

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
Centro de Desenvolvimento Tecnológico – CDTec  
Curso de Graduação em Biotecnologia



Trabalho de Conclusão de Curso

Biotecnologia aquática: zebrafish transgênico e toxicidade aguda de metais para *Artemia sp.*

**Fernando Lopez Alvez**

Pelotas, 2012

**FERNANDO LOPEZ ALVEZ**

Biotecnologia aquática: zebrafish transgênico e toxicidade aguda de metais para  
Artemia sp.

Trabalho acadêmico apresentado ao  
curso de Bacharelado em Biotecnologia  
da Universidade Federal de Pelotas,  
como requisito parcial para obtenção  
do título de bacharel em Biotecnologia.

Orientador acadêmico: Prof. Dr. Vinicius Farias Campos, Universidade Federal de  
Pelotas

Orientador de estágio: Prof. Dr. Luis Fernando Fernandes Marins, Universidade  
Federal do Rio Grande

PELOTAS, 2012

Dados de catalogação na fonte:  
( Marlene Cravo Castillo – CRB-10/744 )

A474b Alvez, Fernando Lopez

Biotecnologia aquática : zebrafish transgênico e toxicidade aguda de metais para Artemia SP. / Fernando Lopez Alvez ; orientador acadêmico Vinicius Farias Campos ; orientador de estágio Luis Fernando Fernandes Marins. Pelotas, 2012. 59f. : il - Monografia ( Conclusão de Curso em Biotecnologia ) –Centro de Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2012.

1. Aquários 2. Biologia molecular 3. Danio rerio 4. Trangenina animal 5. Microinjeção 6. Cádmiio I. Campos, Vinicius Farias(orientador) II .Marins, Luis Fernando Fernandes(orientador) III. Título.

CDD 574.87

## **BANCA EXAMINADORA**

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Priscila Marques Moura de Leon, Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Tiago Collares, Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. João Carlos Deschamps, Universidade Federal de Pelotas

Dedido este trabalho de conclusão de curso às mulheres da minha vida, sem elas nada teria acontecido.

## **Agradecimentos**

À minha mãe, M<sup>a</sup> Teresa, e ao meu pai, Juan Pedro (*in memoriam*). Vocês são a minha inspiração e sem vocês eu não chegarei a lugar algum

À minha irmã Marcela pela revisão, críticas, apoio e por ser a chave que me abriu muitas portas.

À Patricia Trentin pelo amor, apoio e críticas.

Ao meu orientador, Prof. Vinicius Campos, por sua paciência e orientação.

Ao Prof. Tiago Collares pelas aulas e pelo livro de transgenia animal. Se hoje eu tenho muito apreço, conhecimento e interesse nessa área foi por sua causa.

Ao Prof. Luis Fernando Marins por ter aberto as portas do Laboratório de Biologia Molecular, me concedendo a oportunidade de estágio.

Ao Prof. Márcio Figueiredo pela paciência e aulas no laboratório.

À Prof. Fabiana Seixas pela oportunidade do meu primeiro estágio.

Aos meu colegas pelos momentos que passamos juntos desde o início dessa caminhada. Vocês ficarão na minha memória e no meu coração para sempre.

À Fabricio Domenech Nunes pelos momentos e conversas ao longo do curso e pelos exemplos.

Às pessoas da pós graduação: Marcela Lopez, Priscila Antiqueira, Geny Afonso, Roberta Lobato, Marcelo Simas e Fernanda Lopes por todos os momentos agradáveis que passei junto de vocês.

À Guilherme Sansão pela paciência e conversas.

À Karine Forster pela paciência e ensinamento.

Ao pessoal do Laboratório de Biologia Molecular da FURG.

*“Resplandecente é a Sabedoria, e sua beleza é inalterável: os que a amam descobrem-na facilmente, os que a procuram encontram-na. Ela antecipa-se aos que a desejam. Quem, para possuí-la, levanta-se de madrugada, não terá trabalho, porque a encontrará sentada à sua porta.”*

Sabedoria 6:12-14

## Resumo

LOPEZ, Fernando A. **Biotecnologia aquática: zebrafish transgênico e toxicidade aguda de metais para *Artemia sp.***. 2012. 49f. Trabalho de Conclusão de Curso — Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas.

O estágio supervisionado ocorreu no período de março a julho de 2012 no Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), sob a orientação do Prof. Dr. Luis Fernando Fernandes Marins. Dentre as técnicas acompanhadas e realizadas temos transformação de bactéria termocompetente, plaqueamento de bactéria transformada, cultivo em meio líquido de bactéria transformada, extração de plasmídeo, reação em cadeia da polimerase, restrição enzimática, ligação enzimática, gel de agarose e microinjeção em ovos fertilizados de *Danio rerio*. Além disso, foram realizadas e observadas manutenções dos aquários de *Danio rerio* e *Poecilia vivipara*. Decorrente do período de estágio foram realizados um experimento e uma revisão acerca da microinjeção em *Danio rerio* focada na utilização de métodos em conjunto. No experimento foi realizado um teste toxicológico utilizando náuplios do microcrustáceo *Artemia sp.* exposto à diferentes concentrações dos metais cádmio (Cd) e chumbo (Pb), com o objetivo de determinar a CL50-24h. O chumbo foi mais tóxico do que o cádmio. Com a realização deste estudo sugeriu-se que mais testes devem ser feitos para que os náuplios dessa espécie possam ter um protocolo padronizado, já que os protocolos existentes relatam sobre o cultivo de *Artemia sp.* e sobre sua fase adulta. Este experimento resultou em um resumo enviado ao XVII Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia que se realizará em Setembro na cidade de Porto de Galinhas – Pernambuco. Por fim, foi escrita uma breve revisão sobre a microinjeção em zebrafish com ênfase em métodos utilizados como retrovirus, ribozimas, transposons e morfollinos com uma perspectiva simplista de visão da transgenia animal.

Palavras-chave: Microinjeção, cádmio, chumbo, transgenia animal, aquários, biologia molecular, *Danio rerio*.



## Abstract

LOPEZ, Fernando A. **Biotecnologia aquática: zebrafish transgênico e toxicidade aguda de metais para *Artemia sp.*** 2012. 49f. Trabalho de Conclusão de Curso — Curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas.

The internship occurred during the period between march and july of 2012 in the Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), under the supervision of Prof. PhD. Luis Fernando Fernandes Marins. Among the technics accompanied and observed are transformation of thermocompetent bacteria, transformed bacteria plating, transformed bacterial broth culture, plasmid extraction, polymerase chain reaction, enzyme restriction, enzyme ligation, agarose gel and microinjection in *Danio rerio* fertilized eggs. Furthermore, have been made and observed the *Danio rerio* and *Poecilia vivipara* aquariums maintenance. Due to the internship period, an experiment and a review on microinjection in *Danio rerio* focused in the use of other methods together, has been made. In the experiment, a toxicological test has been made exposing brine shrimp's nauplii to different concentrations of cadmium (Cd) and lead (Pb), aiming determine the LC50-24h. Lead was more toxic than cadmium. The completion of this research suggested that more tests shall be done so this specie's nauplii can have a standard protocol, since actual protocols report on the *Artemia sp.* growth or its adulthood. This research resulted in an abstract that has been submitted to XVII Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia that will take place in september in Porto de Galinhas – Pernambuco. At last, a brief review on zebrafish microinjection emphasizing methods used as retrovirus, ribozymes, transposons and morpholinos under a simple perspective of transgenic animal has been written

Keywords: Microinjection, cadmium, lead, transgenic animals, aquariums, molecular biology, *Danio rerio*

## Lista de Figuras

Figura 1 — Foto dos frascos, e suas respectivas concentrações, utilizados no experimento.....	35
Figura 2 — Foto do Laboratório de Biologia Molecular.....	36
Figura 3 — Aquário com peixes <i>Poecilia vivipara</i> .....	41

## Lista de Abreviaturas e Siglas

CONAMA - Conselho Nacional do meio Ambiente

DNA – Deoxyribonucleic acid. Ácido desoxiribonucleico.

dNTP – Deoxynucleotide triphosphate. Desoxinucleotídeo trifosfato.

DsRed – *Discosoma sp* Red fluorescent protein. Proteína fluorescente vermelha do *Discosoma sp*.

FURG – Universidade Federal do Rio Grande.

GFP – Green Fluorescent Protein. Proteína Fluorescente Verde.

LB – Lisogeny Broth. Caldo Lisogênico.

PCR – Polimerase Chain Reaction. Reação em cadeia da polimerase.

SOC – Super Optimal Broth with Catabolitic Repression. Caldo super ótimo com repressão catabolítica.

TBE – Tris-Borato-EDTA

## SUMÁRIO

Resumo

Abstract

Lista de figuras

Lista de abreviaturas e Siglas

1	Introdução.....	12
2	Artigo 1.....	13
	Resumo.....	14
	Abstract.....	14
	Introdução.....	15
	Vírus.....	17
	Ribozimas.....	19
	Transposons.....	20
	Morfolinos.....	23
	Conclusão.....	26
	Referências.....	27
3	Toxicidade Aguda de Metais para o Microcrustáceo <i>Artemia sp.</i> .....	33
3.1	Introdução.....	33
3.2	Materiais e métodos.....	35
3.3	Resultados.....	35
3.4	Conclusão.....	36

4	Relatório de Atividades do Período de Estágio Supervisionado.....	37
4.1	Introdução.....	37
4.2	Transformação de Bactéria Termocompetente .....	38
4.3	Plaqueamento de Bactéria Transformada.....	38
4.4	Cultivo em Meio Líquido de Bactéria Transformada.....	39
4.5	Extração de Plasmídeo.....	39
4.6	Reação em cadeia da polimerase.....	40
4.7	Restrição Enzimática.....	41
4.8	Ligação Enzimática.....	41
4.9	Gel de Agarose.....	41
4.10	Microinjeção em Ovos Fertilizados de <i>Danio rerio</i> .....	42
4.11	Manutenção de <i>Poecilia vivipara</i> .....	43
4.12	Manutenção de <i>Danio rerio</i> .. ..	43
4.13	Cultivo de <i>Artemia sp</i> .....	44
4.14	Conclusão.....	44
5	CONCLUSÃO.....	45
	Referências.....	46
	Anexos.....	48

## 1 INTRODUÇÃO

O presente trabalho consiste de três capítulos que abrangem uma revisão bibliográfica sobre a microinjeção em zebrafish; um trabalho científico que foi realizado em conjunto com alunas do programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas – Fisiologia Animal Comparada da Universidade Federal do Rio Grande (FURG); e o período de estágio supervisionado na FURG.

