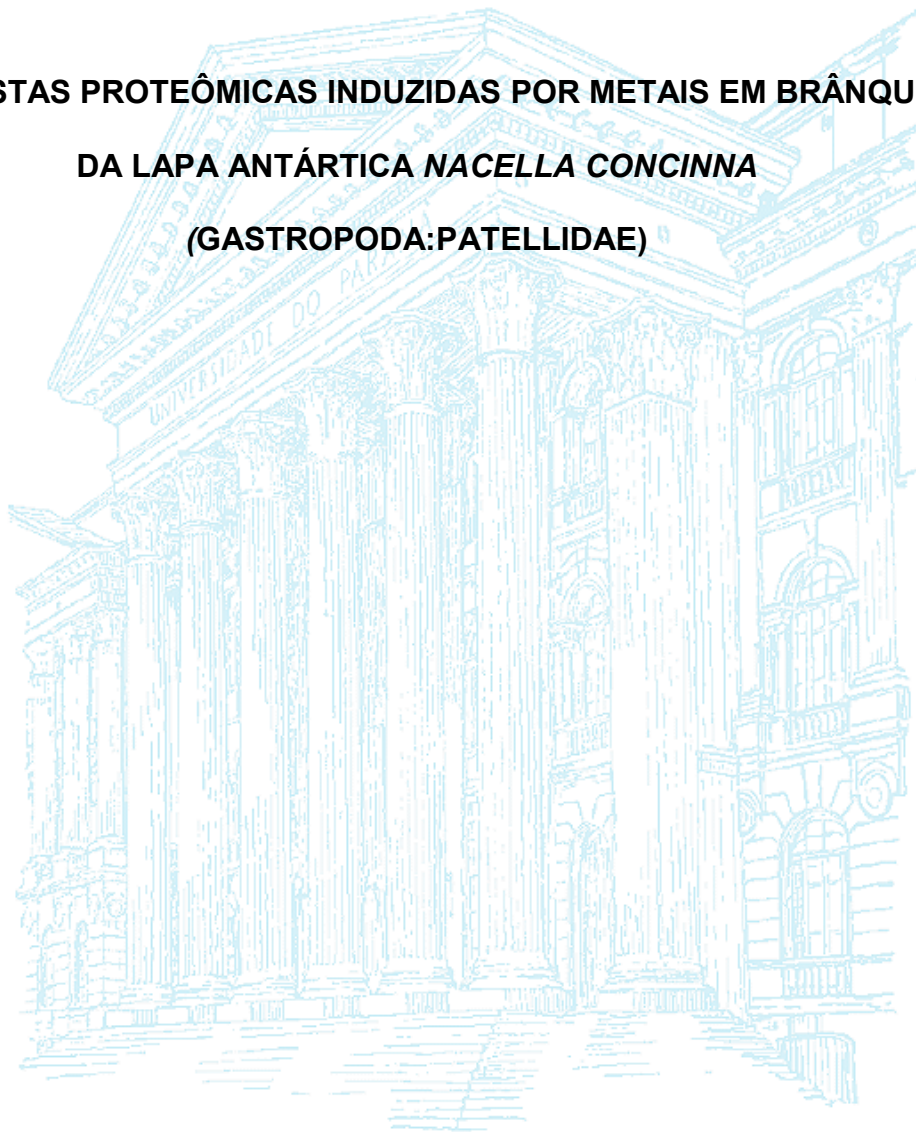


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CLAUDIO ADRIANO PIECHNIK

**RESPOSTAS PROTEÔMICAS INDUZIDAS POR METAIS EM BRÂNQUIAS
DA LAPA ANTÁRTICA *NACELLA CONCINNA*
(GASTROPODA: PATELLIDAE)**



CURITIBA

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

**Respostas proteômicas induzidas por metais em brânquias da lapa
antártica *Nacella concinna* (Gastropoda:Patellidae)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Departamento de Biologia Celular do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Dr^a Lucélia Donatti – UFPR

Coorientador: Lars Tomanek, PhD. *California Polytechnic State University*, EUA.

