1 CAPÍTULO I

Development of an acute toxicity test with the tropical marine amphipod *Parhyale hawaiiensis*

Mariana Coletty Artal ^{1,2}, Amanda dos Santos ^{1,2}, Theodore Burdick Henry ^{3,4},
Gisela de Aragão Umbuzeiro ^{1,2}

1 School of Pharmaceutical Sciences, University of Sao Paulo, São Paulo 05508-000, Brazil

2 School of Technology, University of Campinas, Limeira 13484-332, Brazil

3 Institute of Life and Earth Sciences, School of Energy, Geoscience, Infrastructure, and Society, Heriot-Watt University, Edinburgh EH14 4AS, Scotland

4 Center for Environmental Biotechnology, The University of Tennessee, 676 Dabney Hall, 1416 Circle Drive, Knoxville, TN 37996-1605, USA

Published in *Ecotoxicology* journal (2018).

DOI 10.1007/s10646-017-1875-3

ABSTRACT

There is a lack of suitable tropical marine species for ecotoxicity tests. An attractive model organism for ecotoxicology is the marine amphipod *Parhyale hawaiiensis*, which is already a model for genetic and developmental studies. This species is widespread, can tolerate changes in salinity, is easy to handle and is representative of circumtropical regions. The aim of this work was to describe standardized procedures for laboratory husbandry, define conditions for acute toxicity tests, and to provide acute toxicity test results for some reference toxicants. Culturing conditions for the organism in the laboratory were established in reconstituted seawater (30 ± 2 salinity), 24 ± 2 °C, photoperiod 12/12 h light/dark. Acute toxicity test procedures were developed for 96 h-exposure time, and organisms at ages <7 days. The miniaturized version of the test, based on 96-well microplates and 200 µL of exposure media provided consistent results compared to larger exposure volumes (80-mL vials protocol). Acute toxicity of Ag, Cd, Cu, Zn and ammonia determined for *P. hawaiiensis* were consistent to previous results for other marine amphipods. We conclude that *P. hawaiiensis* can be successfully cultured in standardized conditions and be effectively used in acute toxicity testing. Further development and use of this model will enable standardized and reproducible ecotoxicology investigations in understudied and vulnerable tropical marine ecosystems.

Keywords: Ammonia. Culture conditions. Metal toxicity. Microplate test. Miniaturization.

1 INTRODUCTION

Circumtropical estuaries and nearshore marine ecosystems are frequently contaminated by anthropogenic pollutants, but few standardized ecotoxicity test organisms are available for monitoring these environments (MELO; NIPPER, 2007). The recommended criteria for selection of ecotoxicity test organisms include a wide geographic distribution, short life cycle, high abundance, high reproductive potential, relevance to ecosystems or habitats of concern and adaptability to controlled laboratory conditions (LEE, 1977; ASTM, 2014). Among aquatic organisms, amphipods are attractive for ecotoxicity tests because of their important position in the food chain, abundance in the environment, sensitivity to pollutants, and adaptability to laboratory conditions (BORGSMANN et al., 2005; MANN et al., 2010; TRAPP et al., 2016).

An attractive amphipod model species is *Parhyale hawaiiensis*, which is an epibenthic amphipod with circumtropical distribution that lives in bays, estuaries, and mangroves (SHOEMAKER, 1956; TARARAM; WAKABARA; LEITE, 1978; LECROY, 2007) and tolerates salinities from 5 to 40 (POOVACHIRANON; BOTO; DUKE, 1986). The organism has become a model for evolutionary and developmental biology research (HAVEMANN et al., 2008; REHM et al., 2009; BLYTHE et al., 2012; NESTOROV et al., 2013), and there is considerable information in the literature on *P. hawaiiensis* development, genomic sequences (BLYTHE et al., 2012; KAO et al., 2016), transcriptomics (ZENG et al., 2011) and proteomics (TRAPP et al., 2016). Despite the many advantages of *P. hawaiiensis* as a research organism, only a few ecotoxicology studies have been conducted (LEE; NICOL, 1978, 1980; LEE; MACKO; CIERESZKO, 1981), and no standardized procedures have been developed for husbandry or testing. Our objectives were to describe procedures for husbandry of *P. hawaiiensis* and develop and evaluate acute ecotoxicity test procedures

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 COLLECTION, CULTURING AND MAINTENANCE OF TEST ORGANISMS

Amphipods were collected at Poço do Anchieta, Itanhaém (24°12' 6.42" S, 46°48' 38.47" W), state of São Paulo, Brazil in 2010, and identified as *P. hawaiiensis*, based on organism morphology. *P. hawaiiensis* have been cultivated at a density of 125 neonates per L (consistent with U.S. EPA recommendations (US EPA, 2001)) in 5-L plastic containers (33 cm × 21.8 cm) containing a 1-cm deep substrate of crushed coral [(granulometry #8) Extavour (2004)] and 2-L of aerated artificial seawater (salinity 30; Red Sea Salt®). Abiotic conditions of the *P. hawaiiensis* stock culture were 24 ± 2 °C, 12-h photoperiod, and water quality of 6 ± 2 mg L⁻¹ dissolved oxygen, pH 8 ± 1 and salinity 30 ± 2 . Organisms were fed a commercial sinking fish food pellet (e.g., JBL® tabs) daily, approximately 0.15 g for adults and 0.08 g for neonates in each container, a 50% water change was completed twice per week, and total water exchange and cleaning of culture container occurred once per month.

To provide specific information on laboratory cultures of *P. hawaiiensis*, we measured adult size, fecundity of females related to age, and hatching success per brood. Total length (TL) of adults was determined by examination of images and use of ImageJ software (SCHNEIDER; RASBAND; ELICEIRI, 2012), and TL was defined as the length along the dorsal margin of the organism beginning at the base of the head and ending at the base of telson (HYNE; GALE; KING, 2005). To determine hatching success, fertilized females carrying embryos were anesthetized with commercial clove oil (1:5000 diluted with seawater) and embryos were carefully removed from the ventral brood under a stereo microscope (BLYTHE et al., 2012). Embryos from the same brood were placed together in 12-well microplates (5 mL) and monitored daily. Hatched embryos were enumerated and removed, and water was renewed daily.

2.2 TOXICITY TESTING CONDITIONS

Adults were separated and placed in a 2.5-L plastic container containing natural rocks (10-15 cm), and neonates were collected. Neonates were exposed (96 h) without food under static conditions to 25 mL of solution in 80-mL plastic vials (one neonate per vial, 10 replicates for each test concentration). To support volume reduction, 200 µL of solution per well in 96-well microplates (one neonate per well with 32 replicate wells for each concentration) were also used and results compared. Temperature, salinity, photoperiod, and water quality were the same

of stock cultures (above). Mortality was recorded by examination with a stereoscopic microscope and tests were considered valid when mortality in the control did not exceed 10%. In general, a minimum of two independent experiments were performed for each test condition and indicated accordingly.

First, we evaluated the effect of neonate age and salinity (5, 10 and 30) in the toxicity responses. These experiments were performed only in 80-mL vials with zinc sulfate heptahydrate ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Sigma-Aldrich, $\geq 99\%$), diluted in reconstituted seawater. Concentrations for the neonate experiments were 0.12; 0.25; 0.5; 1; 2 mg L^{-1} for <24 h and 0.11; 0.22; 0.45; 0.68; 0.9; 1.4; 1.8; 2.3 mg L^{-1} for <7 days. For the salinity experiments, concentrations were 0.03; 0.06; 0.12; 0.24; 0.48 mg L^{-1} for salinity 5; and 0.12; 0.25; 0.5; 1; 2 mg L^{-1} for both salinity 10 and 30.

We selected Zn as a reference toxicant and also tested silver nitrate (AgNO_3 , Sigma-Aldrich, $\geq 99\%$), cadmium nitrate tetrahydrate ($\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, Vetec, 99%), copper (II) chloride dihydrate ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Sigma-Aldrich, $\geq 99\%$) and ammonium chloride (NH_4Cl , Sigma-Aldrich, $\geq 99.5\%$). Cd and ammonia solutions were prepared in reconstituted seawater. The solutions of Ag and Cu were prepared in milliQ water (stock) and further diluted in reconstituted seawater. When precipitation of metal salts was evident during testing conditions, data were excluded from the statistical analysis. Tests with reference toxicants were performed both in 80-mL vials and 96-well microplates protocols, except for ammonia, which was only tested in 96-well microplates at 5 concentrations (from 1 to 100 mg L^{-1}). Ag and Cd concentrations were the same in both protocols (0.1; 0.4; 0.8; 1.6; 3.2 mg L^{-1} and 0.1; 0.2; 0.4; 0.8; 1.6 mg L^{-1} , respectively). Zn was tested in 0.11; 0.22; 0.45; 0.68; 0.9; 1.36; 1.81; 2.27 mg L^{-1} for 80-mL vials and 0.12; 0.25; 0.5; 1; 2 mg L^{-1} for 96-well microplates. For Cu, concentrations were 0.08; 0.3; 1.25; 5 mg L^{-1} for 80-mL vials and 0.1; 0.3; 1; 3; 10 mg L^{-1} for 96-well microplates. Negative controls (reconstituted seawater) were conducted in all tests.

2.3 STATISTICAL ANALYSIS

Data on mortality from the independent tests were combined (binary data) and modeled by logistic regression for the calculation of the LC50 with the following generalized logistic model: $\text{logit}(P) = \mu + b(\text{concentration}) + c(\text{test procedure}) + d[(\text{concentration}) \times (\text{test procedure})]$, where $\text{logit}(P)$ is the log odds of an organism dying, μ is the intercept, b is the fixed effect of concentration, c is the fixed effect of test procedure, and d is the fixed effect of the interaction term. Model estimation was performed by iterative estimation of the likelihood

function, and only terms that contributed significantly ($p \leq 0.05$) were included in the selected model (IHAKA; GENTLEMAN, 1996; R CORE TEAM, 2015). The estimate of *logit* (P) was used to obtain the predicted probability of mortality ($P = \text{elogit}(P)/(1 + \text{elogit}(P))$). Differences among levels of independent variable “test procedure” (i.e., 96-well microplate compared to 80-mL vial) were tested by contrast statements after selection of the logistic model and considered significantly different at $p \leq 0.05$. Comparison of size and number of molts among ages was accomplished by ANOVA after data was determined to be normally distributed (Shapiro-Wilks test, $p > 0.05$) with homogeneous variance (Bartlett test $p > 0.05$), and differences among levels of the independent variable were determined by Tukey’s test post hoc.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 COLLECTION, CULTURING AND MAINTENANCE OF TEST ORGANISMS

Individual organisms survived for more than 2 years in laboratory conditions and reached maximum TL of 14 mm for males (range 8-14 mm, $n = 32$) and 13 mm for females, (range 7-13 mm, $n = 38$) and were consistent with data previously reported (LECROY, 2007). Females started to produce embryos at around 3-months age. We observed that each brood had 4-27 embryos per female regardless their age and older females produced more embryos. Average embryos per female for *L. plumulosus* in laboratory ranged from 5 to 15 (MOORE et al., 1997) and for *Gammarus locusta* from 20 to 120 (NEUPARTH; COSTA; COSTA, 2002). Average hatching success for *P. hawaiiensis* was $89 \pm 4\%$ (mean, $\pm$ SD) regardless of female age, and was greater than that reported for *G. locusta* (range 10-50%) (NEUPARTH; COSTA; COSTA, 2002).

3.2 DEVELOPMENT OF TOXICITY TESTING CONDITIONS

3.2.1 EFFECT OF AGE

No differences ($p > 0.05$) in Zn sensitivity were observed for tests conducted with organisms from <24 h-old (15 independent tests) and <7 day-old (12 independent tests) (Figure 1), although neonates of 6 and 8-days old were significantly bigger than younger ones (data not shown). This size difference did not affect neonate sensitivity to Zn. Previous studies have recognized that early life stages of amphipods are most sensitive compared to juvenile and adult stages (MCCAHON; PASCOE, 1988; MOORE et al., 1997; MCGEE; WRIGHT; FISHER, 1998). Frequency of molts could also affect the sensitivity (WAJSBROT et al., 1990), but when the number of molts was recorded (encompassing the 96 h-test period) at ages 4, 6, 8, 10 and 12-days old ($n = 840$), no significant differences in the number of molts were observed (data not shown). Therefore, we recommend the use of neonates <7 days old for testing as we can obtain more organisms in a single day.

Figure 1 - Mortality of *P. hawaiiensis* of age <24 h-old (solid circles) and <7 days-old (crosses) exposed to different Zn concentrations after 96-h exposure. Each point represents the mean (with standard error) and the line represents the logistic regression model for both ages.

Source: Artal et al. (2018). Copyright 2018 Springer.

3.2.2 EFFECT OF SALINITY

The LC50 (96 h) for Zn tested in salinities 5, 10 and 30 were 0.24, 0.29 and 0.54 mg L⁻¹ calculated from 2, 3 and 9 independent experiments, respectively. Acute toxicity of Zn was significantly less toxic at salinity 30 compared to 5 and 10 ($p < 0.05$), which were not different from each other. Lower metal toxicity at higher salinities is consistent with previous results reported in the literature (MCGEE; WRIGHT; FISHER, 1998; LEONARD et al., 2011). Although Poovachiranon; Boto; Duke, (1986) reported that *P. hawaiiensis* tolerates a wide range of salinity (5-40), three of the five independent tests performed at salinity 5 presented unacceptable levels of mortality in the control (>10% in control) therefore we do not recommend testing at salinities lower than 10, unless more studies are developed including acclimation of cultures to lower salinities.