No primeiro capítulo é abordada uma revisão sobre microinjeção em zebrafish focada em quatro métodos utilizados em conjunto com essa técnica, além de uma breve introdução sobre o modelo animal.

O segundo capítulo trata de um trabalho realizado durante o estágio, fruto de uma oportunidade concedida pela aluna Marcela Alvez do programa de pós-graduação em fisiologia animal comparada da FURG. O trabalho foi enviado a congresso, que acontecerá em meados de setembro de 2012, sob o título de Toxicidade Aguda de Metais para o Microcrustáceo *Artemia sp.*

Por fim, serão descritos técnicas aprendidas que foram empregadas durante o período de estágio, com duração de 300h, bem como a manutenção observada ou realizada de espécimes de animais modelo de experimentação.

## 2 ARTIGO 1

### **Microinjeção em zebrafish (*Danio rerio*): morfolidos, vírus, ribozimas e transposons**

Artigo de revisão formatado de acordo com as normas do periódico Ciência Rural

**Microinjeção em zebrafish (*Danio rerio*): morfolidos, vírus, ribozimas e  
transposons**

**Microinjection in zebrafish (*Danio rerio*): morpholinos, virus, ribozymes and  
transposons**

— Revisão Bibliográfica —

**RESUMO**

Zebrafish – *Danio rerio* é um organismo modelo de pequeno porte, o qual apresenta grande homologia biológica com mamíferos. Recentemente, este peixe tem sido um importante alvo na área de transgenia animal. Dentre as diversas técnicas desenvolvidas para a geração de um zebrafish transgênico, a microinjeção é a mais aplicada. Entretanto, a técnica apresenta problemas como a baixa taxa de integração do transgene que podem ser resolvidas através do emprego, em conjunto, de outras tecnologias como morfolidos, vírus, ribozimas e transposons. Esta revisão abordará o uso dessas tecnologias na microinjeção em zebrafish.

**Palavras-chave:** transgene, peixe, *knockdown*, transfecção, mutantes, expressão, integração.

**ABSTRACT**

Zebrafish – *Danio rerio* is a small size model organism which shows high biological homology with mammals. Recently this fish become an important target in the transgenic animals field. Among all techniques developed to the generation of a transgenic zebrafish, microinjection is the most applied. However, that technique has cons, as transgene integration



low rates, that can be resolved through the combined usage with other techniques as morpholinos, viruses, ribozymes and transposons. This review presents the use of these techniques on zebrafish microinjection.

**Key words:** Transgene, fish, knockdown, transfection, mutants, expression, integration.

## **Introdução**

Zebrafish, *Danio rerio*, é uma espécie de peixe pertencente à família dos Ciprinídeos, da subclasse teleósteos, e são nativos de rios da Índia. São pequenos, atingindo aproximadamente 3 cm quando adultos, o que os torna passíveis de serem mantidos em largas quantidades em aquários de custo relativamente baixo e em espaço reduzido. Os machos são delgados com listras longitudinais e usualmente possuem uma coloração dourada na barriga e nadadeiras, enquanto que as fêmeas possuem pouca, se alguma, coloração dourada na sua parte inferior. As fêmeas ficam menos delgadas quando carregam ovos, e geralmente os depositam a intervalos semanais, sendo fertilizados externamente pelos machos (WIXON, 2000; SUSSMAN, 2007).

Os ovos fertilizados apresentam um desenvolvimento rápido, onde a primeira clivagem ocorre dentro de 40 min, gastrulação em 5 h e coração funcional e eritrócitos são observáveis, através de um estereomicroscópio, dentro de 24h. De 3 a 4 dias os ovos eclodem, gerando larvas que não necessitam de cuidados dos peixes progenitores o que representa uma das vantagens do zebrafish como organismo modelo frente a outros como o camundongo. O tempo de geração de um peixe adulto é entre 60-70 dias. Durante os processos do desenvolvimento o embrião mantém transparência o que faz do organismo particularmente atrativo para análises genéticas, estudos sobre o desenvolvimento e expressão de proteínas

fluorescentes como a proteína verde fluorescente (GFP) e a proteína vermelho fluorescente (DsRed). Além disso, alguns estágios do desenvolvimento podem ser observados em embriões haplóides. (CULP et al., 1991; XIE et al., 1997; WIXON, 2000).

O zebrafish possui um genoma de aproximadamente 1700 Mb distribuídos em 25 cromossomos (WIXON, 2000). Apesar de ser um vertebrado inferior, apresenta genes com homologia aos de vertebrados superiores como humanos e camundongos (XIE et al., 1997). A exemplo, Ding e Zhang (2011) relatam o uso do zebrafish como modelo para o vírus da Hepatite C devido à homologia biológica entre homem e o peixe. Desta forma, este modelo tem se revelado atrativo no estudo do desenvolvimento de tumores (LE et al. 2007). Também é uma ferramenta excelente para estudos da expressão gênica, devido ao desenvolvimento de tecidos complexos como rins, sistema visual e sistema olfativo, assim como interações entre patógeno e hospedeiro, doenças gastrointestinais e regeneração (ALLEN, NEELY, 2010 ;GOLDSMITH, JOBIM, 2012). Um dos problemas é que a execução de análises através de imagem ficam comprometidas depois de 3 semanas pós fertilização, pois ocorre ganho de opacidade (WHITE et al. 2008). Recentemente, foi desenvolvido por White et al. (2008) uma linhagem de zebrafish, que mantém transparência, através de manipulação genética clássica.

Portanto, essa espécie é um excelente modelo para a transgenia animal e para o desenvolvimento de novos métodos para a transgênese. Apesar de técnicas de transfecção como a transferência gênica mediada por espermatozóide (SMGT) (KURITA et al., 2003) e eletroporação (RAMBABU et al., 2005) terem sido empregada em zebrafish, a microinjeção ainda é a técnica mais utilizada.

Dos métodos não virais de transfecção para geração de zebrafish transgênicos, a microinjeção é uma das mais descritas e utilizadas. Em geral a microinjeção é realizada com o embrião no estágio de uma célula, na expectativa de que a sequência de DNA exógeno seja integrada ao genoma do embrião gere um animal com ausência de mosaicismos, que expresse

o transgene e que permita sua transferência para a progênie por segregação mendeliana (ROSEN et al., 2009). Entretanto, uma grande quantidade dessas sequencias microinjetadas não se integram e são expressas como elementos genéticos epissomais por períodos longos e de forma transiente (XIE et al., 1997).

Embora essa técnica seja útil, possui eficiência variável, os transgenes podem intergrar-se em tandem e podem haver rearranjos no DNA plasmidial durante a transfecção (GAIANO et al., 1996). Por isso, são utilizados outros métodos em conjunto à microinjeção, visando auxiliar a integração do transgene no genoma do zebrafish, como por exemplo a microinjeção de construtos baseados a partir de retrovirus, ribozimas, transposons e morfolidos.

## **Vírus**

Vírus são máquinas biológicas que exploram a maquinaria celular do hospedeiro para sua replicação. Graças a engenharia genética, e aos estudos da interação vírus-hospedeiro, vários vírus são utilizados para o desenvolvimento de vetores virais. Basicamente são dois grupos: (1) vetores que se integram no genoma e (2) aqueles que se mantêm no núcleo como cromossomos epissomais (THOMAS et al., 2003).

Esses vetores tem sido utilizados em estratégias como genética reversa e *trapping* genético (JAO et al, 2008). A estratégia de genética reversa consiste de corromper genes e observar os efeitos da sua inativação. Frequentemente, os vetores são utilizados para gerar mutações no genoma seguido de identificação dos sítios que contém a inserção proviral (WANG et al., 2007). Utilizando esta abordagem, associada à reprodução direcionada de animais mutantes, é possível realizar um screening gênico e identificar genes mutados (AMSTERDAM, 1999). Golling et al (2002) através de screening, identificaram e

classificaram vários genes mutados em zebrafish. O *trapping* gênico consiste da inserção de um vetor em um intron. O vetor possui um gene reporter sem promotor *downstream* a um acceptor de *splicing*. Quando há ativação transcricional do promotor do gene onde o vetor se inseriu, ocorre uma fusão de transcrição que simultaneamente mutará o gene reportando assim, o padrão de expressão (STANFORD et al., 2001). Chen et al. (2002) desenvolveram um vetor viral para *trapping* genético visando facilitar a identificação de genes mutados e para gerar titulações maiores de vírus, com menor toxicidade, em cultivo celular. A menor toxicidade melhorou significativamente a taxa de sobrevivência dos embriões injetados com o vetor.

Os vetores retrovirais são os mais utilizados e descritos em zebrafish. No entanto, a infecção depende da interação entre componentes da parede celular e a proteína do envelope. Ainda, a proteína do envelope determina o tropismo para o hospedeiro através do reconhecimento de, geralmente, uma proteína específica na superfície da célula. Para contornar esse problema desenvolveu-se vetor viral pseudotipado que é um vetor contendo o genoma de um vírus, mas a proteína de envelope de outro (AMSTERDAM, 2011). Burns et al. (1993), relataram a construção de um vetor baseado no *Moloney murine leukemia virus* (MoMLV) pseudotipado com a glicoproteína de capsula do *vesicular stomatitis virus* (VSV-G) e a sua utilização em zebrafish.