CURITIBA

2015

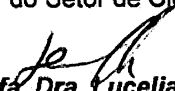


**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

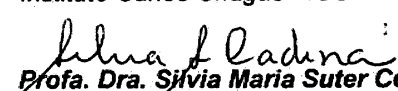
Departamento de Biologia Celular
Setor de Ciências Biológicas
Instituto Carlos Chagas/Fiocruz/PR

PARECER

A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:


Prof. Dra. Lucelia Donatti
Orientadora e presidente da banca
Universidade Federal do Paraná - UFPR


Prof. Dr. Paulo Costa Carvalho
Instituto Carlos Chagas - ICC


Prof. Dra. Sílvia Maria Suter Correia Cadena
Universidade Federal do Paraná - UFPR


Prof. Dra. Roseli Wassem
Universidade Federal do Paraná - UFPR


Prof. Dr. Francisco Filipak Neto
Universidade Federal do Paraná - UFPR

E tendo como suplentes,

Prof. Dra. Maritana Mela Prodocimo
Universidade Federal do Paraná - UFPR

Prof. Dr. Luis Fernando Favaro
Universidade Federal do Paraná - UFPR

Após arguir o candidato **Claudio Adriano Piechnik**, em relação ao seu trabalho intitulado: "Respostas proteômicas induzidas por metais em brânquias da lapa Antártica *Nacella concinna* (Gastropoda: Patellidae)", são de parecer favorável à ~~Aprovação~~ *Aprovação* do acadêmico, habilitando-o ao título de Doutor em Biologia Celular e Molecular, área de concentração em Biologia Celular e

Molecular.
A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora, bem como ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento Interno deste Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 27 de Agosto de 2015



CENTRO POLITÉCNICO - CEP 81.531-990-JARDIM DAS AMÉRICAS-Caixa Postal 19031-
FONE: (41) 3361-1676 FAX 3266-2042 - E-Mail- pgbiocel@ufpr.br - www.pgbiocel.ufpr.br CURITIBA -PR

DEDICATÓRIA

A Mariana,
minha melhor amiga, mãe do nosso filho e daquele(s) que ainda virão,
amante e esposa.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar quero agradecer à minha orientadora, Dra. Lucélia Donatti pelo estímulo e orientação durante o desenvolvimento deste trabalho, por sua amizade e apoio constante.

Ao meu coorientador, Dr. Lars Tomanek, por me receber no *Environmental Proteomics Laboratory, California Polytechnic State University*, EUA e propiciar parte da estrutura para que eu pudesse desenvolver parte do meu trabalho.

A minha esposa, Mariana. Pela paciência, pelo estímulo, pelo companheirismo, pelo carinho, pela espera e pelo compartilhamento de sonhos.

À Maria Rosa e Gabriela pela convivência na Antártica, certamente não teria sido possível realizar os experimentos sem a ajuda de vocês.

A todos os integrantes do Programa Antártico Brasileiro (Proantar) que realmente lutam e colaboram ativamente na melhoria da pesquisa brasileira na Antártica.

A Dra. Yocie Yoneshigue Valentin, coordenadora do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Antártico de Pesquisas Ambientais (INCT-APA), por seu profissionalismo e exemplo na vida pessoal e acadêmica.

Às amigas do Laboratório de Biologia Adaptativa: Tânia, Mariana, Priscila, Maria Rosa, Thaylise e Cíntia pela amizade, pelas horas de descontração no laboratório.

Aos amigos do *Environmental Proteomics Laboratory*, Joshua Mier, Marcus Zuzow, Mike Garland, Holland Helder e Efren Almeida por me ensinarem todos os detalhes da proteômica e proporcionarem momentos de diversão durante a nossa estadia.

À Dra. Martina Höckner, Universidade de Innsbruck, Austria pela ajuda na análise dos dados do primeiro capítulo do trabalho.

Ao professor Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro pelas valiosas contribuições dispensadas durante as avaliações dos relatórios ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Dr. Luís Fernando Fávaro pelo apoio e valiosos conhecimentos dispensados nas aulas de Docência ou no bate papo na hora do cafezinho.

Aos meus pais, meus maiores exemplos, pelo apoio, dedicação e amor que me acompanham por toda vida.

Ao meu filho, Thomas, por me lembrar que a vida não é só trabalho, que a noite não é feita somente para se dormir e que brincar deve ser uma prioridade.

Desde já agradeço a esta banca examinadora por aceitar o convite e pelas futuras contribuições.

Agradeço a todas as pessoas que fazem parte da minha vida profissional e pessoal, que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste doutorado.