3.2.3 METALS AND AMMONIA TOXICITY

Dose response for metals and respective logistic regressions for both 80-mL vials and 96-well microplates are shown in Figure 2. LC50 for 96-well microplates were similar to 80-mL vials for Ag and Cd ($p > 0.05$) (Figure 2). For Cu, 96-well microplates LC50 (96 h) were lower ($p < 0.05$) and for Zn, higher ($p < 0.05$) (Figure 2Figure), indicating that the differences do not seem to be related to miniaturization itself although statistical differences between standard and miniaturized protocols have been already reported (Baumann et al. 2014). Ammonia was tested only in 96-well microplates and LC50 was 34 mg L⁻¹.

Regardless of the method used (80-mL vials or 96-well microplates), LC50 values for *P. hawaiiensis*, are within the range of those reported for other amphipods for Cd, Cu and Zn, but *P. hawaiiensis* was somewhat more sensitive to ammonia (Figure 3). Ag was not included in the comparison because data on Ag toxicity with marine amphipods were not found in the literature.

Both protocols developed in this study provided acceptable results for ecotoxicity of reference toxicants, but the 96-well microplate procedure has several advantages. It requires less test substance/sample volume, is easier to perform, saves incubator space and generates less liquid and solid waste.

Figure 2 - Mortality of *P. hawaiiensis* relative to metals concentration for organisms exposed (96 h) in 80-mL vial (solid line) and 96-well microplates (dashed line). Each point represents the mean (with standard error) for independent replicates Ag (a n = 3 independent test for each condition), Cd (b n = 3 independent test for each condition), Cu (c n = 3 independent test for each condition) and Zn (d n = 10 for microplates and 12 for vials). A hashtag (#) indicates points removed from the calculation because of metal salt precipitation within the test media.

Source: Artal et al. (2018). Copyright 2018 Springer.

Figure 3 - Comparison of *P. hawaiiensis* LC50 (96 h) for the 80-mL vials (solid circle) and 96-well microplates (open circle) protocols and the literature for Cd, Cu, Zn and ammonia (solid lines represents maximum and minimum values reported in the literature for marine amphipods, please see supplementary material for details).

Source: Artal et al. (2018). Copyright 2018 Springer.

4 CONCLUSIONS

We conclude that *P. hawaiiensis* can be successfully cultured in standardized conditions in the laboratory and be effectively used in ecotoxicity tests. Conditions for acute toxicity testing were successfully defined and applied to assess toxicity of metals and ammonia. The toxicological responses of *P. hawaiiensis* were consistent with other amphipods and the organism appears especially promising as an ecotoxicology tool for circumtropical regions that can also be employed in combination with the existing and rapidly developing tools from molecular and developmental biology of this organism.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was founded by “Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo” (FAPESP Process: 2014/ 08829-7), “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico” (CNPq-PVE Process: 400362/2014-7), “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior” (CAPES), “Instituto Nacional de Ciência, Tecnologia e Informação em Materiais Complexos Funcionais” (INOMAT). The authors thank M. Flynn, A. Caloto-Oliveira and G. Almeida for the organism collection, F. Leite and S.L. Gomes for the organism identification

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Table 1 - Comparison of the toxicity of metals and ammonia with different marine amphipods

Species	Substance LC50 (mg L ⁻¹)					Life stage	Test duration	Salinity	Author
	Ag	Cd	Cu	Zn	NH ₄				
<i>Parhyale hawaiiensis</i>	1.1	0.5	1.7	1.1	34.0	≤7 d (~2 mm)	96h	30	this work
<i>Ampelisca abdita</i>	-	1.32	-	-	49.8	N.I.	96h	30	(KOHN et al., 1994)
	-	0.036	0.020	0.34	-	N.I.	10d	N.I.	(BERRY et al., 1996)
	-	>2.5	-	-	-	N.I.	24h	25	(WERNER; NAGEL, 1997)
	-	-	0.042	-	-	N.I.	96h	N.I.	(MCPHERSON; CHAPMAN, 2000)
<i>Corophium volutator</i>	-	-	-	1-16	-	N.I.	96h	5-35	(BRYANT et al., 1985)
<i>Eohaustorius estuarius</i>	-	-	-	-	125.5	N.I.	96h	30	(KOHN et al., 1994)
	-	>10	-	-	-	N.I.	24h	31	(WERNER; NAGEL, 1997)
	-	-	12.5-25	-	-	N.I.	96h	N.I.	(MCPHERSON; CHAPMAN, 2000)
<i>Gammarus locusta</i>	-	0.85	0.30	-	-	Juveniles (2-4 mm)	96h	33-34	(COSTA; CORREIA; COSTA, 1998)

Continue

Continuation

Species	Substance LC50 (mg L ⁻¹)					Life stage	Test duration	Salinity	Author
	Ag	Cd	Cu	Zn	NH ₄				
<i>Leptocheirus plumulosus</i>	-	0.05	-	-	-	Juveniles (7-14 d)	96h	5	(EMERY et al., 1997)
	-	-	-	-	88.9	Subadults (≥14 d)	96h	5	(MOORE et al., 1997)
	-	-	-	-	44.4	Juveniles (7-14 d)	96h	5	(MOORE et al., 1997)
	-	0.36 0.65	- -	- -	-	Subadults (2-4 mm)	96h	8	(MCGEE; WRIGHT; FISHER, 1998)
	-	1.35	-	0.91	-	0.6-1.0 mm	96h	20	(LEE et al., 2004)
<i>Rhepoxynius abronius</i>	-	0.24	-	-	-	N.I.	96h	35	(HONG; REISH, 1987)
	-	1.92	-	-	78.7	N.I.	96h	30	(KOHN et al., 1994)
	-	>10	-	-	-	N.I.	24h	31	(WERNER; NAGEL, 1997)
<i>Tiburonella viscana</i>	-	-	-	0.79	-	N.I.	48h	34	(MELO; NIPPER, 2007)

-: data not found; N.I. not indicated

Source: Artal et al. (2018). Copyright 2018 Springer.

:

5 REFERENCES

- ASTM. **Standard test method for measuring the toxicity of sediment-associated contaminants with estuarine and marine invertebrates**. American Society for Testing and Materials. E 1367-03. West Conshohocken, USA., 2014. .
- BERRY, W. J.; HANSEN, D. J.; MAHONY, J. D.; ROBSON, D. L.; DI TORO, D. M.; SHIPLEY, B. P.; ROGERS, B.; CORBIN, J. M.; BOOTHMAN, W. S. Predicting the toxicity of metal-spiked laboratory sediments using acid-volatile sulfide and interstitial water normalizations. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 15, n. 12, p. 2067–2079, dez. 1996. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/etc.5620151203>>.
- BLYTHE, M. J.; MALLA, S.; EVERALL, R.; SHIH, Y.; LEMAY, V.; MORETON, J.; WILSON, R.; ABOOBAKER, A. A. High through-put sequencing of the *Parhyale hawaiiensis* mRNAs and microRNAs to aid comparative developmental studies. **PloS one**, v. 7, n. 3, p. e33784, jan. 2012.
- BORGMANN, U.; COUILLARD, Y.; DOYLE, P.; DIXON, D. G. Toxicity of sixty-three metals and metalloids to *Hyalella azteca* at two levels of water hardness. **Environmental toxicology and chemistry**, v. 24, n. 3, p. 641–652, 2005.
- BRYANT, V.; NEWBERY, D. M.; MCLUSKY, D. S.; CAMPBELL, R. Effect of temperature and salinity on the toxicity of nickel and zinc to two estuarine invertebrates (*Corophium volutator*, *Macoma balthica*). **Marine ecology**, v. 24, p. 139–153, 1985.
- COSTA, F. O.; CORREIA, A. D.; COSTA, M. H. Acute marine sediment toxicity: a potential new test with the amphipod *Gammarus locusta*. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 40, n. 1–2, p. 81–7, 1998.
- EMERY, V. L.; MOORE, D. W.; GRAY, B. R.; DUKE, B. M.; GIBSON, A. B.; WRIGHT, R. B.; FARRAR, J. D. Development of a chronic sublethal sediment bioassay using the estuarine amphipod *Leptocheirus plumulosus* (Shoemaker). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 16, n. 9, p. 1912–1920, 1997. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/etc.5620160921>>.
- EXTAVOUR, C. G. *Parhyale hawaiiensis* culture notes. October. Disponível em: <[http://www.extavourlab.com/protocols/Parhyale hawaiiensis culture.pdf](http://www.extavourlab.com/protocols/Parhyale_hawaiiensis_culture.pdf)>.
- HAVEMANN, J.; MÜLLER, U.; BERGER, J.; SCHWARZ, H.; GERBERDING, M.; MOUSSIAN, B. Cuticle differentiation in the embryo of the amphipod crustacean *Parhyale hawaiiensis*. **Cell and tissue research**, v. 332, n. 2, p. 359–70, maio 2008.
- HONG, J. S.; REISH, D. J. Acute toxicity of cadmium to eight species of marine amphipod and isopod crustaceans from southern California. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 39, n. 5, p. 884–888, 1987.
- HYNE, R. V; GALE, S. a; KING, C. K. Laboratory culture and life-cycle experiments with the benthic amphipod *Melita plumulosa* (Zeidler). **Environmental toxicology and chemistry**, v. 24, n. 8, p. 2065–2073, 2005.
- IHAKA, R.; GENTLEMAN, R. R: A Language for Data Analysis and Graphics. **Journal of Computational and Graphical Statistics**, v. 5, n. 3, p. 299–314, 1996.

KAO, D.; LAI, A. G.; STAMATAKI, E.; ROSIC, S.; KONSTANTINIDES, N.; JARVIS, E.; DI DONFRANCESCO, A.; POUCHKINA-STANCHEVA, N.; SÉMON, M.; GRILLO, M.; BRUCE, H.; KUMAR, S.; SIWANOWICZ, I.; LE, A.; LEMIRE, A.; EISEN, M. B.; EXTAVOUR, C.; BROWNE, W. E.; WOLFF, C.; AVEROF, M.; PATEL, N. H.; SARKIES, P.; PAVLOPOULOS, A.; ABOOBAKER, A. The genome of the crustacean *Parhyale hawaiiensis*, a model for animal development, regeneration, immunity and lignocellulose digestion. **eLife**, v. 5, p. 65789, 16 nov. 2016.

KOHN, N. P. P.; WORD, J. Q. Q.; NIYOGI, D. K. K.; ROSS, L. T.; MOORE, T.; W., D. D.; DILLON, T.; MOORE, D. W. Acute toxicity of ammonia to four species of marine amphipod. **Marine Environmental Research**, v. 38, n. 1, p. 1–15, jan. 1994. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0141113694900426>>. Acesso em: 27 jul. 2017.

LECROY, S. E. Families Anamixidae, Eusiridae, Hyalellidae, Hyalidae, Iphimediidae, Ischyroceridae, Lysianassidae, Megalurotidae and Melphidippidae. Volume 4. In: **An Illustrated Identification Guide to the Nearshore Marine and Estuarine Gammaridean Amphipoda of Florida**. Tallahassee, Florida: Florida Department of Environmental Protection, 2007. p. 120.

LEE, J.-S.; LEE, B.-G.; LUOMA, S. N.; YOO, H. Importance of equilibration time in the partitioning and toxicity of zinc in spiked sediment bioassays. **Environmental toxicology and chemistry / SETAC**, v. 23, n. 1, p. 65–71, 2004.

LEE, W. Y. Some laboratory cultured crustaceans for marine pollution studies. **Marine Pollution Bulletin**, v. 8, n. 11, p. 258–259, 1977.

LEE, W. Y.; MACKO, S. A.; CIERESZKO, L. S. Toxic effects of cembranolides derived from octocorals on the rotifer *Brachionus plicatilis* Muller and the amphipod *Parhyale hawaiiensis* (Dana). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 54, p. 91–96, 1981.

LEE, W. Y.; NICOL, J. A. C. The effect of naphthalene on survival and activity of the amphipod *Parhyale*. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 20, n. 2, p. 233–240, 1978.

LEE, W. Y.; NICOL, J. A. C. Toxicity of a fuel oil to the eggs of *Parhyale hawaiiensis* and *Amphithoe valida* (amphipoda). **Marine Environmental Research**, v. 3, p. 297–305, 1980.

LEONARD, E. M.; BARCAROLLI, I.; SILVA, K. R.; WASIELESKY, W.; WOOD, C. M.; BIANCHINI, A. The effects of salinity on acute and chronic nickel toxicity and bioaccumulation in two euryhaline crustaceans: *Litopenaeus vannamei* and *Excirolana armata*. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 154, n. 4, p. 409–419, 2011.

MANN, R. M.; HYNE, R. V.; SIMANDJUNTAK, D. L.; SIMPSON, S. L. A rapid amphipod reproduction test for sediment quality assessment: in situ bioassays do not replicate laboratory bioassays. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 29, n. 11, p. 2566–2574, 2010.