Vetores virais que não se integram foram descritos. Um deles, baseado em adenovírus, foi descrito por Kawasaki et al (2009), sendo capaz de infectar células de zebrafish e medaka. Outro, é um vetor baseado no baculovírus, que possui vantagens em comparação com retrovírus, mas mantém-se episossomal na célula e com expressão transiente (Wagle, 2003).

As aplicações dos vetores virais são inúmeras. Mas alguns aspectos ainda são desejados como propagação estável, purificação com altas titulações e taxa de transgene alta.

## Ribozimas

Ribozimas são pequenos RNAs de até 150 nucleotídeos que realizam auto-clivagem em um sítio de clivagem através de sequencia específica. Apesar do mecanismo de clivagem não ser totalmente esclarecido, elas poderiam desencadear, através dos sítios específicos para íons divalentes — como pro exemplo o magnésio ( $Mg^{2+}$ ) necessário para o dobramento de RNA — uma catálise assistida por íons metálicos (DOHERTY, DOUDNA, 2000).

As ribozimas cabeça de martelo (*Hammerhead*) são as mais utilizadas e descritas. Normalmente são compostas de dois braços e um núcleo catalítico e reconhecem sítios NUH onde: N representa qualquer base, H representa A (adenina), C (citosina) ou U (Uracila) (SEEHAFER et al, 2010). A especificidade é imputada pela alteração das sequencias dos braços, que reconhecem o RNA alvo e pareiam conforme as regras de Watson-Crick (FUKUDA et al, 2012). Inicialmente, foram empregadas como agentes antivirais para o vírus da imunodeficiência humana (HIV) e para o vírus da hepatite C, mas com o tempo seu uso na pesquisa foi ampliado para estudar oncogenes, mRNA, rotas metabólicas e geração de animais transgênicos *knockdown* (WELCH et al, 1998).

Apesar de terem sido utilizadas para transgenia em camundongos e células de mamíferos (WELCH et al, 1998), existem poucas descrições de transgenia em zebrafish utilizando ribozimas. Xie et al. (1997) e Walker et al. (2001) inibiram o gene *no-tail* co-injetando ribozimas vetorizadas com promotor viral e promotor T7 RNA polimerase em embriões de zebrafish.

Como ribozimas são moléculas de RNA, possuem alta susceptibilidade à degradação por Rnases endógenas presentes no embrião. Modificações na molécula para evitar a ação desse mecanismo levam à perda de outras funções (LYNGSTADAAS, 2001). A eficiência das ribozimas depende de alguns fatores como o método de entrega à célula, o grau de

seletividade do desenho da fita e a localização da ribozima em relação ao alvo (BRAMLAGE et al, 1998). Apesar dos obstáculos, eles não diminuem o potencial emprego das ribozimas como meio de realização de zebrafish *knockdown*. Talvez a melhoria das técnicas existentes, o emprego em conjunto à outras estratégias ou o desenvolvimento de novas técnicas ampliem o uso das ribozimas na geração de zebrafish transgênico.

## Transposons

Uma vasta maioria do DNA genômico não tem função óbvia e é dominado por elementos repetitivos que são capazes de deslocamento no genoma e, dependendo da natureza do mecanismo de deslocamento, são denominados transposon ou retrotransposon. Esses elementos alteram o genoma através de inserções, excisões, duplicações ou translocações consequentes da transposição. Na transgenia em zebrafish os transposons são mais utilizados e descritos. Dentro dessa classe, e entre várias outras, duas famílias se destacam. As superfamílias Tc1/*mariner*, a qual pertence o transposon *Sleeping Beauty* (SB), e hAT (*hobo/AC/Tam3*), onde encontramos o Tol2 (MUÑOZ-LÓPEZ, GARCÍA-PEREZ, 2010).

Os transposons utilizam um sistema “corta e cola”: são excisados do genoma por uma enzima transposase, que se liga às sequências repetitivas flanqueantes do transposon, e depois são reinseridos. Isso representa uma ferramenta significativa na transgenia porque essas estruturas catalizam a integração cromossomal — um passo de extrema importância. Portanto, o uso de transposons representa uma ferramenta de utilização diversa: geração de linhagem transgênica, mutagênese, terapias gênicas e estudos de função de genes, por exemplo (LARGAESPADA, 2003).

*Sleeping Beauty* é um transposon sintetizado a partir de sequências consenso de transposons inativos retirados de genomas de salmonídeo. A transposase cataliza a excisão e

inserção em sítios com sequencias dinucleotídica TA no genoma do hospedeiro (NEWMAN, LARDELLI, 2010). O sistema do SB é constituído da enzima transposase e do vetor que contém as sequencias terminais *repetidas invertidas* (IR) e *repetidas diretas* (DR). Para a excisão do transposon, a enzima se liga na sequencia IR e reintegra em um sítio dinucleotídico TA com preferência pela sequência ANNTANNT (LARGAESPADA, 2003). Recentemente, o desenvolvimento de uma transposase com atividade mais intensa em comparação à original (MATES et al 2009) demonstrou aumentar a taxa de transgênese, mas com menor estabilidade — o que pode acarretar em uma degradação mais rápida da mRNA que sintetiza a enzima (NEWMAN, LARDELLI, 2010). McGrail et al. (2011) demonstraram a utilização de expressão constitutiva e transiente da transposase na geração de mutagênese em zefrafish, incrementando o repertório de utilização do sistema de transgenia. Esse sistema é uma ferramenta que aumenta a produção de transgênicos em comparação com outros métodos (DAVIDSON et al., 2003).

*Local hopping* é um fenômeno que representa a tendência de reintegração de alguns elementos móveis em uma distância próxima ao locus doador. SB possui um local hopping entre 5 a 15MB, um valor considerado alto se comparado ao local hopping de outros transposons. Também sofre influencia da inibição por superprodução (OPI, do inglês *Overproduction Inhibition*). É um fenômeno exclusivo da família qual o SB pertence, onde ocorre uma diminuição da atividade de transposição causado pelo aumento de enzima transposase (MUÑOZ-LÓPEZ, GARCÍA-PÉREZ, 2010). Todavia a eficiência da transposição é inversamente proporcional ao tamanho do vetor, caindo em média 30% por kb inserido, talvez causado pelo aumento da distância entre as sequencias flanqueadoras. Isso é outro aspecto negativo, pois teoricamente SB pode comportar um vetor >10kb (IZSVÁK et al, 2000).

Mesmo com aspectos negativos, o sistema de transposon *Sleeping Beauty* é uma excelente ferramenta para a biologia molecular e transgenia animal, principalmente pela capacidade de integração, que é comparável com a de vetores baseados em retrovirus.

O transposon Tol2 foi clonado do locus do gene da tirosinase do peixe medaka (*Oryzas latipes*) e foi o primeiro transposon autônomo e endógeno de genoma vertebrado a ser descrito (KAWAKAMI, SHIMA, 1999; KAWAKAMI et al, 2000). Pertence à superfamília hAT e, assim como o SB, utiliza o sistema de “corta e cola” para excisão e inserção. Apesar desse aspecto em comum, o sistema Tol2 diverge em outros aspectos como: o local hopping é baixo, ocorrendo em aproximadamente 300kb próximo ao locus doador (URASAKI et al, 2008); a taxa de transgenia é estável em vetores com tamanho aproximado de 10kb (URASAKI et al, 2006; BALCIUNAS et al, 2006); o sistema tem preferência de integração em sítios que contém uma sequência heterogênea de 8bp de comprimento. No entanto, o sistema pode gerar excisão imprecisa que acarreta no desenvolvimento de fenótipo diferente do gerado por excisão precisa (KOGA et al, 2006).

Ambos sistemas possuem características otimizadas através de engenharia genética. Kwan et al (2007), desenvolveram um esquema de clones no formato de kit chamado de Tol2kit. Basicamente o sistema é estabelecido a partir da montagem de três construtos: um contendo promotor, outro contendo gene reportador ou sequência alvo e o último contendo o sinalizador poliA. O kit possui site com informações: <http://chien.neuro.utah.edu/Tol2kitwiki> (acessado em: 03 de Agosto de 2012) (KWAN et al, 2007).

Tol2 tem sido descrito como um sistema de transposição eficiente (URASAKI et al, 2008), podendo ser utilizado em estratégias de mutagenese (ASAKAWA et al, 2008) e em estudos sobre a interação gene-fisiologia (HALL et al., 2007). Apesar desses sistemas serem vantajosos pela semelhança com os sistemas retrovirais, ainda há muitos aspectos a serem



desenvolvidos. Aspectos como a determinação da preferência dos sítios de integração do Tol2 ou a melhoria da eficiência do sistema SB para vetores de tamanho grande.

## **Morfolinos**

Morfolinos (MOs) são oligonucleotídeos constituídos de um anel morfolino, um ligante intermediário fósforodiamidato e uma base genética: adenina, citosina, guanina, tiamina e uracila. Isso permite que possuam características semelhantes à dos ácidos nucleicos como eficiência, especificidade e solubilidade — que são maiores em comparação a outros oligômeros (SUMMERTON et al, 1997). Além disso, possuem resistência à ação de grande parte de enzimas presentes no microambiente celular (como Dnases, Rnases e proteases) e são estáveis em soro, plasma e à temperatura ambiente (HUDZIAK et al, 1996). Parte da especificidade dos morfolinos se deve ao fato de serem independentes da RNaseH, uma endonuclease que age sobre duplexos de no mínimo 5pb (SUMMERTON, WELLER, 1997).

Um agente ligante de ácidos nucleicos para utilização em estratégias antisense deve ter baixo custo de síntese, ser eficiente, ter especificidade e estabilidade durante preparação e uso (HUDZIAK et al, 1996). Esses agentes, geralmente oligômeros desenhados para bloquear a atividade de sequências de RNA selecionadas, são chamados de oligômeros antisense (STEIN et al, 1997; SUMMERTON et al, 1997). Apesar dos diversos oligômeros desenvolvidos até hoje, morfolinos são a ferramenta antisense mais utilizada em zebrafish (BILL et al, 2009).