Epigrafe

“O homem deve compreender seu universo, a fim de compreender o seu destino. O mistério, porém, é um ingrediente muito necessário em nossas vidas. O mistério cria a admiração e o admirável é a base para o desejo do homem de entender. Quem sabe quais os mistérios que serão resolvidos durante a nossa vida e que novos enigmas se tornarão o desafio das novas gerações? ”

Neil Armstrong

RESUMO

O impacto de metais sobre os organismos vivos pode ser evidenciado em diferentes níveis de organização biológica a partir de moléculas e células, chegando a comunidades e aos ecossistemas. A lapa *Nacella concinna* é encontrada na região litorânea e zona de infralitoral da Antártida onde na Baía do Almirantado se localiza a Estação Antártica Brasileira Comandante Ferraz (EACF), local deste estudo. Durante os experimentos *N. concinna* (N=6/metal/concentração/tempo) foram expostos a duas concentrações de chumbo ($0,9 \mu\text{gL}^{-1}$ e $3,0 \mu\text{gL}^{-1}$) e cobre ($0,12 \mu\text{gL}^{-1}$ e $0,25 \mu\text{gL}^{-1}$) nos tempos de 12, 24, 48 horas para ambos os metais e 168 horas somente para o chumbo. A temperatura de 0°C e a salinidade de 34‰ foram mantidas constantes. As brânquias foram congeladas em nitrogênio líquido e analisadas através de técnicas de proteômica. Foram quantificadas as mudanças na abundância de proteínas a partir de geis gerados por eletroforese 2D. As proteínas foram identificadas por espectrometria de massa *tandem*. Para as brânquias de *N. concinna* expostas ao chumbo e ao cobre um grupo semelhante de proteínas alteradas foi observado. Foram identificadas proteínas antioxidantes, incluindo a Mn-superóxido dismutase e a ferritina indicando maior produção de espécies reativas de oxigênio. As chaperonas envolvidas na maturação de proteínas presentes no retículo endoplasmático apresentaram alterações possivelmente devido a uma mudança no estado redox deste compartimento celular. A maior abundância de subunidades do proteossoma α pode evidenciar maiores taxas de desnaturação de proteínas pelo proteossoma. Os metais também levaram a alterações na anidrase carbônica, provavelmente decorrente de alterações no equilíbrio ácido-base das células branquiais. Proteínas metabólicas, como a arginina quinase, a triose fosfato isomerase glicolítica e a enolase, bem como a piruvato desidrogenase, tiveram seu volume alterado, o que pode estar relacionado a uma maior taxa de renovação de ATP. Finalmente, observamos a alteração na abundância de uma isoforma da Cdc42, uma proteína de sinalização com função de modificar componentes do citoesqueleto. Possíveis efeitos em cascata da alteração da Cdc42 incluem mudanças da miosina e paramiosina. Nós supomos que, a substituição de metais ligados a proteínas pelo chumbo ou cobre causou um aumento de ROS e um desafio ácido-base em brânquias, provocando uma inibição de maturação de proteínas no retículo endoplasmático, um aumento no tamponamento de ATP por arginina quinase e proteínas glicolíticas, bem como mudanças na abundância de Cdc42 que afetaram filamentos do citoesqueleto. Estes fatos colaboram na elucidação das ligações entre o metabolismo, balanço energético e tolerância ao estresse em organismos antárticos, neste caso, a lapa antártica *N. concinna*.

Palavras-chave: Antártica, anidrase carbônica, Cdc42, chaperoninas, metabolismo energético, metal, estresse oxidativo, homeostase proteica.