MCCAHERN, C. P.; PASCOE, D. Use of *Gammarus pulex* (L.) in safety evaluation tests: Culture and selection of a sensitive life stage. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 15, n. 3, p. 245–252, 1988.

MCGEE, B. L.; WRIGHT, D. A.; FISHER, D. J. Biotic factors modifying acute toxicity of aqueous cadmium to estuarine amphipod *Leptocheirus plumulosus*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 34, n. 1, p. 34–40, 1998.

MCPHERSON, C. A.; CHAPMAN, P. M. Copper effects on potential sediment test organisms: the importance of appropriate sensitivity. **Marine Pollution Bulletin**, v. 40, n. 8, p. 656–665, 2000.

MELO, S. L. R.; NIPPER, M. Sediment toxicity tests using the burrowing amphipod *Tiburonella viscana* (Amphipoda: Platyschnopidae). **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 66, n. 3, p. 412–20, mar. 2007.

MOORE, D. W.; BRIDGES, T. S.; GRAY, B. R.; DUKE, B. M. Risk of ammonia toxicity during sediment bioassays with the estuarine amphipod *Leptocheirus plumulosus*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 16, n. 5, p. 1020–1027, 1997.

NESTOROV, P.; BATTKE, F.; LEVESQUE, M. P.; GERBERDING, M. The maternal transcriptome of the crustacean *Parhyale hawaiiensis* is inherited asymmetrically to invariant cell lineages of the ectoderm and mesoderm. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, 2013.

NEUPARTH, T.; COSTA, F. O.; COSTA, M. H. Effects of temperature and salinity on life history of the marine amphipod *Gammarus locusta*. Implications for ecotoxicological testing. **Ecotoxicology**, v. 11, n. 1, p. 61–73, 2002. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1023/A:1013797130740>>.

POOVACHIRANON, S.; BOTO, S.; DUKE, N. Food preference studies and ingestion rate measurements of the mangrove amphipod *Parhyale hawaiiensis* (Dana). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 98, p. 129–140, 1986.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. In: Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2015.

REHM, E. J.; HANNIBAL, R. L.; CHAW, R. C.; VARGAS-VILA, M. a.; PATEL, N. H. The crustacean *Parhyale hawaiiensis*: A new model for arthropod development. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 4, n. 1, 2009.

SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature Methods**, v. 9, n. 7, p. 671–675, 28 jun. 2012.

SHOEMAKER, C. R. Observations on the Amphipod Genus *Parhyale*. **Proceedings of the United States National Museum**, v. 106, n. 3372, p. 345–358, 1956.

TARARAM, A. S.; WAKABARA, Y.; LEITE, F. P. P. Notes on *Parhyale hawaiiensis* (Dana), Crustacea-Amphipoda. **Bulletin of Marine Science**, v. 28, n. 4, p. 782–786, 1978.

TRAPP, J.; ALMUNIA, C.; GAILLARD, J.-C.; PIBLE, O.; CHAUMOT, A.; GEFFARD, O.; ARMENGAUD, J. Proteogenomic insights into the core-proteome of female reproductive tissues from crustacean amphipods. **Journal of Proteomics**, v. 135, p. 51–61, 2016.

US EPA. Method for assessing the chronic toxicity of marine and estuarine sediment-associated contaminants with the amphipod *Leptocheirus plumulosus*. EPA 600/R-

01/020. Washington, DC, USA, 2001.

WAJSBROT, N.; GASITH, A.; KROM, M. D.; SAMOCHA, T. M. Effect of dissolved oxygen and the molt stage on the acute toxicity of ammonia to juvenile green tiger prawn *Penaeus semisulcatus*. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 9(4), p. 497–504, 1990.

WERNER, I.; NAGEL, R. Stress proteins HSP60 and HSP70 in three species of amphipods exposed to cadmium, diazinon, dieldrin and fluoranthene. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 16, n. 11, p. 2393–2403, 1997.

ZENG, V.; VILLANUEVA, K. E.; EWEN-CAMPEN, B. S.; ALWES, F.; BROWNE, W. E.; EXTAVOUR, C. G. De novo assembly and characterization of a maternal and developmental transcriptome for the emerging model crustacean *Parhyale hawaiiensis*. **BMC genomics**, v. 12, n. 1, p. 581, jan. 2011

4.2 CAPÍTULO II

Development of ecotoxicity biomarkers in the amphipod *Parhyale hawaiiensis*

Mariana Coletty Artal^{1,2}, Karina Daniele Pereira^{3,4}, Augusto Ducati Luchessi^{3,4}, Henrique Marques-Souza⁵, Theodore Burdick Henry^{6,7}, Gisela de Aragão Umbuzeiro^{1,2}

¹ School of Pharmaceutical Sciences, University of Sao Paulo, São Paulo 05508-000, Brazil.

² School of Technology, University of Campinas, Limeira 13484-332, Brazil.

³ Laboratory of Biotechnology, School of Applied Sciences, University of Campinas, 13484-350 Limeira, SP, Brazil.

⁴ Institute of Biosciences, São Paulo State University, Rio Claro, SP, Brazil

⁵ Department of Biochemistry and Tissue Biology, State University of Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil.

⁶ Institute of Life and Earth Sciences, School of Energy, Geoscience, Infrastructure, and Society, Heriot-Watt University. EH14 4AS, Edinburgh, Scotland.

⁷ Center for Environmental Biotechnology, The University of Tennessee. 676 Dabney Hall, 1416 Circle Drive, Knoxville TN 37996-1605, United States.

ABSTRACT

Silver is one of the most toxic metals, extensively used due its antimicrobial activity and become the most used metal in nanoparticles (NPs). The behavior of NPs in the environment will enhance aggregation and sedimentation that increases the aquatic and dietary exposure of epibenthic organisms. Effects of NPs in aquatic invertebrates has been the focused of many studies but dietary exposure and gene expression analysis has not been investigated in marine aquatic invertebrates. The marine amphipod *Parhyale hawaiiensis* arises as an interesting model for ecotoxicology because it is epibenthic, detritivore, widespread and representative from tropical ecosystems. Also, *P. hawaiiensis* is already a model for evo-devo studies, but methods for gene expression has not been developed for ecotoxicity purposes. The aim of this work is to develop methods for gene expression analysis in *P. hawaiiensis* and apply them to investigate the effects of contaminated food with silver nanoparticles (Ag-NPs) and AgCl after dietary exposure. Primers for two sequences of metallothionein (MT), glutathione S-transferase (GST) and a reference gene (18S) were designed. Efficiencies for GST and 18S were between 90 and 110%, and amplified products were confirmed by sequencing. However, GSTs genes were not differentially expressed in our tested conditions. Thus, transcriptomic analysis (RNA-seq) was conducted with animals exposed via feeding every other day with control and contaminated pellet food containing either AgCl or Ag-NP (500 mg kg⁻¹) for 7 days. Global gene expression (RNA-seq) highlighted differences between males and females as well as AgCl and Ag-NP treatments. Comparison analysis revealed common genes expressed in both Ag forms, but also showed differences in Ag-NP treatment with both up and down regulated genes. RNA-seq results corroborate with RT-qPCR analysis since the investigated target genes (MTs and GSTs) were not differentially expressed. Analysis are underway to better understand toxicity responses pathways and global gene expression results. This is the first work that analyzed molecular biomarkers of Ag-NP exposure via feeding in marine amphipods and results can contribute to reveal promising biomarkers to differentiate Ag-NP and AgCl effects in adults of *P. hawaiiensis*.

Keywords: Gene expression. Glutathione S-transferase. Metallothionein. RNA-seq. Silver nanoparticles. Transcriptome

1 INTRODUCTION

Silver has been widely recognized to have antibacterial properties and its toxicity effect on different species has been well reported (RATTE, 1999; ARCE FUNCK et al., 2013). With the advent of nanotechnology, the use of silver nanoparticles (Ag-NPs) in a wide spectrum of products, their fate in the environment and their effects on aquatic organisms has also become popular and the focus of many studies (POYNTON et al., 2013). The negative impact of Ag-NPs on the environment has been reviewed and described, but there still some issues that are still unclear (WIJNHOFEN et al., 2009; FABREGA et al., 2011). Although the toxicity of Ag-NPs is partly explained by the release of Ag ions, it remains unclear if Ag-NPs are a direct cause of enhanced toxicity (LEVARD et al., 2012).

Silver nanoparticles (Ag-NPs) readily transform in the environment, which modifies their properties and alters their transport, fate, and exposure to aquatic organisms (LEVARD et al., 2012). Physical chemistry characteristics of nanoparticles are important for predicting behavior in environments such as estuarine and marine ecosystems. The increase of ionic strength of the media would increase aggregation in NP (FAIRBAIRN et al., 2011) and seawater conditions increases the sedimentation rate of nanoparticles that can quickly move from the water column to the surface layer of the sediment (BRADFORD et al., 2009; KELLER et al., 2010). Therefore, NPs are expected to make their way into the aquatic environment where sedimentation of particles will likely occur, putting benthic and epibenthic organisms at risk. In this case, the exposure via food is an important ecological consideration and relevant to consider in ecotoxicity evaluations and the uptake of NPs by aquatic organisms will be largely dependent on the feeding mode of the organism (JACKSON et al., 2012). Therefore, organisms such as amphipods, an epibenthic crustacean which forages at the sediment surface, is likely to have a high potential exposure to NPs (POYNTON et al., 2013).

Although NPs on digestive system of invertebrates have been observed in aquatic exposures to NPs (HEINLAAN et al., 2011; MATTSSON et al., 2016), effects of NPs dietary exposures has been poorly explored. Jackson et al. (2012) investigated the toxicity of quantum dots exposure via algae and water to the *Leptocheirus plumulosus* and showed high mortality of organisms exposed via algae in comparison to water. Effects related to food containing nanosized TiO₂ were also reported in the isopod *Porcellio scaber* and results highlighted destabilized cell digestive gland membranes and caused lipid peroxidation effects in the organisms. Moreover, a recent work investigated Ag concentrations in the hemolymph of *Parhyale hawaiiensis* fed with AgCl and Ag-NP and showed higher concentrations of Ag in the hemolymph of Ag-NP compared to AgCl organisms (Vannucci et al., 2018, in preparation).

Although important aspects of dietary exposure of NPs were revealed, toxicity responses in molecular levels, such as gene expression, were not found in the literature.

Molecular tools have been extensively revised and explored in the literature over the past years, and will aid in detecting sensitivity effects of NPs by dietary exposure and help understanding the mechanism involved in its toxicity (PIÑA; CASADO; QUIRÓS, 2007; POYNTON et al., 2011). Gene expression profiles in *Daphnia magna* exposed to AgNO₃ and Ag-NPs were investigated and highlighted distinct expression profiles between treatments, biological processes were disrupted by the Ag-NPs, including effects on protein metabolism and signal transduction; and AgNO₃ caused a downregulation of developmental processes, particularly in sensory development (POYNTON et al., 2012). Toxicogenomic study for Ag-NPs and Ag ions exposures in the earthworm *Eisenia fetida* indicated similar mechanisms for both Ag forms, however, main differences between treatments were observed and were related to cellular internalization and communication (NOVO et al., 2015). Therefore, the objective of this study was to develop gene expression analysis and investigate the differences of AgCl and Ag-NPs after dietary exposure to the marine amphipod *Parhyale hawaiiensis*.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 CULTURE AND HUSBANDRY OF *P. HAWAIIENSIS*

Stock cultures of the marine amphipod *P. hawaiiensis* were maintained in the laboratory under routine developed protocols (ARTAL et al., 2018). Briefly, organisms were maintained in 2-L of aerated artificial seawater (salinity 30 ± 2) containing substrate of crushed coral, temperature $24 \pm 2^\circ\text{C}$, 12-12 h light/dark photoperiod, and water quality of $6 \pm 2 \text{ mg L}^{-1}$ dissolved oxygen and pH 8 ± 1 . Organisms are feed daily with sinking fish food pellet.

2.2 FOOD CHARACTERIZATION

Contaminated and control food were identical and the same batch as reported in Merrifield et al. (2013) and Vannuci et al. (2018, in preparation). A basal diet was formulated to provide 40% protein and 6% lipid and this diet was used for the control group (MERRIFIELD et al., 2013). Treatment diets containing NPs were prepared by adding the unmodified powdered form of each NP (no stabilizing coats or surface functionalization) to the basal ingredients of the diet to ensure even distribution of NPs within the feed pellets at $500 \text{ mg NP kg}^{-1}$ feed. The Ag-NP (Silver nano $< 100 \text{ nm}$, Sigma Aldrich) were identical and from the same batch as reported in Bradford et al. (2009), with mean particle diameter $58.6 \pm 18.6 \text{ nm}$ (mean $\pm$ S.D., $n=64$). To distinguish the difference between nanoparticulate forms and elemental forms, 500 mg kg^{-1} Ag (as AgCl, Sigma Aldrich) were added to the basal ingredients to produce diets for treatments labelled AgCl (MERRIFIELD et al., 2013).