Várias estratégias de entrega de MOs foram desenvolvidas, pois a endocitose dificulta o acesso às sequências alvo dentro da célula e muitas vezes a maioria dos oligos pode ficar presa no compartimento endossomal ou ser expelido através de exocitose (PARTRIDGE et al, 1996; SUMMERTON, 1999). No entanto, a microinjeção é o sistema de

transfecção mais eficiente para morfolidos (NASEVICIUS, EKKER, 2000). Geralmente, são injetados em embriões no estágio de 1 a 8 células, porque: (1) o citoplasma que conecta as células nesse estágio embrionário permite a difusão dos morfolidos, resultando em uma entrega ubíqua; (2) a característica de resistência às enzimas citoplasmáticas dificulta sua eliminação pela célula e progênie (BILL et al, 2009). Entretanto, a concentração decai no decorrer do desenvolvimento. Algumas vezes pode ser necessário a utilização de métodos que suplementem essa diminuição como a eletroporação (EISEN, SMITH, 2008).

MOs são utilizados como ferramenta para gerar *knockdown*, através de bloqueio de mRNA, alteração no *splicing* de pré-mRNAs e até através bloqueio dos sítios de ligação das snRNP (MORCOS, 2007). Draper et al (2001) demonstraram que MOs que alvejam junções exon-intron modificam *splicing* e causam deleção de exon no mRNA final. No entanto, observaram, além do fenótipo desejado, outros fenótipos relacionados com a dose de MO. Morcos (2007) aprofundou mais a questão e desenvolveu linhas gerais sobre a modificação de *splicing* com a utilização de MOs.

Evans et al. (2005) realizaram microinjeções de MOs antisense para mRNA da proteína *hsp70*. Em primeiro lugar, realizaram experimentos para ajustar a concentração dos morfolidos. Embriões que foram injetados com uma baixa concentração de morfolidos (2,25 µg/µL) não mostraram penetrância do fenótipo desejado, enquanto que concentrações mais altas (4,50 µg/µL) desencadearam efeitos tóxicos e taxa de mortalidade aumentada. No entanto, mesmo nas concentrações ideais, os morfolidos não puderam suprimir completamente a expressão da proteína devido à alto nível de expressão da proteína durante os tratamentos e ao fato de que os morfolidos degradam e diluem-se durante o desenvolvimento embrionário. O conteúdo de C+G dos morfolidos afetou a penetrância do fenótipo, sendo que o morfolido com menor conteúdo de C+G resultou em menor penetrância do fenótipo em comparação

com o morfolino de maior conteúdo, onde 63% do embriões desenvolveram o fenótipo desejado.

Apesar da especificidade dos MOs, muitos pesquisadores se deparam com diversos fenótipos, às vezes sem qualquer relação com o gene de estudo, dependentes a dose dos oligômeros. Isso pode dar-se em decorrência: do acúmulo de proteínas de meia vida longa, que atingem uma concentração mínima de funcionamento e do polimorfismo de sequencias genicas de algumas linhagens, pois isso dificulta o desenho e o uso dos MOs. Geralmente são injetados em doses que variam de 1,5 a 6 ng, portanto, no uso dos morfolinos é necessário verificar o efeito fenótipo-dose (BILL et al, 2009). Além disso, Faucherre e López-Schier (2011) demonstraram que a repressão do gene *gal4* e um transgene através do uso de morfolinos se deu de maneira dose-dependente. Esses achados demonstram a necessidade da otimização da dose de MOs para o experimento, pois é difícil prever a efetividade real da sequencia antisense na célula (SUMMERTON, 1999)

Frequentemente, as técnicas antisense sofrem com o efeito *off target*, isto é, a sequência antisense interage com sequências que não são o alvo e, com isso, geram fenótipos indesejados. Por isso é importante desenvolver metodologias para verificar quão efetivo foi o *knockdown*, a ocorrência e probabilidade de efeitos *off target* e desenvolver tecnologias que permitam a reprodutibilidade da inserção de volumes precisa. Alguns métodos utilizados para contornar alguns dos problemas são o uso de anticorpos, hibridização de RNA e PCR, por exemplo (EISEN, SMITH, 2008).

MOs são ferramentas preciosas para testar e estudar interações gênicas *in vivo* (NASEVICIUS, EKKER, 2000). Assim como outras técnicas, a utilização de MOs possui vantagens e desvantagens que devem ser pesadas antes da utilização na pesquisa. No caso dos morfolinos, o fato de possuírem metodologia e características descritas representa uma grande vantagem para o uso.

## Conclusão

*Danio rerio* ou zebrafish, é um peixe que tem um enorme potencial para transgenia pelas vantagens que representa em relação a outros modelos, a exemplo o camundongo. Isso é refletido na grande variedade de estudos que são realizados com esse modelo — estudos sobre câncer, embriogênese, morfogênese, expressão de genes e proteínas. Em grande parte dos estudos a microinjeção é a técnica de geração de animais transgênicos, pois possui uma relação trabalho x dificuldade inferior à outras técnicas e as taxas de transgenia são melhores embora o mosaïcismo seja inerente.

Numa visão simplista, a transgenia poderia ser dividida em três grandes áreas: transfecção, integração e expressão. Enquanto que o uso de promotores, ribozimas e morfólino são utilizados como métodos para alteração da expressão de um alvo de transgenia, outros métodos, como a utilização de transposons e vetores virais, procuram o aumento da integração, além da possibilidade de geração de animais mutantes. Mas esses métodos todavia não conseguem atravessar a membrana celular sozinhos, sendo então, utilizados juntos a uma técnica de transfecção do qual a microinjeção, SMGT e eletroporação fazem parte. O uso combinado de vários métodos fica passível à otimização do experimento. E mesmo atingindo essa otimização, alguma desvantagem, inerente aos métodos utilizados, pode diminuir a taxa de transgênese, de integração, número de inserções no genoma e/ou expressão do transgene.

Portanto, o desenvolvimento de melhorias nas ferramentas dessas três áreas — transfecção, integração e expressão — causará um aumento na velocidade e na qualidade da produção do zebrafish transgênico além de facilitar a manutenção e estabelecimento das linhagens criadas.

## REFERÊNCIAS

- ALLEN, Jonathan P.; NEELY, Melody N. Trolling for the ideal model host: zebrafish take the bait. **Future microbiology**, v.5, p.563-569, abr. 2010. Available from: <http://www.pnas.org/content/104/33/13379.full.pdf+html>. Accessed: jul 27, 2012. doi: 10.1073/pnas.0700926104
- AMSTERDAM, Adam et al. Retroviral-mediated insertional mutagenesis in zebrafish. **Methods in Cell Biology**, n.104, p.59-82, nov. 2011. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123748140000045>. Accessed: jul 27, 2012. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-374814-0.00004-5>
- ASAKAWA, Kazuhide et al. Genetic dissection of neural circuits by Tol2 transposon-mediated Gal4 gene and enhancer trapping in zebrafish. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, n.105, p.1255-1260, jan. 2008. Available from: <http://www.pnas.org/content/105/4/1255.full.pdf+html>. Accessed: jul 27, 2012. doi: 10.1073/pnas.0704963105
- BALCIUNAS, Darius et al. Harnessing a high cargo-capacity transposon for genetic applications in vertebrates. **Public Library of Science One**, v.2, p.1715-1724, nov. 2006. Available from: <http://www.pnas.org/content/105/4/1255.full.pdf+html>. Accessed: jul 27, 2012. doi: 10.1073/pnas.0704963105
- BILL, Brent R. et al. A primer for morpholino use in Zebrafish. **Zebrafish**, v.6, p.69-77, mar. 2009. Available from: <http://online.liebertpub.com/doi/pdfplus/10.1089/zeb.2008.0555>. Accessed: jul 27, 2012. doi: 10.1089=zeb.2008.0555
- BRAMLAGE, Birgit et al. Designing for the inhibition of gene expression. **Trends in Biotechnology**, v.16, p.434-438, out. 1998. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167779998012360>. Accessed: jul 27, 2012. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0167-7799\(98\)01236-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0167-7799(98)01236-0)
- CULP, Patricia et al. High-frequency germ-line transmission of plasmid DNA sequences injected into fertilized zebrafish eggs. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, n.88, p. 7953-7957, set. 1991. Available from: <http://www.pnas.org/content/88/18/7953.full.pdf+html>. Accessed: jul 27, 2012. doi: indisponível.
- DAVIDSON, Ann E. et al. Efficient gene delivery and gene expression in zebrafish using the sleeping beauty transposon. **Developmental Biology**, v.263, p.191-202, set. 2003. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/journal/00121606/263/2>. Accessed: jul 27, 2012. doi: 10.1016/S0012-1606(03)00439-1
- DING, Cun-Bao et al. Zebrafish as a potential model organism for drug test against hepatitis C Virus. **Public Library of Science One**, v.6, p.1-8, ago. 2011. Available from: <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0022921>. Accessed: jul 27, 2012. doi: 10.1371/journal.pone.0022921

DOHERTY, Elizabeth A.; DOUDNA, Jennifer A. Ribozyme structures and mechanisms. **Annual Reviews Biochemistry**, n.69, p.597-615, jun. 2000. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev.biochem.69.1.597>. Accessed: jul 27, 2012. doi: 10.1146/annurev.biochem.69.1.597

DRAPER, Bruce W. et al. Inhibition of zebrafish fgf8 pre-mRNA splicing with morpholino oligos: a quantifiable method for gene knockdown. **Genesis**, v.30, p.154-156, jul. 2001. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/gene.1053/pdf>. Accessed: jul 27, 2012. doi: 10.1002/gene.1053

DUBENDORFF, John W.; STUDIER, William F. Creation of a T7 autogene: cloning and expression of the gene for bacteriophage T7 RNA polymerase under control of its cognate promoter. **Journal of Molecular Biology**, n.219, p.61-68, jun. 1991. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0022283691908573>. Accessed: jul 27, 2012. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0022-2836\(91\)90857-3](http://dx.doi.org/10.1016/0022-2836(91)90857-3)