ABSTRACT

The impact of metals on living organisms may be evidenced at different levels of biological organization from molecules and cells, reaching communities and ecosystems. The limpet *Nacella concinna* is found in the coastal region and subtidal zone of Antarctic, including the South Shetlands archipelago islands and the King George Island where is the Brazilian Antarctic Station Comandante Ferraz (EACF), local of this study. Samples of *N. concinna* were collected in Admiralty Bay at Punta Plaza (62 ° 04'14,5 "S, 58 ° 24'11,9" W) and Botany Point (62 ° 06'15 7 "S, 58 ° 21'14,0" W) during 2011 and 2012 austral summer. During the experiments specimens (n = 6 / metal / concentration / time) were exposed to two concentrations of lead (0.9 µg L⁻¹ and 3.0 µg L⁻¹) and copper (0.12 µg L⁻¹ and 0.25 µg L⁻¹) during 12, 24, 48 hours for both metals and 168 hours for lead. The temperature was 0 ° C and salinity was maintained constant at 34‰. The gills were frozen in liquid nitrogen and analyzed by proteomic techniques. Changes in abundance of proteins were quantified in 2D gels generated by electrophoresis. Proteins were identified by tandem mass spectrometry. Gills exposed to lead and copper had a similar changed proteins. Antioxidant proteins were identified, including Mn-superoxide dismutase and ferritin indicating increased production of reactive oxygen species. The chaperone involved in the maturation of proteins in the endoplasmic reticulum showed significant differences possibly due to a change in redox state of this cellular compartment. The greater abundance of α proteasome subunits may indicate higher rates of denaturation of proteins by the proteasome. Metals also led to a change in carbonic anhydrase, which may be due to changes in acid-base balance of gill cells. Metabolic proteins, such as arginine kinase, triose phosphate isomerase and glycolytic enolase and pyruvate dehydrogenase, had changed their volumes in gels, which can be related to a higher rate of ATP renewal. Finally, we note the change in the abundance of an isoform of cdc42, a signaling protein related to modify cytoskeletal structures. Possible downstream effects of cdc42 included possible shifts in myosin and paramyosin. We assume that the substitution of metals bound to proteins by lead or copper caused an increase of ROS and a challenge in acid based on gills, causing inhibition of the protein maturation in the endoplasmic reticulum, an increase in buffering ATP and the glycolytic protein arginine kinase, as well as changes in the abundance of cdc42 affecting cytoskeletal filaments. Facts those who collaborate in the elucidation of links between metabolism, energy balance and stress tolerance.

Keywords: Antarctic, carbonic anhydrase, Cdc42, chaperonins, energy metabolism, ferritin, gills, heavy metal, oxidative stress, protein homeostasis.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1: Mapa da Antártica e Península Antártica	16
Figura 2: Aspecto geral da morfologia externa da lapa antártica <i>Nacella concinna</i> (Gastropoda:Patellidae)	20
Figura 3: Visão geral dos diferentes fluxos de trabalho em proteômica	23
Figura 4: Pontos de coleta na Baía do Almirantado, Ilha Rei George	27
Figura 5: Visão geral dos fluxos de trabalho em proteômica realizado no The Environmental Proteomics Laboratory, California Polytechnic State University (Cal Poly), Estados Unidos	29
Figura 6: Deformação e fusão das imagens dos géis	31

Capítulo 1

Figure 1: Fused gel image (proteome map) depicting 319 protein spots from gill tissue of the Antarctic limpet <i>Nacella concinna</i>	47
Figure 2: Principal component analysis (PCA) based on gill proteins that were identified and showed a significant change with lead organized by time. (A) 12 h, (B) 24 h, (C) 48 h, and (D) 168 h exposure (based on a two-way permutation ANOVA; $P \leq 0.02$)	52
Figure 3: Hierarchical clustering of changes in abundance of antioxidant proteins	62
Figure 4: Changes in abundance of antioxidant proteins	64
Figure 5: Hierarchical clustering of changes in abundance of proteins representing protein homeostasis	68
Figure 6: Changes in abundance of proteins representing protein homeostasis	69
Figure 7: Hierarchical clustering of changes in abundance of proteins representing energy metabolism	75
Figure 8: Changes in abundance of proteins representing energy metabolism	76

Figure 9: Hierarchical clustering of changes in abundance of proteins representing cytoskeletal structure and dynamic 84

Figure 10: Changes in abundance of proteins representing cytoskeletal structure and dynamic 85

CAPITULO 2

Figura 1: Imagem fusionada de géis (ou mapa do proteoma) representando os 325 spots individuais de proteínas detectadas em brânquias de *Nacella concinna* durante o experimento com cobre 97

Figura 2: Análise de componentes principais (PCA) com base nas proteínas que foram identificadas e que mostraram variação significativa (ANOVA; $P \leq 0.02$) 100

Figura 3: Análise de componentes principais (PCA) com base nas proteínas que foram identificadas e mostraram variação significativa (ANOVA; $P \leq 0.02$) 101

Figura 4: Análise de componentes principais (PCA) com base nas proteínas que foram identificadas e que mostraram variação significativa (ANOVA; $P \leq 0.02$) em *N. concinna* exposta ao cobre 102

Figura 5: Análise de componentes principais (PCA) com base nas proteínas que foram identificadas e que mostraram variação significativa (ANOVA; $P \leq 0.02$) em *N. concinna* exposta ao cobre 103