2.3 MOLECULAR ANALYSIS

2.3.1 TARGET GENES AND PRIMERS DESIGN

Primers were developed for metallothioneins (MT1 and MT3), glutathione S-transferase (GST1 and GST2) and the reference gene 18S (Table 1). Sequence information for 18S was available at GenBank (complete sequence, Accession Number AY826957.1). The sequence for MTs and GSTs were kindly provided by the group of Dr Nipam Patel (UC Berkeley, USA) from their unpublished bank. Sequences were blasted with NCBI database and were found to have identity with other sequences from different species (e.g. *Drosophila melanogaster*, *Danio rerio*). This information showed strong evidences that GST from *P. hawaiiensis* are part of the GST superfamily, for example. Primers were obtained from Sigma-Aldrich and Exxtend Technologies. Specificity of the amplification product was tested by qPCR. The expected size

of the primer amplicons was verified by agarose gel electrophoresis. Amplicon purity was assumed where a single melting peak was produced. The obtained amplicons were cloned into cloning vectors pGEM-T Vector (Promega) according to manufacturer's protocol and subsequently maintained in *E. coli* cells. The plasmid DNA was removed with GenElute HP Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich) and the DNA concentration was quantified by spectrophotometer (Microplate Spectrophotometer Epoch, BioTek) measurement. DNA were digested with restriction enzymes (ApA and NDE) that was further verified by agarose gel electrophoresis (1%). DNA sequences were sequenced using traditional methods of Sanger sequencing on an ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Sequences obtained were aligned to be compared to the reference sequence.

Table 1 - *Parhyale hawaiiensis* gene specific primer sequences used for quantitative real time PCR.

Gene	Forward (5'–3')	Reverse (5'–3')	Product length (bp)
18S	CGTGAGCACCTATCTAACG	TTCAGCTTTGCAACCAGACT	96
MT1	CGGAGGGTGCAAGATGTA	CGCCCATGATGACAGTCT	74
MT3	GGCAAGATGTACCCTGACCTT	AGTGGCCGGCCTTCTTCT	94
GST1	GCCGATCCTCAGAAGAAAGAAA	CCGTCCGCTTGAAATGCT	70
GST2	TGGCCGGTGATGAAATCTC	GCGGGTTGGTAGAGTTCACAA	61

2.3.2 GENE EXPRESSION - RT-QPCR

Experiments were initially conducted to investigate the expression of target genes when exposed to reference contaminants via water. The expression of the MTs were investigated with three independent experiments with different metals, time of exposure and concentrations. First, 20 neonates (<7 days) were exposed to 0.25 mg L⁻¹ of Zn for 24 h in 100 mL. Subsequently, another experiment was performed using 10 adults exposed to 16 mg L⁻¹ of Zn for 24 h in 100 mL. And finally, 4 adults per treatment were individually exposed to 1 mg L⁻¹ of Cd for 24 and 48 h in 25 mL. Concentrations used in the experiments were based on acute toxicity tests concentrations and were conducted with negative controls in parallel and controlled conditions

of temperature 24 ± 2 °C, salinity 30 ± 2 , photoperiod 12-12h light/dark. The adult organisms used in the experiments were 8 months old and the 1: 1 male/female ratio was adopted.

To analyze the expression of the GSTs, initial experiments (without replicates) were performed with Ag and benzo(a)pyrene (BaP) in water exposure. For the Ag exposure, selected concentrations were 0, 1, 10 and $100 \mu\text{g L}^{-1}$ Ag (AgNO₃, Sigma-Aldrich, $\geq 99\%$) for 8, 24 and 48 h, and 4 adult organisms were exposed in each treatment. For BaP exposure, adult organisms, 4 per treatment, were individually exposed at 0, 0.1 and $1 \mu\text{g L}^{-1}$ of BaP (Sigma-Aldrich) in 100 mL for 8 and 24 h in the absence of light, and a control of dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich, 0.1%), used as solvent, was carried out in parallel.

From the initial results, two other experiments were carried out, a water exposure to BaP and an exposure through contaminated food with AgCl and Ag-NP. For feeding exposure, adults were individually kept in 100 mL culture media (artificial seawater), and were fed every other day with control, AgCl and Ag-NP for 4, 7 and 14 days. After one hour, that the food has been added, organisms were rinsed and placed in new vessels and water to ensure that the uptake of Ag was exclusively by dietary exposure. At the end of the exposure 2 organisms from the same treatment were pooled into one microcentrifuge tube (1:1 sex ratio male/female). For BaP exposure, adult organisms were individually exposed in 100 mL at 0.1, 1 and $1 \mu\text{g L}^{-1}$ of BaP for 8, 24 and 48 h. The exposure conditions were static and were conducted in the absence of light to prevent BaP degradation. The BaP solution was prepared in DMSO and a solvent control was conducted in parallel (0.1%).

Total RNA was extracted using RNAeasy kit (Qiagen) and organisms were mechanically homogenized in RLT buffer according to the manufacturer's protocol. RNA was eluted into 40 μL , and concentration and quality of total RNA was determined by spectrophotometer (Microplate Spectrophotometer Epoch, BioTek). All samples were treated with DNase enzyme (Thermo Fischer) according to the manufacturer's protocol. The concentration of 600 ng was used to synthesize complementary DNA (cDNA) following the manufacturer's protocol (Applied Biosystems). cDNA was synthesized in the following conditions: annealing at 25°C, extending at 37°C and heat-inactivating transcriptase at 85°C (Veriti Thermal Cycler, Applied Biosystems). cDNA was stored at -20°C until quantitative reverse transcriptase-PCR (qRT-PCR) gene expression analysis.

Quantitative real-time PCR (RT-qPCR) was performed using StepOnePlus Real Time PCR System (Applied Biosystems) with 2 μL of cDNA for target gene in a volume of 23 μL containing SYBR® Green (Life Technologies), primers and nuclease free water. Real-time PCR conditions were 95 °C for 10 min and 95 °C for 15 s, 60 °C for 30 s, 72 °C for 30 s for 40

cycles. The efficiency of PCR reaction was calculated from the standard curve by the equation $[(e = 10^{(-1/\text{slope})} - 1) \times 100]$ and efficiency between 90 and 110% was considered acceptable.

Levels of gene expression were expressed as the fold changes relative to the average of the control. Prior to analysis, all data (or log- transformed data) sets were tested for normality and for homogeneity of variances. Only when data were acceptable ANOVA (General Linear Model) was used to test for differences of GST expression across all treatments, and Tukey's post-hoc test was used for multiple comparisons. Data that were not normally distributed were evaluated with non-parametric Kruskal-Wallis test to detect difference among treatments.

2.3.3 GLOBAL GENE EXPRESSION – RNA-SEQ

Adults organisms (8 months-old) were individually kept in 100 mL with artificial seawater in plastic vessels. Organisms were fed every other day for 7 days with control, AgCl and Ag-NP contaminated food. Exposure conditions were determined based on initial experiments (described above). Organisms were left with a pellet of food for 1 hour and then were rinsed and placed in a new vessel and water, to avoid other exposure instead of food. Exposure conditions (temperature, salinity, photoperiod and water quality) were the same as reported for culture. Sex ratio was kept at 1:1 and organisms were separated according to gender to the analysis, because differences between males and females are expected. At the end of the exposure 4 organisms from the same treatment and sex were pooled into one microcentrifuge tube. Three biological replicates for each treatment and sex were provided. Samples were flash frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C.

RNA was extracted using a combined Trizol (Invitrogen) and RNeasy kit(Qiagen) approach. Briefly, trizol procedure was followed through the phase separation, and the aqueous phase was treated as lysate in the early steps of the RNeasy (Qiagen) procedure from animal tissue. RNA was quantified using a spectrophotometer (Microplate Spectrophotometer Epoch, BioTek), and checked for integrity using a Bioanalyzer (Agilent).

Libraries were constructed following Illumina TruSeq Stranded mRNA LT Sample Prep Protocol and sequenced on Illumina HiSeq 2500 Flow Cell v4 with HiSeq SBS Kit v4 using 100 paired end reads (100 bp). Data analysis comprised the following steps: de novo assembly and annotation of illumina sequencing data, differential expression library construction, gene expression profile sequencing and annotation and analysis of differentially expressed genes.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 METALLOTHIONEINS

Metallothioneins are proteins involved in detoxification of metals and well recognized to be a biomarker of metal exposure (CORREIA et al., 2002, 2004). many isoforms of MTs coexist within organisms and functions that can be different among isoforms (Amiard et al., 2006). Two MT genes were investigated, MT1 gene was not amplified in our conditions and MT3 presented high cycle threshold (Ct) values, indicating low amounts of transcripts in our samples that were also not induced by our treatment conditions. Amiard et al. (2006) reported that contrary to general hypothesis metals did not induce MT synthesis in invertebrates. Also, the role of MT induction is dependent to the metal, biological characteristics of the organisms and exposure duration (AMIARD et al., 2006). In *P. hawaiiensis*, further investigation of MT genes is necessary to understand their role in metal detoxification.

3.2 GLUTATHIONE S-TRANSFERASE

GST superfamily is responsive to several contaminants, including metals and BaP (LEE et al., 2008; REN; PAN; WANG, 2015). GSTs are highly diverse, and can be divided into three classes based on their cellular location (cytosolic, mitochondrial and microsomal) (SHEEHAN et al., 2001; RONCALLI et al., 2015). The cytosolic class, which is primarily involved in cellular detoxification (CHE-MENDOZA; PENILLA; RODRÍGUEZ, 2009), contains seven sub-classes (Delta, Epsilon, Omega, Sigma, Theta, Mu and Zeta). Members of the Delta and Epsilon subclasses have been implicated in resistance to pesticides, e.g., organophosphates, organochlorines and pyrethroids (ENAYATI; RANSON; HEMINGWAY, 2005), while the Omega, Theta and Zeta sub-groups appear to be involved in other cellular processes, including protection against oxidative stress (MCLELLAN; WOLF, 1999). Genomic data from insects, including *Drosophila melanogaster* and *Anopheles gambiae*, suggest the presence of 30 or more genes in the GST superfamily (ENAYATI; RANSON; HEMINGWAY, 2005). Previous study reported the expression of 10 GSTs genes in the copepod *T. japonicus*, and sigma class was highly regulated in trace metals exposure to the copepod (LEE et al., 2008).

The GST sequences investigated in this study were blasted at NCBI database and GST1 and GST2 has similarities with delta and theta superfamily, respectively. They were investigated in this study along with the reference gene 18S and successfully amplified. The efficiency of each primer was determined, and it was 96 %, 93 % and 103 % for 18S, GST1 and GST2, respectively. Sequences obtained from our RT-qPCR analysis were confirmed by

size in agarose gel electrophoresis (Figure 1) and sequencing analysis (Table 2). Small differences in 18S and GST1 were observed and could be explained by differences between organisms' cultures. In the initial experiments with Ag water exposure differences between treatment and controls were observed (data not shown). Because of these promising results feeding experiments were conducted with AgCl and Ag-NP but no significant differences ($p < 0.05$) were obtained for both genes (Figure 2). When we tested BaP in water, also known to be induced by GSTs, no significant differences were observed ($p < 0.05$) (Figure 3).

Figure 1 - PCR products from 18S, GST1 and GST2 genes used for DNA cloning and sequencing.

Source: Figure prepared by the author (2018)

Table 2 - Comparison among reference (subject) and sequenced genes (query) from the 18S, GST1 and GST2 genes from *P. hawaiiensis* (underlined – forward and reverse primer; red and underlined – differences between sequences).

Gene	Sequence	Sequences
18 S	Subject	<u>CGTGAGCACCTATCTAACGGGCTCGGCGGGCAGCTCC</u> <u>TTT</u> CTACCGGGAAACCAGAG <u>A</u> TTTATGGGTTCCGGGGG <u>GAGTCTGGTTGCAAAGCTGA</u>
	Query - R	<u>CGTGAGCACCTATCTAACGGGCTCGGCGGGCAGCTCC</u> T <u>CA</u> CTACCGGGAAACCAGAGTTTATGGGTTCCGGGGGG <u>AGTCTGGTTGCAAAGCTGA</u>
	Query - F	<u>CGTGAGCACCTATCTAACGGGCTCGGCGGGCAGCTCC</u> T <u>CA</u> CTACCGGGAAACCAGAGTTTATGGGTTCCGGGGGG <u>AGTCTGGTTGCAAAGCTGA</u>
GST1	Subject	<u>GCCGATCCTCAGAAGAAAGAAAAGCTGCACGAA</u> <u>A</u> CCAT <u>CGACAAGCTGGAGCAGCATTTC</u> AAGCGGACGG
	Query - F	<u>GCCGATCCTCAGAAGAAAGAAAAGCTGCACGAA</u> <u>G</u> CCAT <u>CGACAAGCTGGAGCAGCATTTC</u> AAGCGGACGG
	Query - R	<u>GCCGATCCTCAGAAGAAAGAAAAGCTGCACGAA</u> <u>G</u> CCAT <u>CGACAAGCTGGAGCAGCATTTC</u> AAGCGGACGG
GST2	Subject	<u>TGGCCGGTGATGAAATCTCTGTTGCTGACATCATTGCTC</u> <u>TTTGTGAACTCTACCAACCCGC</u>
	Query - R	<u>TGGCCGGTGATGAAATCTCTGTTGCTGACATCATTGCTC</u> <u>TTTGTGAACTCTACCAACCCGC</u>
	Query - F	<u>TGGCCGGTGATGAAATCTCTGTTGCTGACATCATTGCTC</u> <u>TTTGTGAACTCTACCAACCCGC</u>

Figure 2 - Relative fold change of GST1 and GST2 genes in adults of *P. hawaiiensis* fed with control, AgCl and Ag-NP contaminated foods for 4, 7 and 14 days.