EISEN, Judith S.; SMITH, James C. Controlling morpholino experimentes: don't stop making antisense. **Development**, v.135, p.1735-1743, maio. 2008. Available from: <http://dev.biologists.org/content/135/10/1735.full.pdf+html>. Accessed: jul 27, 2012. doi: 10.1242/dev.001115

EVANS, Tyler G. et al. Zebrafish Hsp70 is required for embryonic lens formation. **Cell Stress & Chaperones**, v.10, p.66-78, mar. 2005. Available from: <http://www.bioone.org/toc/cest/10/1>. Accessed: jul 27, 2012. doi: <http://dx.doi.org/10.1379/CSC-79R.1>

FAUCHERRE, Adèle; LÓPEZ-SCHIER, Hernán. Delaying Gal4-driven gene expression in the zebrafish with morpholinos and gal80. **Public Library of Science One**, v.6, p.1-10, jan. 2011. Available from: <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0016587>. Accessed: jul 27, 2012. doi: 10.1371/journal.pone.0016587

FUKUDA, Masatora et al. A strategy for developing a hammerhead ribozyme for selective RNA cleavage depending on substitutional RNA editing. **RNA**, jul. 2012. Available from: <http://rnajournal.cshlp.org/content/early/2012/07/12/rna.033399.112.abstract>. Accessed: jul 27, 2012. doi: 10.1261/rna.033399.112

GAIANO, Nicholas et al. Highly efficient germ-line transmission of proviral insertions in zebrafish. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**. n.93, p. 7777-7782, jul. 1996. Available from: <http://www.pnas.org/content/93/15/7777.full.pdf+html>. Accessed: jul 27, 2012. doi: indisponível.

GOLDSMITH, J. R.; JOBIM, Christian. Think small: zebrafish as a model system of human pathology. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v.2012, p.1-12, mar. 2012. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/jbb/2012/817341/>. Accessed: jul 27, 2012. doi: 10.1155/2012/817341

HALL, Chris et al. The zebrafish lysozyme C promoter drives myeloid-specific expression in transgenic fish. **Biomed central Developmental Biology**, v.7, p.1-17, maio. 2007. Available from: <http://www.biomedcentral.com/bmcdevbiol/content/7/May/2007>. Accessed: jul 27, 2012. doi: 10.1186/1471-213X-7-42

HUDZIAK, Robert M. et al. Resistance of morpholino phosphorodiamidate oligomers to enzymatic degradation. **Antisense & Nucleic Acid Drug Development**, v.6, p.267-272, jan. 1996. Available from: <http://online.liebertpub.com/toc/oli.1/6/4>. Accessed: jul 27, 2012. doi: 10.1089/oli.1.1996.6.259

IZSVÁK, Zsuzsanna et al. Sleeping beauty, a wide host-range transposon vector for genetic transformation in vertebrates. **Journal of Molecular Biology**, v.302, p.93-102, set. 2000. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283600940476>. Accessed: jul 27, 2012. doi: <http://dx.doi.org/10.1006/jmbi.2000.4047>

KAWAKAMI, Koichi; SHIMA, Akihiro. Identification of the tol2 transposase of the medaka fish *Oryzias latipes* that catalyzes excision of a nonautonomous tol2 element in zebrafish *Danio rerio*. **Gene**, v.240, p.239-244, nov. 1999. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037811999004448>. Accessed: jul 27, 2012. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1119\(99\)00444-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1119(99)00444-8)

KAWAKAMI, Koichi et al. Identification of a functional transposase of the tol2 element, an Ac-like element from the Japanese medaka fish, and its transposition in the zebrafish germ lineage. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**. n.97, p. 11403-11408, out. 2000. Available from: <http://www.pnas.org/content/97/21/11403.full.pdf+html>. Accessed: jul 27, 2012. doi: 10.1073/pnas.97.21.11403

KOGA, Akihiko et al. Vertebrate DNA transposon as a natural mutator: the medaka fish tol2 element contributes to genetic variation without recognizable traces. **Molecular Biology and Evolution**, v.23, p.1414-1419, jul. 2006. Available from: <http://mbe.oxfordjournals.org/content/23/7.toc>. Accessed: jul 27, 2012. doi: 10.1093/molbev/msl003

KURITA, Kayoko et al. Transgenic zebrafish produced by retroviral infection of in vitro cultured sperm. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.101, p.1263-1267, fev. 2004. Available from: <http://www.pnas.org/content/101/5.toc>. Accessed: jul 27, 2012. doi: 10.1073/pnas.0304265101

KWAN, Kristen M. et al. The Tol2kit: a multisite gateway-based construction kit for tol2 transposon transgenesis constructs. **Developmental Dynamics**, v.236, p.3088-3099, nov. 2007. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/dvdy.21343/abstract>. Accessed: jul 27, 2012. doi: 10.1002/dvdy.21343

LARGAESPADA, David A. Generating and manipulating transgenic animals using transposable elements. **Reproductive Biology and Endocrinology**, n1, p.1-10, nov. 2003. Available from: <http://www.rbej.com/content/pdf/1477-7827-1-80.pdf>. Accessed: jul 27, 2012. doi: 10.1186/1477-7827-1-80

LE, Xiuning et al. Heat shock-inducible Cre/Lox approaches to induce diverse types of tumors and hyperplasia in transgenic zebrafish. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, n.104, p. 9410-9415, maio. 2007. Available from: <http://www.pnas.org/content/104/22.toc>. Accessed: jul 27, 2012. doi: 10.1073/pnas.0611302104

LYNGSTADAAS, Peter S. Synthetic hammerhead ribozymes as tools in gene expression. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v.12, p.469-478, jan. 2001. Available from: <http://cro.sagepub.com/content/12/6/469.full.pdf+html>. Accessed: jul 27, 2012. doi: 10.1177/10454411010120060201

MÁTÉS, Lajos et al. Molecular evolution of a novel hyperactive Sleeping Beauty transposase enables robust stable gene transfer in vertebrates. **Nature Genetics**, v.41, p.753-761, jun. 2009. Available from: <http://www.nature.com/ng/journal/v41/n6/pdf/ng.343.pdf>. Accessed: jul 27, 2012. doi: 10.1038/ng.343

McGRAIL, Maura et al. Somatic mutagenesis with a sleeping beauty transposon system leads to solid tumor formation in zebrafish. **Public Library of Science One**, v.6, p.1-14, abr. 2011. Available from: <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0018826>. Accessed: jul 27, 2012. doi: 10.1371/journal.pone.0018826

MORCOS, Paul A. Achieving targeted and quantifiable alteration of mRNA splicing with morpholinos oligos. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.358, p.521-527, jun. 2007. Available from: . Accessed: jul 27, 2012. doi:

MUÑOZ-LÓPEZ, Martín; GARCÍA-PÉREZ, José. Dna Transposons: Nature and applications in genomics. **Current Genomics**, v.11, p.115-128, abr. 2010. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X07008935>. Accessed: jul 27, 2012. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.04.172>

NASEVICIUS, Aidias; EKKER, Stephen C. Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish. **Nature Genetics**, v26, p.216-220, out. 2000. Available from: <http://www.nature.com/ng/journal/v26/n2/index.html>. Accessed: jul 27, 2012. doi: 10.1038/79951

NEWMAN, Morgan; LARDELLI, Michael. A hyperactive sleeping beauty transposase enhances transgenesis in zebrafish embryos. **Biomed Central Research Notes**, v.3, p.1-4, nov. 2010. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1756-0500/3/282>. Accessed: jul 27, 2012. doi: 10.1186/1756-0500-3-282

PARTRIDGE, Michael et al. A simple method for delivering morpholino antisense oligos into the cytoplasm of cells. **Antisense & nucleic Acid Drug Development**, v.6, p.169-175, set. 1996. Available from: <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/oli.1.1996.6.169>. Accessed: jul 27, 2012. doi: 10.1089/oli.1.1996.6.169

ROSEN, Jonathan N. et al. Microinjection of zebrafish embryos to analyze gene function. **Journal of Visualized Experiments**, v.25, p.1-4, mar. 2009. Available from: <http://www.jove.com/video/1115/microinjection-of-zebrafish-embryos-to-analyze-gene-function>. Accessed: jul 27, 2012. doi: 10.3791/1115



- RAMBABU, K. Murali et al. Efficient expression of transgenes in adult zebrafish by electroporation. **Biomed Central Biotechnology**, v.5, p.1-6, out. 2005. Available from: <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1472-6750-5-29.pdf>. Accessed: jul 27, 2012. doi: 10.1186/1472-6750-5-29
- SEEHAFER, Carsten et al. From alpaca to zebrafish: Hammerhead ribozymes wherever you look. **RNA**, v.17, p.21-26, jan. 2011. Available from: <http://rnajournal.cshlp.org/content/17/1/21.full.pdf+html>. Accessed: jul 27, 2012. doi: 10.1261/rna.2429911
- STEIN, David et al. A specificity comparison of four antisense types: morpholino, 2'-O-Methyl RNA, DNA and phosphorothioate DNA. **Antisense & Nucleic Acid Drug Development**, v.7, p.151-157, jun. 1997. Available from: <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/oli.1.1997.7.151>. Accessed: jul 27, 2012. doi: 10.1089/oli.1.1997.7.151
- SUMMERTON, James et al. Morpholino and phosphorothioate antisense oligomers compared in cell-free and in-cell systems. **Antisense & Nucleic Acid Drug Development**, v.7, p.63-70, abr. 1997. Available from: <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/oli.1.1997.7.63>. Accessed: jul 27, 2012. doi: 10.1089/oli.1.1997.7.63
- SUMMERTON, James. Morpholino antisense oligomers: the case for an RNase H-independent structural type. **Biochimica et Biophysica Acta – Gene Structure and Expression**, v.1489, p.141-158, dez. 1999. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167478199001505>. Accessed: jul 27, 2012. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0167-4781\(99\)00150-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0167-4781(99)00150-5)
- SUMMERTON, James, WELLER, Dwight. Morpholino antisense oligomers: design, preparation and properties. **Antisense & Nucleic Acid Drug Development**, v.7, p.187-195, jun. 1997. Available from: <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/oli.1.1997.7.187>. Accessed: jul 27, 2012. doi: 10.1089/oli.1.1997.7.187
- SUSSMAN, Raquel. DNA repair capacity of zebrafish. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, n.104, p. 13379-13383, ago. 2007. Available from: <http://www.pnas.org/content/104/33/13379.full.pdf+html>. Accessed: jul 27, 2012. doi: 10.1073/pnas.0706157104
- URASAKI, Akihiro et al. Efficient transposition of the *Tol2* transposable element from a single-copy donor in zebrafish. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, n.105, p.19827-19832, dez. 2008. Available from: <http://www.pnas.org/content/105/50/19827.full.pdf+html>. Accessed: jul 27, 2012. doi: 10.1073/pnas.0810380105
- URASAKI, Akihiro et al. Functional dissection of the *Tol2* transposable element identified the minimal cis-sequence and a highly repetitive sequence in the subterminal region essential for transposition. **Genetics**, v.174, p.639-649, out. 2006. Available from: <http://www.genetics.org/content/174/2/639.full.pdf+html>. Accessed: jul 27, 2012. doi: 10.1534/genetics.106.060244

WALKER, Kelly et al. Cytoplasmic expression of ribozyme in zebrafish using a T7 autogene system. **Current Issues in Molecular Biology**, v.3, p.1-6, jan. 2001. Available from: <http://www.horizonpress.com/cimb/v/v3/v3n101.pdf>. Accessed: jul 27, 2012. doi: indisponível.