Figura 6: Agrupamento hierárquico de mudanças de abundância de proteínas de homeostase de *N. concinna* exposta ao cobre 110

Figura 7: Agrupamento hierárquico de mudanças de abundância de proteínas de metabolismo energético de *N. concinna* exposta ao cobre 113

Figura 8: Agrupamento hierárquico de mudanças de abundância de proteínas de sinalização de *N. concinna* exposta ao cobre 121

Figura 9: Agrupamento hierárquico de mudanças de abundância de proteínas de citoesqueleto de *N. concinna* exposta ao cobre 122

Figura 10: Alterações na abundância de proteínas de brânquia de *Nacella concinna* em resposta à exposição ao cobre (controle, 0,9 μgL^{-1} e 3,0 μgL^{-1}) para 12, 24, 48 h 123

Figura 11: Agrupamento hierárquico de mudanças de abundância de proteínas de estresse oxidativo 125

MATERIAL SUPPLEMENTAR

Figure S1: Principal component analysis (PCA) based on proteins that were identified and showed a significant change in abundance with lead over time.....

..... 161

LISTA DE TABELAS

CAPITULO 1

Table 1: Positive and negative loadings for principal component 1 and 2 of proteins significant for 12 hours exposition to lead (compare with Fig. 2A).....	56
Table 2: Positive and negative loadings for principal component 1 and 2 of proteins significant for 24 hours of exposition to lead (compare with Fig. 2B).....	57
Table 3: Positive and negative loadings for principal component 1 and 2 of proteins significant for 48 hours of exposition to lead (compare with Fig. 2C).....	58
Table 4: Positive and negative loadings for principal component 1 and 2 of proteins significant for 168 hours of exposition to lead (compare with Fig. 2D).....	59

CAPITULO 2

Tabela 1: Cargas positivas e negativas para o componente principal 1 e 2 de proteínas significantes para todos os tempos de exposição ao cobre (compare com a Fig. 2).....	105
---	-----

MATERIAL SUPLEMENTAR

Table S1: Protein identification with estimated and predicted molecular mass (kDa), isoelectric point (pI), GenBank identifier, MASCOT score, number of peptides matched, sequence coverage and putative functional category	162
Table S2: Positive and negative loadings for principal component 1 and 2 of proteins significant for all exposition times to lead (compare with Supplement Fig. S1)	164
Tabela S3: Identificação de proteínas com massa molecular estimada e prevista (kDa), ponto isoelétrico (PI), identificador no GenBank, pontuação mascote, número de pepídeos cobertos, cobertura sequência e categoria funcional suposta	165

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	xii
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	14
2. OBJETIVOS.....	25
2.1. Objetivos específicos.....	25
3. METODOLOGIA.....	25
3.1. Arranjo experimental.....	25
3.2. Homogeneização dos tecidos.....	28
3.3. Eletroforese bidimensional em gel.....	28
3.4. Análise de imagens em gel.....	30
3.5. Espectrometria de massa.....	32
3.6. Mapas de calor (<i>Heat maps</i>).....	33
3.7. Análise estatística.....	34
CAPÍTULO 1.....	36
TIME COURSE OF LEAD INDUCED PROTEOMIC CHANGES IN GILL OF THE ANTARCTIC LIMPET <i>NACELLA CONCINNA</i> (GASTROPODA: PATELLIDAE).....	36
1. ABSTRACT.....	37
2. INTRODUCTION.....	38
3. MATERIALS AND METHODS.....	45
4. RESULTS AND DISCUSSION.....	45
5. CONCLUSION.....	90
CAPÍTULO 2.....	93
RESPOSTAS PROTEÔMICAS INDUZIDAS PELO COBRE EM BRÂNQUIAS DA LAPA ANTÁRTICA <i>NACELLA CONCINNA</i> (GASTROPODA: PATELLIDAE).....	93
1. INTRODUÇÃO.....	93
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	96
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	96
4. CONCLUSÃO.....	126
DISCUSSÃO FINAL.....	128
REFERÊNCIAS.....	132
MATERIAL SUPLEMENTAR.....	161

1. INTRODUÇÃO GERAL

A Ilha Rei George (Figura 1) é a maior das ilhas do arquipélago das Shetlands do Sul e abriga a Estação Antártica Comandante Ferraz (EACF), local deste estudo.