Source: Figure prepared by the author (2018)

Figure 3 - Relative fold change of GST1 and GST2 genes in adults of *P. hawaiiensis* exposed to 0.1 and 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ of benzo(a)pyrene (BaP) for 8, 24 and 48 hours.

Source: Figure prepared by the author (2018)

This finding is consistent with that of Bebianno et al. (2015) who reported no significant changes in gene transcription profiles after exposure of the mussel *Mytilus galloprovincialis* to Ag-NPs for 15 days. Moreover, the activity and gene expression of GST were assessed in the brain of fishes in response to 15-day water exposure to Ag-NPs at 2 mg L^{-1} and 4 mg L^{-1} and authors reported that GST activity and expression were reduced only at higher concentrations (AFIFI; SADDICK; ABU ZINADA, 2016). Lee et al. (2012) also investigated GST activity in

fish with different concentrations of Ag-NPs, in several tissues and time of exposure, and a great variation in GST activity were observed among time, exposure concentration and tissues. Previous study reviewed the role of GST and other enzymes as biomarkers and suggested that several factors must be considered when measuring GST, such as endogenous characteristic of the specimens (e.g. age, gender, moult and reproduction stage), characteristic of the specie (e.g. physiology, anatomy) and maintenance in the laboratory (abiotic conditions, feeding rate, period of maintenance) (JEMEC et al., 2010). Therefore, due to the great number and specificities of GST enzymes, and the many factors that may alter their regulation, further studies are needed to investigate the role of GST in detoxification of *P. hawaiiensis*

3.3 GLOBAL GENE EXPRESSION – RNA-SEQ

Transcriptomic analysis using RNA-seq were successfully conducted with organisms fed with AgCl and Ag-NP, and highlighted differences between males and females responses. Paired comparisons of; (i) AgCl vs. control yielded 25 and 235 transcripts in females and males, respectively; with no shared genes (ii) Ag-NP vs. control showed 264 and 363 transcripts in females and males, respectively; with 75 shared genes (Figure 4). Differences in antitoxic defenses according to gender was previously reported in the literature. Authors reported that females amphipods were less sensitive to cadmium than males and this result was attributed to a better mobilization of antitoxic defenses in females (GISMONDI; COSSU-LEGUILLE; BEISEL, 2013).

Figure 4 - Numbers of genes in each gender and treatment that differed significantly from the control. Numbers that fall into both circle were common to both gender. Upward green arrows represent up-regulated genes and downward red arrows the down-regulated genes.

Source: Figure prepared by the author (2018)

Paired comparisons of; (i) AgCl vs. control in females yielded 2 down-regulated and 23 up-regulated transcripts; (ii) Ag-NPs vs. control in females resulted in 118 down-regulated and 221 up-regulated transcripts; and (iii) AgCl vs. control in males revealed 207 down-regulated and 28 up-regulated transcripts; (iv) Ag-NP vs. control in males showed 381 down-regulated and 57 up-regulated transcripts (Figure 5). Higher number of differentially expressed genes were obtained for Ag-NP treatment in both gender. The comparison of significant genes, in relation to the control, in females exposed to Ag-NPs and AgCl, indicated a small degree of overlap, with 11 genes shared between the two gene lists. Conversely, males indicated higher overlap with 170 shared genes between treatments (Figure 5).

Figure 5 - Numbers of genes in each treatment that differed significantly from the control. Numbers that fall into both circle were common to both treatment. Upward green arrows represent up-regulated genes and downward red arrows the down-regulated genes.

Source: Figure prepared by the author (2018)

Genes that were differently expressed when compared to control, were selected and functions investigated at UniProt database (BATEMAN et al., 2017). Unfortunately, not all of the genes have been already characterized in the literature, and just identified genes were selected and summarized in Table 3. Analysis highlighted commonly affected pathways for AgCl and Ag-NPs exposure. Common significant changes were observed in genes related to structural related proteins, metal binding and transport, digestion and nutrient absorption and immune function. Structural gene related to cuticle protein were the most abundant group and were observed in both gender, but genes such pupal cuticle protein and cuticle protein 19 were just found in females. Common significant changes in structural gene such as chitinase were observed in both gender and treatments. These results corroborate the findings of previous studies. Poynton et al. (2013) reported that three sequences with high similarity to cuticular genes were differentially expressed in *Hyalella azteca* exposed to Zn. This finding is also consistent with previous study that showed that Zn^{2+} and ZnO NP exposure affects the expression of chitinase and cuticular proteins in *Daphnia magna* (POYNTON et al., 2007). Exoskeleton maintenance is essential for arthropod growth and moult process and the downregulation of the chitinase gene suggests that treatment is interfering in these mechanisms. Furthermore, xenobiotic inhibiting chitinase activity was already reported in the literature (ZOU; BONVILLAIN, 2004; POYNTON et al., 2007).

Table 3 - Predicted function of differentially expressed genes after feeding exposure to AgCl and Ag-NP. Numbers highlighted in red or green represent sequences that were significantly up-regulated (green) or down-regulated (red) by the treatment.

		Treatment - Fold Change			
Sequence ID	Predicted Function	AgCl Female	Ag-NP Female	AgCl Male	Ag-NP Male
<u>Structural related</u>					
phaw_30_tra_m.010726	pupal cuticle protein Edg-84A-like	7			
phaw_30_tra_m.014722	cuticle protein 19	12	9		
phaw_30_tra_m.003362	larval cuticle protein LCP-17-like			-10	
phaw_30_aug_m.026866	acidic mammalian chitinase-like		-6	-9	-7
phaw_30_tra_m.006040	chitinase-3-like protein 1 isoform X3			-5	-6
phaw_30_tra_m.016319	chitinase-3-like protein 1 isoform X3		-5	-7	-8
phaw_30_tra_m.012871	chitinase-3-like protein 1			-6	
phaw_30_tra_m.026002	peritrophic membrane chitin binding protein 2		-4	-6	-7
<u>Metal binding and transport</u>					
phaw_30_tra_m.018011	zinc metalloproteinase nas-4-like		-4	-7	-8
phaw_30_tra_m.013160	venom metalloproteinase 2-like	22	22		
<u>Immune function</u>					
phaw_30_tra_m.000640	GILT-like protein 1		-5	-5	-8
<u>Protease</u>					
phaw_30_aug_m.028418	transmembrane protease serine 9-like		-5	-8	-7
phaw_30_tra_m.004203	lysosomal aspartic protease			-4	-7
phaw_30_tra_m.011852	serine protease 4				-2
<u>Digestion and nutrient absorption</u>					
phaw_30_tra_m.008053	endo-beta-1,4-glucanase		-4	-9	-9
phaw_30_tra_m.007430	beta-1,3-glucanase		-3	-4	-4
phaw_30_aug_m.027240	cellulase		-4	-6	-9
<u>Other functions</u>					
phaw_30_tra_m.020297	aquaporin 2	2	2		
phaw_30_tra_m.002964	brachyurin-like		-4	-9	-9
phaw_30_tra_m.016430	cytochrome p450		-3	-7	-4
phaw_30_tra_m.007246	pro-resilin-like				-9
phaw_30_tra_m.004675	pro-resilin-like				-7
phaw_30_tra_m.004301	pro-resilin-like				-20
phaw_30_tra_m.001028	estrogen sulfotransferase		8		
phaw_30_tra_m.018618	hemocyanin subunit type 1		-5	-7	-7
phaw_30_tra_m.011599	apolipoprotein D-like		-5	-9	-9
phaw_30_tra_m.001580	apolipoprotein D-like precursor				-16
phaw_30_tra_m.021226	neprilysin-11-like		-5	-5	-7

Differences in the transcriptional effects between Ag-NP and AgCl exposures were also revealed in our analysis (Table 3). Females exposed to Ag-NPs showed the upregulation of estrogen sulfotransferase that was not observed in AgCl. Genes down-regulated in Ag-NP exposure included larval cuticle protein, serine protease and pro-resilin for males that were not observed in AgCl. Therefore, these highlighted genes, their function and role in antitoxic defense in *P. hawaiiensis* needs to be further investigated.

Corroborating with our study, Poynton et al. (2013) investigated molecular effects in the freshwater amphipod *Hyalella azteca* and showed that ZnSO₄ and ZnO NPs have similar effects

on gene expression, suggesting that ZnO NPs and Zn^{2+} , act through a similar mechanism. However, authors hypothesized that the ZnO NPs provide an enhanced exposure route for Zn^{2+} and facilitate their uptake into the amphipods. A possible mechanism for this enhanced exposure could be that the feeding behavior of *H. azteca* causes them to take up and absorb ZnO NPs to a greater extent than Zn^{2+} . Dissolution of the particles could then occur in the gut of amphipod or within cellular compartments such that cellular toxicity ultimately results from the Zn ions, resulting in gene expression profiles that are similar to ZnSO_4 . The latter possibility is similar to the Trojan-horse mechanism proposed for Ag-NPs (PARK et al., 2010). Trojan-horse mechanism that seems to operate in the way that allows H_2O_2 to react with Ag-NPs to form more free moving Ag inside the cells (HSIAO et al., 2015). Thus, the generation of oxidative stress by over production of ROS has been suggested as the major event responsible for DNA damages, activation of antioxidant enzymes and depletion of antioxidant molecules, and binding and disabling of proteins (MAGESKY; PELLETIER, 2018).

Considering that feeding exposure is more representative and could reveal more about NPs effects and mode of action, Vannuci et al. (2018, in preparation) compared the concentration of Ag in the hemolymph of *P. hawaiiensis* fed with AgCl and Ag-NP after 7, 14 and 21 days. Both treatments showed an increase of Ag concentration, in relation to the control, with duration of exposure. However, the maximum concentration of Ag determined in the hemolymph of Ag-NP treatment was twice the concentration in AgCl exposure. This finding also corroborates with our results, showing that Ag was internalized in both forms, explaining similar molecular responses, but also highlighted an increase in Ag concentration by Ag-NP exposure, that can explain the differences observed. We hypothesized that differences in NP internalization and Trojan-horse mechanism are responsible to the observed effects.

Further analysis is underway to understand the different responses to AgCl and Ag-NP, and the role of differentiated genes. These results can contribute to reveal potential biomarkers to differentiate Ag-NP and AgCl in adults of *P. hawaiiensis*. Additionally, RNA-seq analysis confirmed that GST and MT genes were not differently expressed in our experiment condition corroborating with RT-qPCR results. Thus, more studies are necessary to investigate the role of GST and MT genes in *P. hawaiiensis*.

4 CONCLUSIONS

This is the first work that analyzed molecular biomarkers of Ag-NP exposure via feeding in marine amphipods. Selected target genes, MTs and GSTs, analyzed by RT-qPCR were not successful to detect differences between AgCl and Ag-NP feeding exposure treatments. Global

gene expression (RNA-seq) highlighted differences between males and females as well as AgCl and Ag-NP treatments. Comparison analysis revealed common genes expressed in both Ag forms, but also showed differences in Ag-NP treatment with both up and down regulated genes. RNA-seq results corroborate with RT-qPCR analysis since the investigated target genes (MTs and GSTs) were not differentially expressed. Analysis are underway to better understand toxicity responses pathways and global gene expression results can contribute to reveal good biomarkers to differentiate Ag-NP and AgCl in adults of *P. hawaiiensis*.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was founded by “Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo” (FAPESP Process: 2014/ 08829-7), “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico” (CNPq-PVE Process: 400362/2014-7) and “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior” (CAPES). The author thanks Dr Nipam Patel and his group for gently provide gene sequences. We thank Dr. Melanie Eldridge for first steps in the qRT-PCR protocols.