WELCH, Peter J. et al. Expression of ribozymes in gene transfer systems to modulate target RNA levels. **Current opinion in Biotechnology**, v.9, p.486-496, out. 1998. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958166998800347>. Accessed: jul 27, 2012. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0958-1669\(98\)80034-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0958-1669(98)80034-7)

WHITE, Richard M. et al. Transparent adult zebrafish as a tool for in vivo transplantation analysis. **Cell Stem Cell**, v.7, p.183-189, fev. 2008. Available from: [http://www.cell.com/cell-stem-cell/abstract/S1934-5909\(07\)00275-5](http://www.cell.com/cell-stem-cell/abstract/S1934-5909(07)00275-5). Accessed: jul 27, 2012. doi: 10.1016/j.stem.2007.11.002

WIXON, Jo. Danio rerio, the zebrafish. **Yeast**, n.17, p.225-231, set. 2000. Available from: [http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1097-0061\(20000930\)17:3%3C225::AID-YEA34%3E3.0.CO;2-5/pdf](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1097-0061(20000930)17:3%3C225::AID-YEA34%3E3.0.CO;2-5/pdf). Accessed: jul 27, 2012. doi: 10.1002/1097-0061(20000930)17:3<225::AID-YEA34>3.0.CO;2-5

XIE, Yuefeng et al. A ribozyme-mediated, gene “knockdown” strategy for the identification of gene function in zebrafish. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, n.94, p. 13777-13781, dez. 1997. Available from: <http://www.pnas.org/content/94/25/13777.full.pdf+html>. Accessed: jul 27, 2012. doi: indisponível.

### **3 TOXICIDADE AGUDA DE METAIS PARA O MICROCRUSTÁCEO *Artemia sp.***

#### **3.1 Introdução**

O presente trabalho foi desenvolvido em conjunto com as alunas do programa de pós-graduação em fisiologia animal comparada Marcela Alvez e Geny Afonso. Foi escrito um resumo enviado à um congresso para apresentação de pôster (Anexo A).

A contaminação proveniente das atividades antrópicas, como atividades urbanas, industriais, portuárias e da mineração, está afetando o ambiente hídrico, atmosférico e terrestre através do lançamento de dejetos, na qual, muitos destes tem alto potencial tóxico. A partir dessa contaminação a comunidade ecológica sofre os efeitos. Dentre os contaminantes que atingem a região costeira, encontram-se os metais, que quando se encontram na forma de íons metálicos são os de maior preocupação, visto que são os mais disponíveis à biota (CROSS & SUNDA, 1982).

Os metais podem ser encontrados naturalmente no ambiente ou em níveis maiores a partir das atividades antrópicas. O uso de metais tem sido crítico para o progresso e sucesso da civilização humana (KLAASSEN, 2008). São utilizados para diversos fins pelo homem, e por essa razão evitar o contato e a exposição é bastante complicado. O resultado dessa utilização muitas vezes é o despejo destes contaminantes no ambiente, o que acaba alterando a forma do metal, podendo disponibilizá-lo de um modo com maior ou menor grau de toxicidade e persistência no ambiente. O ambiente aquático é uma das áreas mais atingidas, pois recebe grande parte da contaminação que contém não só metais como outros compostos, e esses podem se tornar biodisponíveis para a biota, podendo assim, causar danos aos organismos presentes no local. A emissão de metais no Brasil é regulamentada pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) através da Resolução 357/05.

No presente estudo, utilizamos dois metais que tem uma grande importância na área da Toxicologia, como o cádmio (Cd) e o chumbo (Pb).

O cádmio é um metal de transição branco azulado, dúctil e maleável (SIENKO, 1976). Mesmo em concentrações muito baixas ele consegue exercer seu efeito tóxico, sendo assim considerado como um dos metais mais tóxicos. Na maioria das vezes, é encontrado junto com o zinco na natureza. Sua entrada no ecossistema pode ser de maneira indireta através do escoamento de locais de despejo de lixo e campos agrícolas, e de maneira direta, por efluentes de estações de esgoto, indústrias de fundição e minas. É um elemento que bioacumula, porém não existem dados que comprovem sua biomagnificação. Como exemplo de efeito, esse metal induz a síntese de metalotioneínas (proteína de alta afinidade de ligação a metais), podendo ser armazenado no fígado na forma MT-Cádmio. Apesar de armazenado, pode haver a remobilização do tecido e o Cd ser liberado, podendo exercer sua toxicidade, causando dano em diversos tecidos (PATRA, 2011).

O chumbo é um metal pesado, macio, maleável, de baixa condutividade elétrica e resistente a corrosão. Inicialmente apresenta uma coloração branco-azulada, e quando exposto ao ar muda para uma cor acinzentada (SIENKO, 1976). Sua fonte para a biota é através do ar, do solo/sedimento e da água. E sua entrada no ambiente se deve principalmente pela deposição atmosférica, lixiviação, materiais utilizados em pesca e em materiais de construção e efluentes de indústrias de baterias. Sua toxicidade inclui efeitos como a inibição de enzimas que resultam em patologias graves ou a morte (GOYER, 1990).

No estudo, foi determinada a toxicidade aguda dos metais cádmio e chumbo para náuplios de *Artemia sp.* A *Artemia* é um microcrustáceo da ordem Anostraca que vive em lagos salinos e salgados, devido ao mecanismo de osmoregulação da glândula secretora de sal (GAJARDO, BEARDMORE, 2012), podendo ser encontrada em todos os continentes. Seus cistos são de baixo custo e permanecem viáveis por vários anos no estado seco, além de serem facilmente encontrados no comércio (MEYER *et al.*, 1982 *apud* LHULLIER *et al.*, 2006).

### 3.2 Materiais e métodos

Náuplios de *Artemia* foram colocados em frascos, contendo 50mL de água do mar à salinidade 30, e expostos a cinco concentrações de ambos os metais testados, mais os grupos controle, onde cada tratamento teve um N=15 (Fig. 1). As concentrações utilizadas de Cd foram 10 µg/L, 30 µg/L, 90 µg/L, 270 µg/L, 810 µg/L e de Pb foram 10 µg/L, 20 µg/L, 40 µg/L, 80 µg/L e 160 µg/L. Para ambos os metais as concentrações foram determinadas de acordo com valores determinados para outros microcrustáceos. A mortalidade desses organismos foi observada após 24h de exposição. A determinação das CL50 (testes de toxicidade aguda) foi realizada através do método dos Probitos (FINNEY, 1971; EPA Probit Analysis Program version 1.5), adotando-se intervalo de confiança de 95%.

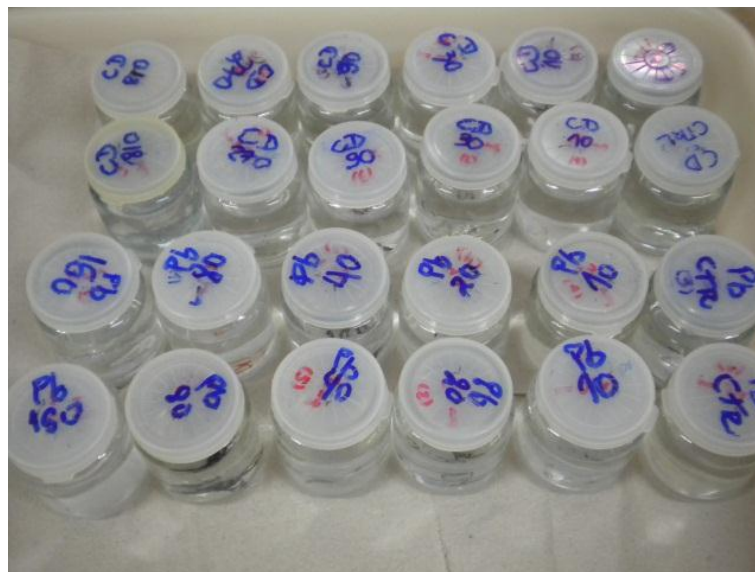


Figura 1 - Foto dos frascos, e suas respectivas concentrações, utilizados no experimento. FONTE: Fernando Alvez.

### 3.3 Resultados

Os resultados obtidos mostraram que a CL50-24h para o Cd foi de 169,815 µg/L e para o Pb foi de 132,061 µg/L. Logo, Pb foi mais tóxico para a *Artemia sp.* do que o Cd.