Em geral, as águas do Oceano Antártico são consideradas bastante isoladas, devido à convergência Antártica, de modo que as substâncias antropogênicas provenientes do hemisfério norte só podem ser transferidas para a região em grandes escalas de tempo BARGAGLI (2008). Os metais são componentes naturais dos meios bióticos e abióticos de todos os ecossistemas. Em condições naturais fazem parte dos ciclos geoquímicos - a atmosfera, litosfera, hidrosfera e biosfera - a fluxos bastante estáveis (BARGAGLI, 2000). No entanto, a ação antropogênica pode atuar alterando as concentrações de metais nos ecossistemas. Por exemplo, a contaminação com Chumbo (Pb) tem sido descrita por influenciar o sistema ecológico Antártico pelo menos em algum grau (SUN & XIE, 2001). O primeiro processo a influenciar a entrada de metais a partir de águas de degelo é a área da superfície da água do mar, permitindo a entrada de poeira atmosférica somente quando todo o gelo tenha sido fundido ou removido (HENDRY *et al.*, 2008). A liberação direta de Cobre (Cu) a partir de partículas de gelo foi claramente demonstrada pela presença de concentrações elevadas de partículas em suspensão encontradas na seção do núcleo de gelo em interface com a água do mar. Diferentemente, a elevada quantidade de Cádmio (Cd) particulado incluído no bloco de gelo parece não afetar a concentração de partículas na superfície e, pelo contrário, o correspondente aumento de Cd dissolvido indica que ele é liberado em forma dissolvida, quando o gelo derrete (GROTTI *et al.*, 2005). Sugere-se que o ciclo biogeoquímico do Pb é provavelmente o único que tem sido significativamente alterado pelas emissões antropogênicas na Antártida e em outros países no hemisfério sul (BARGAGLI, 2000).

O meio ambiente Antártico, devido à localização e características físicas, é provavelmente o ecossistema mais remoto no planeta Terra. Isso faz com

que a Antártica seja um lugar interessante para investigações que avaliem a ação de metais na ecologia e fisiologia dos organismos (BARGAGLI *et al.*, 1996; BARGAGLI *et al.*, 1998; BARGAGLI *et al.*, 1999; DUQUESNE *et al.*, 2000b; HINDELL *et al.*, 1999; MARRQUEZ *et al.*, 1998; RAVANELLI *et al.*, 1997; SCHAREK *et al.*, 1997).

A acidificação dos oceanos e o aquecimento já resultaram em mudanças perceptíveis do ecossistema marinho polar. A cobertura de gelo do mar e a extensão da área de geleiras terrestres diminuíram significativamente nos últimos anos, tanto no Ártico quanto na Antártica (ANISIMOV *et al.*, 2007; COMISO, 2012; PEROVICH & RICHTER-MENGE, 2009) e essa tendência deve aumentar no futuro próximo.

O resultado do rápido degelo em regiões polares é um aumento da entrada de água doce em conjunto com um aumento nas temperaturas da superfície marinha (MARSLAND *et al.*, 2007). É previsto um aumento na estratificação em altas latitudes o que reduz o intercâmbio de nutrientes originados em águas profundas (ricas em metais traço) impactando a formação e a circulação termohalina (HOFFMANN *et al.*, 2012; MARSLAND *et al.*, 2007).

A fusão do gelo das regiões polares pode ter consequências sobre o ambiente fótico na camada de mistura oceânica (KUROCHKIN *et al.*, 2009). A redução na cobertura de gelo do mar no Ártico demonstrou aumentar fortemente a penetração de luz nas águas superficiais e, assim, influenciar a fotoquímica redox na transformação de metais traço (BOYD *et al.*, 2008). Em águas Antárticas, onde a limitação de luz é causada principalmente pela presença superficial de uma camada de gelo, o derretimento, não na superfície, mas sim nas regiões profundas, provavelmente terá efeitos não tão pronunciados como na região Ártica (BOYD & HUTCHINS, 2012). Está prevista uma expansão volumétrica da profundidade da camada de mistura na região da Antártica como consequência do derretimento, o que poderá aumentar a intensidade de luz média em águas superficiais (BOYD *et al.*, 2008).