5 REFERENCES

- AFIFI, M.; SADDICK, S.; ABU ZINADA, O. A. Toxicity of silver nanoparticles on the brain of *Oreochromis niloticus* and *Tilapia zillii*. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 23, n. 6, p. 754–760, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.06.008>>.
- AMIARD, J. C.; AMIARD-TRIQUET, C.; BARKA, S.; PELLERIN, J.; RAINBOW, P. S. Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. **Aquatic Toxicology**, v. 76, n. 2, p. 160–202, 2006.
- ARCE FUNCK, J.; DANGER, M.; GISMONDI, E.; COSSU-LEGUILLE, C.; GUÉROLD, F.; FELTEN, V. Behavioural and physiological responses of *Gammarus fossarum* (Crustacea Amphipoda) exposed to silver. **Aquatic Toxicology**, v. 142–143, p. 73–84, 2013.
- ARTAL, M. C.; DOS SANTOS, A.; HENRY, T. B.; UMBUZEIRO, G. D. A. Development of an acute toxicity test with the tropical marine amphipod *Parhyale hawaiiensis*. **Ecotoxicology**, v. 27, n. 2, p. 103–108, 15 mar. 2018. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10646-017-1875-3>>.
- BATEMAN, A.; MARTIN, M. J.; O'DONOVAN, C.; MAGRANE, M.; ALPI, E.; ANTUNES, R.; BELY, B.; BINGLEY, M.; BONILLA, C.; BRITTO, R.; BURSTEINAS, B.; BYE-AJEE, H.; COWLEY, A.; DA SILVA, A.; DE GIORGI, M.; DOGAN, T.; FAZZINI, F.; CASTRO, L. G.; FIGUEIRA, L.; GARMIRI, P.; GEORGHIOU, G.; GONZALEZ, D.; HATTON-ELLIS, E.; LI, W.; LIU, W.; LOPEZ, R.; LUO, J.; LUSSI, Y.; MACDOUGALL, A.; NIGHTINGALE, A.; PALKA, B.; PICHLER, K.; POGGIOLI, D.; PUNDIR, S.; PUREZA, L.; QI, G.; ROSANOFF, S.; SAIDI, R.; SAWFORD, T.; SHYPITSYNA, A.; SPERETTA, E.; TURNER, E.; TYAGI, N.; VOLYNKIN, V.; WARDELL, T.; WARNER, K.; WATKINS, X.; ZARU, R.; ZELLNER, H.; XENARIOS, I.; BOUGUELERET, L.; BRIDGE, A.; POUX, S.; REDASCHI, N.; AIMO, L.; ARGOUDPUY, G.; AUCHINCLOSS, A.; AXELSEN, K.; BANSAL, P.; BARATIN, D.; BLATTER, M. C.; BOECKMANN, B.; BOLLEMAN, J.; BOUTET, E.; BREUZA, L.; CASAL-CASAS, C.; DE CASTRO, E.; COUDERT, E.; CUCHE, B.; DOCHE, M.; DORNEVIL, D.; DUVAUD, S.; ESTREICHER, A.; FAMIGLIETTI, L.; FEUERMAN, M.; GASTEIGER, E.; GEHANT, S.; GERRITSEN, V.; GOS, A.; GRUAZ-GUMOWSKI, N.; HINZ, U.; HULO, C.; JUNGO, F.; KELLER, G.; LARA, V.; LEMERCIER, P.; LIEBERHERR, D.; LOMBARDOT, T.; MARTIN, X.; MASSON, P.; MORGAT, A.; NETO, T.; NOUSPIKEL, N.; PAESANO, S.; PEDRUZZI, I.; PILBOUT, S.; POZZATO, M.; PRUESS, M.; RIVOIRE, C.; ROECHERT, B.; SCHNEIDER, M.; SIGRIST, C.; SONESSON, K.; STAEHLI, S.; STUTZ, A.; SUNDARAM, S.; TOGNOLLI, M.; VERBREGUE, L.; VEUTHEY, A. L.; WU, C. H.; ARIGHI, C. N.; ARMINSKI, L.; CHEN, C.; CHEN, Y.; GARAVELLI, J. S.; HUANG, H.; LAIHO, K.; MCGARVEY, P.; NATALE, D. A.; ROSS, K.; VINAYAKA, C. R.; WANG, Q.; WANG, Y.; YEH, L. S.; ZHANG, J. UniProt: The universal protein knowledgebase. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. D1, p. D158–D169, 2017.
- BEBIANNO, M. J.; GONZALEZ-REY, M.; GOMES, T.; MATTOS, J. J.; FLORES-NUNES, F.; BAINY, A. C. D. Is gene transcription in mussel gills altered after exposure to Ag nanoparticles? **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, p. 17425–17433, 2015.
- BRADFORD, A.; HANDY, R. D.; READMAN, J. W.; ATFIELD, A.; MÜHLING, M. Impact of Silver Nanoparticle Contamination on the Genetic Diversity of Natural Bacterial Assemblages in Estuarine Sediments. **Environmental Science & Technology**, v. 43, n. 12, p. 4530–4536, 15 jun. 2009.
- CHE-MENDOZA, A.; PENILLA, R. P.; RODRÍGUEZ, D. A. Insecticide resistance and

glutathione S-transferases in mosquitoes : A review. **Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 8, p. 1386–1397, 2009.

CORREIA, A. D.; SOUSA, A.; COSTA, M. H.; MOURA, I.; LIVINGSTONE, D. R. Quantification of metallothionein in whole body gammarus locusta (crustacea : amphipoda) using differential pulse polarography. **Toxicological and Environmental Chemistry**, v. 86, n. 1, p. 23–36, 2004.

CORREIA, a. D.; COSTA, M. H.; RYAN, K. P.; NOTT, J. a. Studies on biomarkers of copper exposure and toxicity in the marine amphipod Gammarus locusta (Crustacea): I. Copper-containing granules within the midgut gland. **Journal of the Marine Biological Association of the UK**, v. 82, n. 5, p. 827–834, out. 2002.

ENAYATI, A. A.; RANSON, H.; HEMINGWAY, J. Insect glutathione transferases and insecticide resistance. **Insect Molecular Biology**, v. 14, n. 1, p. 3–8, 2005.

FABREGA, J.; LUOMA, S. N.; TYLER, C. R.; GALLOWAY, T. S.; LEAD, J. R. Silver nanoparticles: behaviour and effects in the aquatic environment. **Environment international**, v. 37, n. 2, p. 517–31, fev. 2011.

FAIRBAIRN, E. A.; KELLER, A. A.; MÄDLER, L.; ZHOU, D.; POKHREL, S.; CHERR, G. N. Metal oxide nanomaterials in seawater: linking physicochemical characteristics with biological response in sea urchin development. **Journal of hazardous materials**, v. 192, n. 3, p. 1565–71, 15 set. 2011.

GISMONDI, E.; COSSU-LEGUILLE, C.; BEISEL, J. N. Do male and female gammarids defend themselves differently during chemical stress? **Aquatic Toxicology**, v. 140–141, p. 432–438, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.07.006>>.

HEINLAAN, M.; KAHRU, A.; KASEMETS, K.; ARBEILLE, B.; PRENSIER, G.; DUBOURGUIER, H.-C. Changes in the Daphnia magna midgut upon ingestion of copper oxide nanoparticles: A transmission electron microscopy study. **Water Research**, v. 45, n. 1, p. 179–190, jan. 2011.

HSIAO, I. L.; HSIEH, Y. K.; WANG, C. F.; CHEN, I. C.; HUANG, Y. J. Trojan-horse mechanism in the cellular uptake of silver nanoparticles verified by direct intra- and extracellular silver speciation analysis. **Environmental Science and Technology**, v. 49, n. 6, p. 3813–3821, 2015.

JACKSON, B. P.; BUGGE, D.; RANVILLE, J. F.; CHEN, C. Y. Bioavailability, toxicity, and bioaccumulation of quantum dot nanoparticles to the amphipod Leptocheirus plumulosus. **Environmental science & technology**, v. 46, n. 10, p. 5550–6, 15 maio 2012.

JEMEC, A.; DROBNE, D.; TIŠLER, T.; SEPČIĆ, K. Biochemical biomarkers in environmental studies-lessons learnt from enzymes catalase, glutathione S-transferase and cholinesterase in two crustacean species. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 17, n. 3, p. 571–581, 2010.

KELLER, A. A.; WANG, H.; ZHOU, D.; LENIHAN, H. S.; CHERR, G.; CARDINALE, B. J.; MILLER, R.; JI, Z. Stability and aggregation of metal oxide nanoparticles in natural aqueous matrices. **Environmental science & technology**, v. 44, n. 6, p. 1962–7, 15 mar. 2010.

LEE, B.; DUONG, C. N.; CHO, J.; LEE, J.; KIM, K.; SEO, Y.; KIM, P.; CHOI, K.; YOON, J. Toxicity of citrate-capped silver nanoparticles in common carp (Cyprinus carpio). **Journal of**

Biomedicine and Biotechnology, v. 2012, 2012.

LEE, K. W.; RAISUDDIN, S.; RHEE, J. S.; HWANG, D. S.; YU, I. T.; LEE, Y. M.; PARK, H. G.; LEE, J. S. Expression of glutathione S-transferase (GST) genes in the marine copepod *Tigriopus japonicus* exposed to trace metals. **Aquatic Toxicology**, v. 89, n. 3, p. 158–166, 2008.

LEVAR, C.; HOTZE, E. M.; LOWRY, G. V.; BROWN, G. E. Environmental transformations of silver nanoparticles: impact on stability and toxicity. **Environmental science & technology**, v. 46, n. 13, p. 6900–14, 3 jul. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22339502>>.

MAGESKY, A.; PELLETIER, É. Cytotoxicity and Physiological Effects of Silver Nanoparticles on Marine Invertebrates. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 1048, p. 285–309, 2018. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-72041-8_17><<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29453545>>.

MATTSSON, K.; ADOLFSSON, K.; EKVALL, M. T.; BORGSTRÖM, M. T.; LINSE, S.; HANSSON, L.-A.; CEDERVALL, T.; PRINZ, C. N. Translocation of 40 nm diameter nanowires through the intestinal epithelium of *Daphnia magna*. **Nanotoxicology**, n. May, 2016.

MCLELLAN, L. I.; WOLF, C. R. Glutathione and glutathione-dependent enzymes in cancer drug resistance. **Drug Resistance Updates**, v. 2, p. 153–164, 1999.

MERRIFIELD, D. L.; SHAW, B. J.; HARPER, G. M.; SAOUD, I. P.; DAVIES, S. J.; HANDY, R. D.; HENRY, T. B. Ingestion of metal-nanoparticle contaminated food disrupts endogenous microbiota in zebrafish (*Danio rerio*). **Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)**, v. 174, p. 157–63, mar. 2013.

NOVO, M.; LAHIVE, E.; DÍEZ-ORTIZ, M.; MATZKE, M.; MORGAN, A. J.; SPURGEON, D. J.; SVENDSEN, C.; KILLE, P. Different routes , same pathways : Molecular mechanisms under silver ion and nanoparticle exposures in the soil sentinel *Eisenia fetida*. **Environmental Pollution**, v. 205, p. 385–393, 2015.

PARK, E. J.; YI, J.; KIM, Y.; CHOI, K.; PARK, K. Silver nanoparticles induce cytotoxicity by a Trojan-horse type mechanism. **Toxicology in Vitro**, v. 24, n. 3, p. 872–878, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2009.12.001>>.

PIÑA, B.; CASADO, M.; QUIRÓS, L. Analysis of gene expression as a new tool in ecotoxicology and environmental monitoring. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 11, p. 1145–1154, 2007.

POYNTON, H. C.; LAZORCHAK, J. M.; IMPELLITTERI, C. A.; BLALOCK, B. J.; ROGERS, K.; ALLEN, H. J.; LOGUINOV, A.; HECKMAN, J. L.; GOVINDASMAWY, S. Toxicogenomic responses of nanotoxicity in *Daphnia magna* exposed to silver nitrate and coated silver nanoparticles. **Environmental Science and Technology**, v. 46, n. 11, p. 6288–6296, 2012.

POYNTON, H. C.; LAZORCHAK, J. M.; IMPELLITTERI, C. A.; BLALOCK, B.; SMITH, M. E.; STRUEWING, K.; UNRINE, J.; ROOSE, D. Toxicity and transcriptomic analysis in *Hyalella azteca* suggests increased exposure and susceptibility of epibenthic organisms to zinc oxide nanoparticles. **Environmental Science and Technology**, v. 47, n. 16, p. 9453–9460, 2013.

POYNTON, H. C.; LAZORCHAK, J. M.; IMPELLITTERI, C. A.; SMITH, M. E.; ROGERS,

K.; PATRA, M.; HAMMER, K. A.; ALLEN, H. J.; VULPE, C. D. Differential gene expression in *Daphnia magna* suggests distinct modes of action and bioavailability for ZnO nanoparticles and Zn ions. **Environmental science & technology**, v. 45, n. 2, p. 762–8, 15 jan. 2011.

POYNTON, H. C.; VARSHAVSKY, J. R.; CHANG, B.; CAVIGIOLIO, G.; CHAN, S.; HOLMAN, P. S.; LOGUINOV, A. V.; BAUER, D. J.; KOMACHI, K.; THEIL, E. C.; PERKINS, E. J.; HUGHES, O.; VULPE, C. D. *Daphnia magna* Ecotoxicogenomics Provides Mechanistic Insights into Metal Toxicity. **Environmental Science & Technology**, v. 41, n. 3, p. 1044–1050, fev. 2007. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es0615573>>.

RATTE, H. T. Bioaccumulation and toxicity of silver compounds: a review. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 18, n. 1, p. 89–108, 1999.

REN, X.; PAN, L.; WANG, L. Toxic effects upon exposure to benzo[a]pyrene in juvenile white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 39, n. 1, p. 194–207, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2014.08.006>>.

RONCALLI, V.; CIESLAK, M. C.; PASSAMANECK, Y.; CHRISTIE, A. E.; LENZ, P. H. Glutathione S-transferase (GST) gene diversity in the crustacean *Calanus finmarchicus* - Contributors to cellular detoxification. **PLoS ONE**, v. 10, n. 5, p. 1–27, 2015.

SHEEHAN, D.; MEADE, G.; FOLEY, V. M.; DOWD, C. a. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. **Society**, v. 16, p. 1–16, 2001.

WIJNHOFEN, S. W. P.; PEIJNENBURG, W. J. G. M.; HERBERTS, C. A.; HAGENS, W. I.; OOMEN, A. G.; HEUGENS, E. H. W.; ROSZEK, B.; BISSCHOPS, J.; GOSENS, I.; VAN DE MEENT, D.; DEKKERS, S.; DE JONG, W. H.; VAN ZIJVERDEN, M.; SIPS, A. J. A. M.; GEERTSMA, R. E. Nano-silver – a review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment. **Nanotoxicology**, v. 3, n. 2, p. 109–138, jan. 2009.