### 3.4 Conclusão

Os náuplios nas maiores concentrações mostraram-se sensíveis no teste de toxicidade. Nenhum dos dois metais é essencial aos organismos, e os seus mecanismos de toxicidade podem estar relacionados à interferência no transporte de cálcio, conforme descrito para outros crustáceos. No entanto, apesar do cádmio ter sido descrito como mais tóxico para outras espécies (), os náuplios de artemia foram afetados pelo chumbo. São necessários mais testes — para aferir o comportamento desses metais no metabolismo do nauplio e identificar a razão pelo qual o cádmio foi menos tóxico — e utilizar outros metais e tempos diferentes, para que os náuplios desta espécie possam ter um protocolo padronizado, já que os protocolos existentes tratam do cultivo de *Artemia* e da fase adulta.

## **4 RELATÓRIO DO PERÍODO DE ESTÁGIO SUPERVISIONADO**

### **4.1 Introdução**

O presente capítulo tem intenção de descrever técnicas realizadas durante o período de estágio supervisionado que abrange o período de março a julho do ano de 2012. O estágio ocorreu no Laboratório de Biologia Molecular que se situa no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Rio Grande FURG (Fig. 2) de março a julho de 2012, totalizando 272h. O Laboratório de Biologia Molecular realiza atividades de pesquisa e ensino e tem como professor responsável o Prof. Dr. Luis Fernando Fernandes Marins e como técnica responsável Loraine Moraes. O estágio constou de acompanhamento de atividades realizadas pelo Dr. Márcio Figueiredo e pelo aluno do curso de Bacharelado em Biologia Guilherme Sansão.



Figura 2 - Foto do Laboratório de Biologia Molecular. FONTE: Fernando Alvez

## 4.2 Transformação de bactéria termocompetente

A transformação consiste em inserir um plasmídeo dentro de uma bactéria pertencente a uma determinada cepa. O plasmídeo, geralmente, contém um gene que confere resistência a um antibiótico: isso permite a reprodução, no meio de cultivo, exclusiva dos microorganismos que contém o plasmídeo. Além disso, a quantidade de plasmídeo é aumentada consoante a reprodução bacteriana. Esse método era utilizado como etapa prévia para a extração plasmidial. Era realizado uma vez a cada duas semanas.

O processo inicia quando se liga o bico de bunsen. Colocou-se 1µL (microlitro) de plasmídeo em um tubo de 15mL (mililitros) contendo 5mL de meio de cultivo Caldo Lisogenico (LB) e a seguir adiciona-se 50µL de bactéria *Escherichia coli* termocompetente. Misturava-se através da inversão do tubo.

Incubava-se o tubo no gelo por 20min e então executávamos o choque térmico colocando o tubo em banho maria por 50seg a 42°C. Retornando o tubo ao gelo por 2min.

Pipetava-se 250µL de meio de cultivo SOC (caldo super ótimo com repressão catabolítica) misturando gentilmente através de inversão do tubo. Colocava-se o tubo no aparelho shaker por 1h e 30min a 150rpm e 37°C.

## 4.3 Plaqueamento de Bactéria Transformada

O plaqueamento era realizado sempre após a transformação bacteriana. Com a adição do antibiótico, pode-se coletar apenas as colônias transformadas — uma vez que o antibiótico elimina as bactérias que não possuem resistência ao antibiótico.

Colocou-se 15mL de LB em 3 tubos falcon a ±60C e logo em seguida colocou-se 15µL de kanamicina a 50mg/µL (microgramas por microlitros). Misturou-se através de inversão e despejou-se em 3 placas de petri deixando secar próximo ao bico de bunsen.



Pipetar para a placa 100 $\mu$ L de bactérias transformadas e incubar a placa a 37°C por 30min. Virar a placa com a tampa voltada para baixo e deixar na estufa a 37°C overnight.

#### **4.4 Cultivo em meio líquido de bactéria transformada**

O cultivo era realizado posterior ao plaqueamento e permite o aumento da quantidade bacteriana para a extração plasmidial.

Preparou-se um tubo de 15mL com 6mL de LB líquido junto de 6 $\mu$ L de kanamicina a 50mg/ $\mu$ L. A partir de uma placa de petri que continha colônias das bactérias transformadas se coletou, com a ponteira, uma colônia e lavou-se a ponteira no tubo com o meio de cultivo líquido — liberando a colônia selecionada.

Misturou-se através de inversão e colocou-se no shaker em 200rpm a 30C overnight.

#### **4.5 Extração de plasmídeo**

A extração de plasmídeo foi realizada utilizando o Illustra plasmidPrep mini spin kit® da empresa GE Healthcare. O objetivo da técnica é de recuperar o plasmídeo utilizado na transformação bacteriana. Essa técnica era realizada em média uma vez por semana.

Primeiro colocou-se 1mL do cultivo de bactéria que cresceu overnight em um tubo de 1,5mL e peletaram-se as bactérias através de centrifugação a 17203g durante 30seg, depois descartando todo o sobrenadante. Realizou-se o procedimento até que não houve mais nenhuma quantidade do cultivo.

Ressuspendia-se as bactérias com 175 $\mu$ L do tampão de lise número 7 através de agitação severa utilizando um vortex. A resuspensão incompleta acarretaria na diminuição da quantidade de DNA (ácido desoxyribonucleotídeo) obtida.

A seguir, adicionava-se 175 $\mu$ L do tampão número 8, que contém hidróxido de sódio na sua formulação, e misturava-se gentilmente através de inversão do tubo, por mais ou menos 5 vezes, até que a solução fique clara e viscosa.

Adicionou-se 350µL do tampão de lise 9 e misturou-se imediatamente através de inversão até que o precipitado dispersava-se, caso houvesse. Centrifugava-se a 16000g por 4min e colocava-se uma coluna de purificação em um tubo de coleta.

Transferia-se o sobrenadante, aproximadamente 700µL, para a coluna centrifugando novamente a 16000g por 30seg. descartava-se o líquido que atravessara o tubo.

Adicionou-se 400µL de tampão de lavagem tipo 1 para a coluna de purificação e centrifugou-se à velocidade máxima por 1min. Descartou-se o líquido que atravessara junto do tubo de coleta.

Transferiu-se a coluna para um tubo de 1,5mL definitivo e adicionou-se 100µL de tampão de eluição tipo 4 para o centro da coluna. A seguir incubou-se por 30seg a temperatura ambiente e microcentrifugou-se a 16000 por 30seg. guardava-se o diluído a -20°C.

#### **4.6 Reação em cadeia da polimerase (PCR)**

Para realização da reação em cadeia da polimerase, separaram-se tubos de 500µL, primer *forward* e *reverse*, taq DNA polimerase, nucleotídeos desoxinucleotídeo trifosfato (dNTPs), tampão 50mM de cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>), tampão 10 vezes concentrado de PCR, água ultra purificada e amostra de DNA, que era plasmídeo extraído de cultivo de bactérias transformadas. Essa técnica era realizada de duas a quatro vezes por semana.

Foi calculada uma quantia de dez reações mais duas reações extras devido ao erro acumulativo de pipetagem. Em um tubo em comum, chamado mix, pipetou-se 20pmol de primer forward (6µL), 20pmol de primer reverse (6µL), 6µL de Taq DNA polimerase platinum Hi fidelity (Invitrogen), 30µL de tampão 10x, 4,3µL de MgCl<sub>2</sub>, 24µL de dNTPs e 61,5µL de água ultrapura.

A seguir foram separados 10 tubos e colocados 11,5µL de solução do tubo Mix para esses tubos. Então 1µL do DNA da amostra era colocado dentro do tubo de reação e os tubos eram brevemente agitados com uso do vortex e centrifugados.

Depois, eram colocados em um termociclador sob ação de um programa de PCR já existente.

#### **4.7 Restrição Enzimática**

Essa etapa era realizada posteriormente à PCR para confirmação do plasmídeo através de eletroforese.

A restrição de plasmídeo foi realizada com a enzima *BamHI*. Em tubo nomeado, colocou-se 17 $\mu$ L de água livre de nuclease e a seguir adicionou-se 2 $\mu$ L de solução tampão que acompanha a enzima. Então pipetou-se 10 $\mu$ L do produto de PCR, no caso o plasmídeo, e por fim 1 $\mu$ L da solução enzimática.

As soluções eram misturadas no tubo com a ajuda de vortex e depois eram centrifugadas brevemente. A seguir o tubo era incubado em termociclador a 37°C por 10min e para inativação da enzima a 80°C a 7min.

#### **4.8 Ligação Enzimática**

Em um tubo de 500 $\mu$ L, colocou-se 5 $\mu$ L de água ultrapura livre de nuclease, 10 $\mu$ L do inserto desejado, no caso o gene que codifica a proteína verde fluorescente (GFP), 2 $\mu$ L do vetor Tol2 transposase, 2 $\mu$ L de solução tampão 10x para ligase e 1 $\mu$ L de T4 DNA ligase.

Em seguida, incubou-se o tubo a 22°C durante 1h e após a incubação fez-se uma eletroforese da reação.

#### **4.9 Eletroforese em gel de agarose**

Em um erlenmeyer colocar 480mg de agarose em pó e adicionar 60mL de tampão tris-borato-EDTA (TBE), ou o mesmo tampão da cuba de eletroforese, e colocar no microondas ou banho maria até a fundição completa do pó. Transferir o conteúdo para outro erlenmeyer e colocar 3 $\mu$ L de brometo de etídio e misturar agitando suavemente. Despejar o conteúdo em uma forma e em seguida colocar o pente de poços. Deixar até que haja a polimerização e então remover o pente e o gel da forma.

A seguir, depositava-se o gel em uma cuba de eletroforese com 500mL do mesmo tampão do gel de eletroforese, no caso TBE. Depois, 5 $\mu$ L do produto de PCR adicionados de 3 $\mu$ L de corante e pipetados nos poços formados no gel. Então se ligava a fonte de eletroforese, que emite um campo elétrico unidirecional. A corrente elétrica causa o deslocamento de moléculas, sendo que o tamanho e carga da molécula influenciam na velocidade de deslocamento. Logo, é possível aferir o tamanho de moléculas de DNA através dessa técnica.