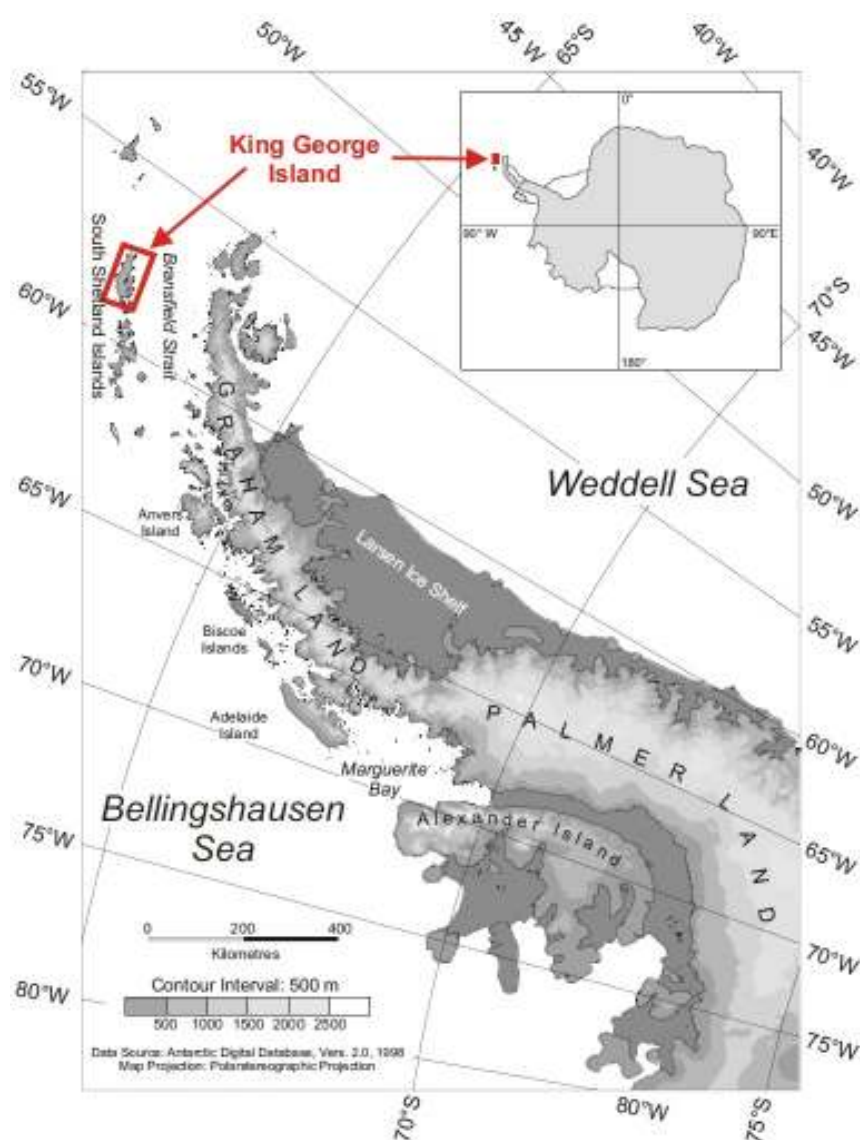


Figura 1: Mapa da Antártica e Península Antártica. Em detalhe a localização da Ilha Rei George (King George Island) que abriga a Estação Antártica Comandante Ferraz (EACF). (Fonte: Freiburg: Institut Für Physische Geographie – 2001).

As mudanças climáticas, aparentemente, influenciam a biogeoquímica global de metais traço afetando tanto as fontes de metais quanto a sua futura ciclagem no oceano. Metais dissolvidos em água marinha estão presentes em baixas concentrações, devido a sua baixa solubilidade e/ou adsorção em partículas (HOFFMANN *et al.*, 2012). As publicações sobre as inter-relações de fatores, tais como pH, temperatura e metais traço dos oceanos são escassas, mas apontam para a mesma importância e complexidade (BOYD *et al.*, 2010).

Em águas superficiais, as principais fontes de metais traço globais são as partículas leves, denominadas aerossóis, originárias da poeira do deserto (JICKELLS *et al.*, 2005), das fontes antropogênicas (SEDWICK *et al.*, 2007;

SHOLKOVITZ *et al.*, 2009) e das erupções vulcânicas (OLGUN *et al.*, 2011). Em regiões costeiras, águas de ressurgência profundas ou de origem fluvial, ricas em metais traço, desempenham um importante papel adicional (BOYD, 2009). Os sedimentos são a maior fonte de metais traços em águas de plataforma (LAËS *et al.*, 2007; USSHER *et al.*, 2007) e o efeito *island wake* é de importância local em sistemas oceânicos remotos (BLAIN *et al.*, 2007). Recentemente foi sugerido que os metais traço de fontes hidrotermais no fundo do mar podem, potencialmente, atingir as águas superficiais via circulação oceânica em conjunto com o excesso de compostos orgânicos que se ligam e estabilizam os metais em fluidos hidrotermais (SANDER & KOSCHINSKY, 2011).