ZOU, E.; BONVILLAIN, R. Chitinase activity in the epidermis of the fiddler crab, *Uca pugilator*, as an in vivo screen for molt-interfering xenobiotics. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 139, n. 4, p. 225–230, 2004.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Um protocolo de cultivo de *P. hawaiiensis* foi desenvolvido com sucesso em condições padronizadas, viabilizando o uso da espécie para testes em laboratório.

- O protocolo de teste de toxicidade aguda desenvolvido tem grande potencial para ser empregado tanto em substâncias químicas, misturas ou amostras ambientais e por ser miniaturizado oferece vantagens como a redução de custos e a quantidade de amostra necessária para teste, e redução dos resíduos gerados no laboratório.

- A sensibilidade de neonatos de *P. hawaiiensis* para os metais estudados e amônia foi similar à de outros anfípodes, fazendo da espécie uma opção promissora para estudos ecotoxicológicos em regiões circuntropicais.

- Procedimentos foram estabelecidos para caracterizar a expressão gênica utilizando RT-qPCR em adultos de *P. hawaiiensis*, entretanto, os genes investigados (MTs e GSTs) não foram diferencialmente expressos nas condições testadas.

- A expressão gênica global (RNA-seq) foi conduzida com sucesso e destacou diferenças na resposta de expressão gênica entre machos e fêmeas, bem como os tratamentos com AgCl e Ag-NP.

- A análise comparativa revelou genes comuns entre as duas formas de Ag estudadas, mas também mostrou respostas diferentes no tratamento com Ag-NP, portanto, diferentes efeitos adversos são esperados após a exposição à alimentação e podem ser usados como biomarcadores.

- Os genes-alvo investigados, MTs e GSTs, por RT-qPCR não foram também expressos diferencialmente nos dados obtidos por RNA-seq, corroborando com os resultados obtidos.

- Este trabalho demonstrou que *P. hawaiiensis* é um organismo versátil e um modelo adequado para estudos ecotoxicológicos, e os protocolos desenvolvidos serão referência em futuros estudos com essa espécie.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARNARD, L. Marine amphipoda of atolls in micronesia. **Proceedings of the United States National Museum**, v. 117, n. 2578, p. 1–96, 1965.
- BRADFORD, A.; HANDY, R. D.; READMAN, J. W.; ATFIELD, A.; MÜHLING, M. Impact of Silver Nanoparticle Contamination on the Genetic Diversity of Natural Bacterial Assemblages in Estuarine Sediments. **Environmental Science & Technology**, v. 43, n. 12, p. 4530–4536, 15 jun. 2009.
- CBD. **Convention on Biological Diversity. Conference of the Parties established in 2010 Strategic Plan for Biodiversity 2011-2020, including Aichi Biodiversity**. Disponível em: <<https://www.cbd.int/sp/>>.
- CHAPMAN, P. M. Future challenges for marine pollution monitoring and assessment. **Marine Pollution Bulletin**, v. 95, n. 1, p. 1–2, 2015.
- FABREGA, J.; LUOMA, S. N.; TYLER, C. R.; GALLOWAY, T. S.; LEAD, J. R. Silver nanoparticles: behaviour and effects in the aquatic environment. **Environment international**, v. 37, n. 2, p. 517–31, fev. 2011.
- FAIRBAIRN, E. A.; KELLER, A. A.; MÄDLER, L.; ZHOU, D.; POKHREL, S.; CHERR, G. N. Metal oxide nanomaterials in seawater: linking physicochemical characteristics with biological response in sea urchin development. **Journal of hazardous materials**, v. 192, n. 3, p. 1565–71, 15 set. 2011.
- FLYNN, M. N.; WAKABARA, Y.; TARARAM, A. S. Macrobenthic associations of the lower and upper marshes of a tidal flat colonized by *Spartina alterniflora* in Cananeia Lagoon estuarine region (Southeastern Brazil). **Bulletin of Marine Science**, v. 63, n. 2, p. 427–442, 1998.
- FRASER, T. W. K.; REINARDY, H. C.; SHAW, B. J.; HENRY, T. B.; HANDY, R. D. Dietary toxicity of single-walled carbon nanotubes and fullerenes (C60) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Nanotoxicology**, v. 5, n. 1, p. 98–108, 2011.
- GERANIO, L.; HEUBERGER, M.; NOWACK, B. The behavior of silver nanotextiles during washing. **Environmental Science and Technology**, v. 43, n. 21, p. 8113–8118, 2009.
- HOARAU, P.; DAMIENS, G.; ROMÉO, M.; GNASSIA-BARELLI, M.; BEBIANNO, M. J. Cloning and expression of a GST-pi gene in *Mytilus galloprovincialis*. Attempt to use the GST-pi transcript as a biomarker of pollution. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 143, n. 2, p. 196–203, 2006.
- HOLTZ, R. D.; LIMA, B. a; SOUZA FILHO, A. G.; BROCCHI, M.; ALVES, O. L. Nanostructured silver vanadate as a promising antibacterial additive to water-based paints. **Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine**, v. 8, n. 6, p. 935–40, ago. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22197722>>. Acesso em: 6 mar. 2013.
- KAO, D.; LAI, A. G.; STAMATAKI, E.; ROSIC, S.; KONSTANTINIDES, N.; JARVIS, E.; DI DONFRANCESCO, A.; POUCHKINA-STANCHEVA, N.; SÉMON, M.; GRILLO, M.; BRUCE, H.; KUMAR, S.; SIWANOWICZ, I.; LE, A.; LEMIRE, A.; EISEN, M. B.; EXTAVOUR, C.; BROWNE, W. E.; WOLFF, C.; AVEROF, M.; PATEL, N. H.; SARKIES, P.; PAVLOPOULOS, A.; ABOOBAKER, A. The genome of the crustacean *Parhyale hawaiiensis*, a model for animal development, regeneration, immunity and lignocellulose

digestion. **eLife**, v. 5, p. 65789, 16 nov. 2016.

KELLER, A. A.; WANG, H.; ZHOU, D.; LENIHAN, H. S.; CHERR, G.; CARDINALE, B. J.; MILLER, R.; JI, Z. Stability and aggregation of metal oxide nanoparticles in natural aqueous matrices. **Environmental science & technology**, v. 44, n. 6, p. 1962–7, 15 mar. 2010.

LEE, W. Y.; MACKO, S. A.; CIERESZKO, L. S. Toxic effects of cembranolides derived from octocorals on the rotifer *Brachionus plicatilis* Muller and the amphipod *Parhyale hawaiiensis* (Dana). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 54, p. 91–96, 1981.

LEE, W. Y.; NICOL, J. A. C. The effect of naphthalene on survival and activity of the amphipod *Parhyale*. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 20, n. 2, p. 233–240, 1978.

LEE, W. Y.; NICOL, J. A. C. Toxicity of a fuel oil to the eggs of *Parhyale hawaiiensis* and *Amphithoe valida* (amphipoda). **Marine Environmental Research**, v. 3, p. 297–305, 1980.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

LYONS, B. P.; THAIN, J. E.; STENTIFORD, G. D.; HYLLAND, K.; DAVIES, I. M.; VETHAAK, A. D. Using biological effects tools to define Good Environmental Status under the European Union Marine Strategy Framework Directive. **Marine Pollution Bulletin**, v. 60, n. 10, p. 1647–1651, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2010.06.005>>.

MARTIN, A.; SERANO, J. M.; JARVIS, E.; BRUCE, H. S.; WANG, J.; RAY, S.; BARKER, C. A.; O'CONNELL, L. C.; PATEL, N. H. CRISPR/Cas9 Mutagenesis Reveals Versatile Roles of Hox Genes in Crustacean Limb Specification and Evolution. **Current Biology**, v. 26, n. 1, p. 14–26, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2015.11.021>>.

MATRANGA, V.; CORSI, I. Toxic effects of engineered nanoparticles in the marine environment: model organisms and molecular approaches. **Marine environmental research**, v. 76, p. 32–40, maio 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22391237>>. Acesso em: 18 mar. 2013.

MERRIFIELD, D. L.; SHAW, B. J.; HARPER, G. M.; SAOUD, I. P.; DAVIES, S. J.; HANDY, R. D.; HENRY, T. B. Ingestion of metal-nanoparticle contaminated food disrupts endogenous microbiota in zebrafish (*Danio rerio*). **Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)**, v. 174, p. 157–63, mar. 2013.

MSFD. **Directive 2008/56/EC of the European Parliament and the Council of 17 June 2008 Establishing a Framework for Community Action in the Field of Marine Environmental Policy**. Disponível em: <http://ec.europa.eu/environment/marine/eu-coast-and-marine-policy/marine-strategy-framework-directive/index_en.htm>.

NAST, A. R.; EXTAVOUR, C. G. Ablation of a Single Cell From Eight-cell Embryos of the Amphipod Crustacean *Parhyale hawaiiensis*. **Journal of Visualized Experiments**, n. 85, p. 1–8, 2014.

NOWACK, B.; RANVILLE, J. F.; DIAMOND, S.; GALLEGU-URREA, J. a; METCALFE, C.; ROSE, J.; HORNE, N.; KOELMANS, A. a; KLAINE, S. J. Potential scenarios for nanomaterial release and subsequent alteration in the environment. **Environmental toxicology and chemistry / SETAC**, v. 31, n. 1, p. 50–9, jan. 2012. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22038832>>. Acesso em: 3 mar. 2013.

POOVACHIRANON, S.; BOTO, S.; DUKE, N. Food preference studies and ingestion rate measurements of the mangrove amphipod *Parhyale hawaiiensis* (Dana). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 98, p. 129–140, 1986.

RAISUDDIN, S.; KWOK, K. W. H.; LEUNG, K. M. Y.; SCHLENK, D.; LEE, J.-S. The copepod Tigriopus: a promising marine model organism for ecotoxicology and environmental genomics. **Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)**, v. 83, n. 3, p. 161–73, 20 jul. 2007.

RAMSDEN, C. S.; SMITH, T. J.; SHAW, B. J.; HANDY, R. D. Dietary exposure to titanium dioxide nanoparticles in rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*): No effect on growth, but subtle biochemical disturbances in the brain. **Ecotoxicology**, v. 18, n. 7, p. 939–951, 2009.

RATTE, H. T. Bioaccumulation and toxicity of silver compounds: a review. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 18, n. 1, p. 89–108, 1999.

REN, J.; HAN, P.; WEI, H.; JIA, L. Fouling-resistant behavior of silver nanoparticle-modified surfaces against the bioadhesion of microalgae. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 6, p. 3829–3838, 2014.

ROSA, J. G. **Grande Sertão: Veredas**. 1a. edição ed. [s.l.] Editora Nova Aguiar, 1994.

SHOEMAKER, C. R. Observations on the Amphipod Genus *Parhyale*. **Proceedings of the United States National Museum**, v. 106, n. 3372, p. 345–358, 1956.

TURJA, R.; GUIMARÃES, L.; NEVALA, A.; KANKAANPÄÄ, H.; KORPINEN, S.; LEHTONEN, K. K. Cumulative effects of exposure to cyanobacteria bloom extracts and benzo[a]pyrene on antioxidant defence biomarkers in *Gammarus oceanicus* (Crustacea: Amphipoda). **Toxicon**, v. 78, p. 68–77, 2014.

ANEXO I

ATIVIDADES CIENTÍFICAS

A aluna é co-autora do artigo “Determination of Ag and Cu in haemolymph of a millimetric marine crustacean (*Parhyale hawaiiensis*) as a tool in ecotoxicology” aceito para publicação na revista Atomic Spectroscopy Journal em outubro de 2017.

A aluna realizou uma visita técnica ao “Ecotoxicology and Pathophysiology of Aquatic Organisms Laboratory” localizado no Institute of Life and Earth Sciences na Universidade Heriot-Watt, em Edimburgo, UK, sob a supervisão do Prof. Theodore Henry, seu coorientador. A visita ocorreu de 28 de setembro a 28 de novembro de 2017. Durante sua visita, ela teve a oportunidade de participar nas reuniões e discussões do grupo. Realizou a revisão do artigo “Development of an acute toxicity test with the tropical marine amphipod *Parhyale hawaiiensis*” com a participação dos co-autores, discutiu e analisou dados de expressão gênica com a supervisão do Prof. Theodore.

Contribuiu com o projeto de doutorado “Design, synthesis, modeling, and application of sustainable permanent colorants for hair” desenvolvido pela aluna Tova Williams da Universidade North Carolina State University, USA, com testes de toxicidade. A aluna será co-autora do artigo resultante desse trabalho.

Contribuiu com o projeto de pos-doc “Avaliação eco/genotoxicológica de sedimentos sob influência de um emissário submarino” desenvolvido por Francine Inforçato Vacchi da Universidade Estadual de Campinas com testes de toxicidade e ensaio do cometa. A aluna será co-autora do artigo resultante desse projeto.

Contribuiu com o projeto “Toxicity evaluation of the pesticide pirimiphos-methyl” do Laboratório de Ecotoxicologia e Genotoxicidade -LAEG com testes de toxicidade. A aluna será co-autora do artigo resultante desse projeto.