#### **4.10 Microinjeção em ovos fertilizados de *Danio rerio***

Quando iniciado o período de luz no biotério, coloca-se no aquário do *Danio rerio* um dispositivo de coleta de ovos chamado armadilha. No período de aproximadamente 50min deve haver a desova, portanto é necessário realizar a checagem da armadilha de 15 em 15min. Quando a armadilha tiver ovos, transferi-los para um béquer diretamente da armadilha.

Antes do período de luz, colocar 20mL de gel de agarose 1% fundido em uma placa de petri. Quando estiver rígido, cortar um sulco com ajuda de uma lâmina. O sulco não deve ser muito profundo nem muito inclinado e consiste de dois cortes um perpendicular ao gel e outro a 45°. Além disso, deve-se preparar as agulhas de injeção a partir dos capilares. Coloca-se o capilar em uma entrada onde o capilar fica preso à um peso e atravessando um dispositivo de aquecimento. A seguir, liga-se o equipamento e duas agulhas são formadas. Pipetar 8 $\mu$ L da solução desejada para a injeção para dentro da agulha. Com a ajuda de uma folha de papel quebrar a agulha delicadamente passando a ponta levemente contra uma margem do papel. Verificar no microscópio a ponta da agulha aberta.

Com uma pipeta de 1mL, pipetar ovos e colocá-los na placa de petri. Posicionar a placa no microscópio e realizar os ajustes necessários até a visualização dos ovos. Verificar a pressão que o equipamento faz na agulha de forma que o líquido dentro da agulha seja liberado e verificar se há liberação de líquido pressionando um pedal conectado ao equipamento. Posiciona-se a agulha contra a micrópila do ovo e aplica-se força de forma que a agulha entre no embrião e

então pressiona-se o pedal. Retira-se a agulha e move-se a placa para o próximo embrião.

Depois colocaram-se os ovos em uma placa de petri até a eclosão.

#### 4.11 Manutenção de *Poecilia vivipara*

Durante todos os dias da semana quatro aquários com peixes da espécie *Poecilia vivipara* (Fig. 3) eram alimentados até a saciedade no início do período de luz do biotério. Além disso, procuravam-se animais mortos no fundo do aquário e procuravam-se animais doentes. Quinzenalmente os aquários eram limpos com uma esponja e água para remover o musgo e antes da limpeza os animais era colocados em um béquer para voltar ao aquário após a remoção do musgo.



Figura 3 - Peixes *Poecilia vivipara*. FONTE: Fernando Alvez

#### 4.12 Manutenção de *Danio rerio*

Realizava-se a verificação do fluxo de água e temperatura do aquário. O fluxo da água era controlado através de uma torneira. A seguir verificava-se se o tecido do filtro do aquário continha falhas ou cortes. Então, com ajuda de uma espátula, dava-se a ração de tamanho adequado à cada período da vida do peixe. A ração era feita da seguinte maneira: com ajuda de um conjunto de três peneiras para

análise de granulometria, a ração era colocada na primeira peneira e macerada com ajuda de um pistilo diretamente na primeira peneira. A ração que caía na segunda peneira era adequada aos animais adultos; a ração que caía na terceira peneira era mais fina e adequada à alimentação dos alevinos; e o pó que ficava no pote coletor era adequado à alimentação das larvas.

Quando um aquário continha musgo era utilizado uma esponja e água para a remoção do musgo, antes disso os animais eram transportados para um béquer com água.

#### **4.13 Cultivo de *Artemia* sp.**

Ovos de *Artemia* sp. liofilizados, obtidos comercialmente, foram colocados em um béquer com água do mar, de salinidade 30, em uma câmara de germinação a 30°C com luz e aeração constante até a eclosão. Então foram utilizados no trabalho descrito no capítulo seguinte.

#### **4.14 Conclusão**

Conclui-se esse capítulo ressaltando a importância do estágio supervisionado, pois com essa atividade podemos por em prática o nosso conhecimento adquirido durante o curso, além de ceder a oportunidade de aprender técnicas aplicadas em projetos científicos. Outro ponto importante é a oportunidade de conhecer e estar sob a influência de pesquisadores e estudantes de pós-graduação. As discussões científicas travadas entre essas pessoas possuem um valor didático equiparável ao de uma sala de aula.

## 5 CONCLUSÕES

O estágio serve para aumentar e qualificar os conhecimentos que são adquiridos no decorrer da graduação. A oportunidade de executar técnicas de laboratório aplicadas a um projeto é indispensável para o aprendizado. Além disso, há o contato com cientistas de diversos níveis acadêmicos — mestrandos, doutourandos, doutores etc. Portanto não é somente um pré-requisito para a obtenção do diploma, execução de técnicas de laboratório e estudo, mas também é um meio de estabelecer relações com outros estudantes, professores e técnicos. O contato dia-a-dia com essas pessoas é de valor inestimável, assim como o vivenciamento da rotina de um laboratório

Um laboratório de experimentação não é somente um local que desenvolve perguntas e respostas destinadas à comunidade científica. É também um lugar que monitora o impacto das atividades antrópicas no meio ambiente e que desenvolve organismos biológicos que permitem a investigação de patologias. Portanto é um lugar onde se desenvolvem conhecimentos aplicáveis à comunidade. Hoje é possível desenvolver, em um curto período de tempo, um zebrafish com características que auxiliem a compreensão acerca do desenvolvimento de tumores e doenças virais que afetam a sociedade, em um laboratório de espaço modesto.

## REFERÊNCIAS

CONAMA – Conselho Nacional do meio Ambiente, 2005, **Resolução CONAMA nº 357, de 11 de março de 2005**. <Disponível em: [www.mma.org.br](http://www.mma.org.br)>

CROSS, S. A. & SUNDA, W. G. The relationship between chemical speciation and bioavailability of trace metals to marine organisms: a review. In: **Proceedings of International Symposium on Utilization of Coastal Ecosystems: Planning, Pollution and Productivity**. Rio Grande: Editora da FURG, 1982. p.169-182.

FINNEY, David J. **Probit Analysis**. 3.ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1971. 333 p.

GAJARDO, Gonzalo M.; BEARDMORE, John A. The brine shrimp *Artemia*: adapted to critical life conditions. **Frontiers in physiology**, n.3, p.1-8, Junho. 2012.

GOYER, R. A. Lead toxicity: From overt to subclinical to subtle health effects. **Environment Health Perspectives**, n.86, p.177–181, Junho. 1990.

KLAASSEN, Curtis D. 2008. **Casarett and Doull's Toxicology - The Basic Science of Poisons**. 7.ed. Estados Unidos: Mcgraw Hill, 2008. P.1331.

LHULLIER, C.; HORTA, P. A.; FALKENBERG, M. Evaluation of macroalgae from Santa Catarinas coast tieh the brine shrimp assay. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, n.16(2), p.158–163, Junho. 2006.



PATRA, R. C.; RAUTRAY, Amiya K.; SWARUP, D. Oxidative stress in lead and cadmium toxicity and its amelioration. **Veterinary Medicine International**, n.2011, p.1-9, Janeiro. 2011.

SIENKO, Michell J. **Química**. 7.Ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1976. 605p.

## **ANEXOS**

**Anexo A — Resumo enviado ao XVII Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia  
(No formato exigido pelo congresso)**

**TOXICIDADE AGUDA DE METAIS PARA O MICROCRUSTÁCEO *Artemia sp.***

Marcela L. Alvez<sup>1</sup>; Geny Biatriz Afonso<sup>1</sup>; Fernando Lopez Alvez<sup>2</sup>; Pablo Elías Martínez<sup>1</sup>

<sup>1</sup> [celinha\\_lopez@hotmail.com](mailto:celinha_lopez@hotmail.com) (Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Rio Grande, Rio Grande do Sul)

<sup>1</sup> [genybiatriz@hotmail.com](mailto:genybiatriz@hotmail.com) (Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Rio Grande, Rio Grande do Sul)

<sup>2</sup> [fernando.lopez.alvez@hotmail.com](mailto:fernando.lopez.alvez@hotmail.com) (Universidade Federal de Pelotas – UFPEL, Pelotas, Rio Grande do Sul)

<sup>1</sup> [pabloeliasm@gmail.com](mailto:pabloeliasm@gmail.com) (Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Rio Grande, Rio Grande do Sul)

A contaminação proveniente das atividades antrópicas está afetando o ambiente hídrico através do lançamento de dejetos, na qual, muitos destes tem alto potencial tóxico. Dentre esses contaminantes, pode-se encontrar os metais, que dependendo de sua forma no ambiente, pode exercer seu efeito tóxico sobre os organismos. No presente estudo, foi determinada a toxicidade aguda dos metais cádmio e chumbo para náuplios de *Artemia sp.*, um microcrustáceo da ordem Anostraca que vive em lagos salinos e salgados podendo ser encontrada em todos os continentes. Os náuplios foram expostos a cinco concentrações de ambos os metais testados, mais os grupos controle, onde cada tratamento teve um N=15. As concentrações utilizadas de Cd foram 10 µg/L, 30 µg/L, 90 µg/L, 270 µg/L, 810 µg/L e de Pb foram 10 µg/L, 20 µg/L, 40 µg/L, 80 µg/L e 160 µg/L. A mortalidade desses organismos foi observada após 24h de exposição. Os resultados obtidos mostraram que a CL50-24h para o Cd foi de 169,815 µg/L e para o Pb foi de 132,061 µg/L. Podemos inferir que o Pb foi mais tóxico para a *Artemia sp.* do que o Cd. Nenhum dos dois metais é essencial aos organismos, e os seus mecanismos de toxicidade podem estar relacionados à interferência no transporte de cálcio, conforme descrito para outros crustáceos. Os náuplios nas maiores concentrações mostraram-se sensíveis no teste de toxicidade, sugerindo que mais testes devem ser feitos, tanto com outros metais quanto com tempos diferentes, para que os náuplios desta espécie possam ter um protocolo padronizado, já que os protocolos existentes tratam do cultivo de *Artemia* e da fase adulta.

Palavras-chave: cádmio, chumbo, CL50-24h.