A aluna foi membro do comitê de organização do 18th International Symposium on Toxicity Assessment (ISTA), realizado de 16 a 21 de julho de 2017 na cidade de Limeira, SP, Brasil. Realizou atividades na comissão de recepção do congresso, foi responsável pela comissão de avaliação dos trabalhos, ajudou na organização do evento e na divulgação através do site e redes sociais.

ANEXO II

Currículo Lattes

22/03/2018

Currículo Lattes

Imprimir
currículo

Mariana Coletty Artal

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/8067599247624595>

Última atualização do currículo em 21/03/2018

Resumo informado pelo autor

Graduada em Tecnologia em Saneamento Ambiental na modalidade Controle Ambiental pela Faculdade de Tecnologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Mestre em Tecnologia e Inovação pela Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Atualmente é aluna de doutorado no Programa de Fisiopatologia e Toxicologia na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (USP). Desenvolve seu trabalho e possui experiência na área de Toxicologia Ambiental.

(Texto informado pelo autor)

Dados pessoais

Nome Mariana Coletty Artal
Nascimento 14/12/1987 - Campinas/SP - Brasil
CPF 353.261.258-54

Formação acadêmica/titulação

- 2013** Doutorado em Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
 Título: Developing ecotoxicity biomarkers in the marine amphipod *Parhyale hawaiensis* and testing toxicity of manufactured nanomaterials
 Orientador: Gisela de Aragão Umbuzeiro
 Co-orientador: Theodore Burdick Henry
 Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
- 2011 - 2013** Mestrado em TECNOLOGIA, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, Brasil
 Título: Aplicação de teste de toxicidade com o copépodo marinho *Nitokra* sp na avaliação de corantes, Ano de obtenção: 2013
 Orientador: Gisela de Aragão Umbuzeiro
 Co-orientador: Guilherme Ribeiro Lotufo
 Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
- 2014 - 2016** Graduação em Engenharia Ambiental, Instituto Superior de Ciências Aplicadas, ALIE/ISCA, Limeira, Brasil
- 2006 - 2009** Graduação em Tecnologia em Saneamento Ambiental, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, Brasil
 Título: Utilização do *Vibrio fischeri* para avaliação da toxicidade em amostras ambientais
 Orientador: Gisela de Aragão Umbuzeiro

Formação complementar

- 2017 - 2017** Curso de curta duração em The use of Zebrafish Embryos in Ecotoxicology, (Carga horária: 8h), Faculdade de Tecnologia - UNICAMP, FT, Brasil
 Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
- 2017 - 2017** Curso de curta duração em Investigating amphipod immunity characterization of haemocytes and function, (Carga horária: 30h), Faculdade de Tecnologia - UNICAMP, FT, Brasil
 Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
- 2015 - 2015** Curso de curta duração em Scientific Methodology and Writing for Publication, (Carga horária: 30h), Faculdade de Tecnologia - UNICAMP, FT, Brasil
- 2015 - 2015** Curso de curta duração em Fundamentos da PCR Quantitativa em Tempo Real, (Carga horária: 20h), Thermo Fisher Scientific, TFS, Brasil
 Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
- 2013 - 2013** Curso de curta duração em Introdução ao SAS, (Carga horária: 21h), Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, Brasil
- 2011 - 2011** Curso de curta duração em O modelo do ligante biótico e suas implicações, (Carga horária: 4h), Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil
- 2010 - 2010** Curso de curta duração em Treinamento e entendimento da NBR-ISO/IEC 17025, (Carga horária: 16h), Faculdade de Tecnologia - UNICAMP, FT, Brasil

Atuação profissional

https://www.cnpq.br/cvlattesweb/pkg_impvcv.trata

22/03/2018

Currículo Lattes

1. Universidade de São Paulo - USP

Vínculo
institucional

2013 - Atual Vínculo: Bolsista, Enquadramento funcional: Bolsista doutorado, Regime: Dedicção exclusiva

2. Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP

Vínculo
institucional

2011 - 2013 Vínculo: Bolsista Mestrado, Enquadramento funcional: Bolsista, Regime: Dedicção exclusiva

2009 - 2010 Vínculo: Monitoria PAD, Enquadramento funcional: Monitoria, Regime: Dedicção exclusiva
Outras informações:
Atividades de monitoria realizadas nas disciplinas Toxicologia Ambiental e Ecologia Aplicada2008 - 2010 Vínculo: Estágio voluntário, Enquadramento funcional: Estagiária, Regime: Dedicção exclusiva
Outras informações:
Auxílio nos cultivos e nas atividades desenvolvidas no Laboratório de Ecotoxicologia Aquática e Limnologia (LEAL) da Faculdade de Tecnologia2008 - 2009 Vínculo: Bolsista, Enquadramento funcional: Iniciação científica, Regime: Dedicção exclusiva
Outras informações:
Realização do projeto "Monitoramento ecotoxicológico nas Indústrias Nucleares Brasileiras (INB)- Unidade Poços de Caldas, MG"

Produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

- ARTAL, M. C.; COLETTY, M. A.; DOS SANTOS, AMANDA; HENRY, THEODORE BURDICK; UMBUZEIRO, G. A.; DE ARAGÃO, G. S. Development of an acute toxicity test with the tropical marine amphipod *Parhyale hawaiiensis*. *ECOTOXICOLOGY*, v.27, p.103 - 108, 2018.
- ARTAL, M. C.; COLETTY, M. A.; HOLTZ, RAPHAEL DIAS; KUMMROW, FÁBIO; ALVES, OSWALDO LUIZ; UMBUZEIRO, G. A.; DE ARAGÃO, G. S. The role of silver and vanadium release in the toxicity of silver vanadate nanowires toward *Daphnia similis*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v.32, p.908 - 912, 2013.
- M. C., ARTAL; G., DE-ALMEIDA; A., CALOTO-OLIVEIRA; M. A. P. F., SANTOS; G. A., UMBUZEIRO; C. M. R., CONEGLIANA. Toxicity assessment of an effluent derived from an inactivated uranium mine: the Poços de Caldas (Brazil) example. *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology*, v.8, p.35 - 40, 2013.

Capítulos de livros publicados

- VACCHI, F. I.; ARTAL, M. C.; AZEVEDO, C. C. J.; SANTOS, A.; DIAS, E. F. G.; UMBUZEIRO, G. A. Ecotoxicidade de corantes para organismos aquáticos. In: Corantes: caracterização química, toxicológica, métodos de detecção e tratamento. 1 ed. São Paulo : Editora UNESP, 2016, p. 123-138.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

- SANTOS, A.; ARTAL, M. C.; VENDEMIATTI, J. A. S.; SILVA, B. F.; ZANONI, M. V. B.; UMBUZEIRO, G. A. Quantificação do azo corante Disperse Red 1 na hemolinfa de *Parhyale hawaiiensis*. In: XIII Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia, 2014, Guarapari. *Anais do ECOTOX 2014*, 2014.
- ARTAL, M. C.; SANTOS, A.; VENDEMIATTI, J. A. S.; SILVA, B. F.; ZANONI, M. V. B.; UMBUZEIRO, G. A. Determination of Disperse Red 1 in hemolymph of *Parhyale hawaiiensis* possible biomarker of exposure to dyes. In: 9th Iberian and 6th Iberoamerican Congress on Environmental Contamination and Toxicology, 2013, Valencia. *9th Iberian and 6th Iberoamerican Congress on Environmental Contamination and Toxicology*, 2013.
- M. C., ARTAL; SANTOS, A.; PESSOA, G. S.; OLIVEIRA, S. R.; ARRUDA, M. A. Z.; UMBUZEIRO, G. A. Metals in hemolymph of the marine amphipod *Parhyale hawaiiensis* as a promising exposure biomarker. In: 9th Iberian and 6th Iberoamerican Congress on Environmental Contamination and Toxicology, 2013, Valencia. *9th Iberian and 6th Iberoamerican Congress on Environmental Contamination and Toxicology*, 2013.
- ARTAL, M. C.; LOTUFO, G. R.; CARDOSO, J. C.; ZANONI, M. V. B.; UMBUZEIRO, G. A. Effects of azo dye Disperse Red 1 before and after photoelectrochemical treatment to an estuarine copepod. In: XII, 2012, Porto de Galinhas. *Anais do XII Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia*, 2012.
- ARTAL, M. C.; KUMMROW, F.; HOLTZ, R. D.; ALVES, O. L.; UMBUZEIRO, G. A. The role of silver and vanadium to the toxicity of silver vanadate nanowires decorated with silver nanoparticles. In: XII Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia, 2012, Porto de Galinhas. *Anais do XII Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia*, 2012.
- CALOTO-OLIVEIRA, A.; DE-ALMEIDA, G.; LUNA, L. A. V.; MORAES, D. A.; PAPPANI, D. P.; VACCHI, F. I.; ARTAL, M. C.; REGANHAN-CONEGLIAN, C. M.; UMBUZEIRO, G. A.; ALBUQUERQUE, A. F. Tratamento de resíduos de laboratório: estudo de caso para um efluente líquido contendo o corante CI Disperse Red 1. In: XI Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia, 2010, Bombinhas. *Anais do XI Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia*, 2010.
- ARTAL, M. C.; DE-ALMEIDA, G.; CALOTO-OLIVEIRA, A.; SANTOS, M. A. P. F.; REGANHAN-CONEGLIAN, C. M.; UMBUZEIRO, G. A. Caracterização ecotoxicológica dos efluentes de uma antiga mina de extração e preparação de compostos de urânio no município de Poços de Caldas - MG. In: XVI Congresso Brasileiro de Toxicologia,

https://www.cnpq.br/cvlattesweb/pkg_impvcv.trata

2/3

22/03/2018

Currículo Lattes

2009, Belo Horizonte.
Revista Brasileira de Toxicologia., 2009.

8. ARTAL, M. C.; REGANHAN-CONEGLIAN, C.M.
Monitoramento ecotoxicológico nas Indústrias Nucleares Brasileiras (INB) - Unidade Popos de Caldas, MG
In: XVII Congresso Interno de Iniciação Científica da Unicamp, 2009, Campinas.
Caderno de Resumos do XVII Congresso Interno de Iniciação Científica da Unicamp., 2009.
9. ALVES, G. R.; ARTAL, M. C.; VACCHI, F. I.; ATTILI-ANGELIS, D.
Avaliação do caráter ácido da água de chuva da cidade de Limeira - SP In: III Workshop de ecotoxicologia, 2008, Rio Claro.
Holos Environment., 2008, v.8.

Página gerada pelo sistema Currículo Lattes em 22/03/2018 às 11:50:17.

ANEXO III

Ficha do Aluno

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9143 - 8213388/1 - Mariana Coletty Artal

Email: mariartal@usp.br
Data de Nascimento: 14/12/1987
Cédula de Identidade: RG - 43.479.709-1 - SP
Local de Nascimento: Estado de São Paulo
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Tecnóloga em Saneamento Ambiental - Universidade Estadual de Campinas - São Paulo - Brasil - 2009
Mestrado: Mestra em Tecnologia - Área: Tecnologia e Inovação (1) - Universidade Estadual de Campinas - São Paulo - Brasil - 2013

Curso: Doutorado
Programa: Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)
Área: Toxicologia
Data de Matrícula: 05/12/2013
Início da Contagem de Prazo: 05/12/2013
Data Limite para o Depósito: 04/04/2018
Orientador: Prof(a). Dr(a). Gisela de Aragão Umbuzeiro - 15/12/2016 até o presente. Email: giselau@usp.br
Co-orientador: Prof(a). Dr(a). Theodore Burdick Henry - 15/12/2016 até o presente. Email: t.henry@hw.ac.uk
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 05/12/2013
Prorrogação(ões): 120 dias
 Período de 05/12/2017 até 04/04/2018
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 01/03/2016
Estágio no Exterior: Heriot-Watt University, Escócia - Período de 28/09/2017 até 28/11/2017

Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:

Histórico de Ocorrências:

Primeira Matrícula em 05/12/2013
Prorrogação em 19/09/2017

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor a partir de 20/04/2013).

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 05/02/2018

Impresso em: 30/03/2018 15:43:35

- Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9143 - 8213388/1 - Mariana Coletty Artal

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBC5803-3/3	Sistemas de Garantia da Qualidade em Laboratórios de Ensaio	11/03/2014	24/03/2014	30	2	100	A	N	Concluída
FBC5802-3/4	Tópicos Avançados em Toxicologia I	11/03/2014	23/06/2014	15	1	90	A	N	Concluída
CEN5772-1/3	Bioquímica e Biologia Molecular de Células (Centro de Energia Nuclear na Agricultura - Universidade de São Paulo)	12/03/2014	24/06/2014	225	15	100	C	N	Concluída
FBC5784-3/5	Tópicos Avançados em Toxicologia II	05/08/2014	17/11/2014	15	1	90	A	N	Concluída
FBC5883-6/1	Avaliação da Toxicidade de Contaminantes em Amostras Ambientais	11/08/2014	07/09/2014	60	4	88	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	0	20	23
Estágios:			
Total:	0	20	23

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Observações:

1) Curso com validade nacional, de acordo com o disposto na Portaria MEC nº 1.077, de 31.08.2012..

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 05/02/2018

Impresso em: 30/03/2018 15:43:35