Sugere-se que o Ferro (Fe) incorporado no gelo marinho que, posteriormente, é liberado com o degelo, também pode contribuir para intensos afloramentos de algas (FITZWATER *et al.*, 2000; HOLEMANN *et al.*, 1999; MEASURES, 1999). Processos similares foram descritos para a região Antártica (VAN DER MERWE *et al.*, 2011). Recentemente foi relatado o papel de icebergues na entrada de metais no oceano aberto e que a concentração destes pode aumentar com a diminuição do gelo antártico (LIN *et al.*, 2011).

No entanto, LANNUZEL *et al.* (2011) sugeriram que a água marinha é a principal responsável pela concentração de metais no gelo na Antártica e que o derretimento sazonal pode afetar a concentração de Fe nestas águas. HENDRY *et al.* (2008) mostraram o aumento de Cd em águas costeiras da Antártica originado de sedimentos na plataforma continental, com consequência para a relação de Cd:PO₄. Os resultados indicam que a cobertura de gelo do mar influencia o teor de metais em águas profundas na Antártica.

Particularmente preocupante também é elucidar os mecanismos pelos quais as mudanças induzidas pelo homem nos ciclos atmosféricos de metais que entram na atmosfera da Antártica (SUTTIE & WOLFF, 1992). A análise química da neve e do gelo depositado ao longo do tempo em calotas polares fornece informações exclusivas sobre a contaminação do meio ambiente com metais ao longo dos últimos séculos. No entanto, convém ressaltar que estes

dados refletem, principalmente, a poluição emitida no hemisfério sul, especialmente na América do Sul e África do Sul (CONVEY *et al.*, 2009).

Isto acontece porque a poluição emitida no Hemisfério Norte tem menor probabilidade de penetrar no Hemisfério Sul e, finalmente, chegar na Antártica (PLANCHON *et al.*, 2002). A neve Antártica é tão limpa, que devemos tomar grandes precauções para coletar as amostras sem contaminá-las. Por exemplo, podemos citar que mil toneladas de neve antártica normalmente contém não mais do que uns poucos miligramas de chumbo (SUTTIE & WOLFF, 1992).

Os metais ou metalóides associados à contaminação e potencial toxicidade são derivados de fontes tanto naturais quanto antropogênicas. Enquanto as principais fontes naturais de metais incluem as rochas, o solo, os vulcões, o *spray* de sal marinho, os incêndios florestais e as atividades biogênicas marinhas e continentais (NRIAGU, 1989), metais tóxicos antropogênicos têm origem, principalmente, das atividades industriais e domésticas, tais como a mineração e fundição de metais, a queima de combustíveis fósseis e a incineração de lixo (NRIAGU & PACYNA, 1988).

Durante o verão austral o vórtice circumpolar desaparece e registros de longo prazo da poeira mineral, carbono preto e ^{210}Pb no Pólo Sul e em algumas estações costeiras da Antártica indicam um transporte maior de massas de ar em direção aos pólos (WOLFF & CACHIER, 1998). Por exemplo, a contaminação da neve Antártica por aerossóis contendo Pb e Cu tem sido amplamente documentada (BARBANTE *et al.*, 1998) e, geralmente, tem sido atribuída à gasolina com chumbo, a mineração de metais não-ferrosos, a fundição ou outras fontes antropogênicas na América do Sul, África e Austrália. Além disso, apesar de durante as últimas décadas, a deposição de Pb em neve Antártica estar diminuindo, a de Cu, Zn e outros elementos está aumentando (PLANCHON *et al.*, 2002).

As emissões locais de metais a partir de atividades humanas na Antártica têm o potencial de originar a contaminação ambiental em áreas específicas. As principais emissões antrópicas dentro da Antártica estão relacionadas com a queima de combustível para o funcionamento das

estações, motos, veículos pesados, navios e aeronaves (BOUTRON & WOLFF, 1989).

As atividades humanas no continente Antártico estão aumentando e, em um futuro inventário dessas emissões será necessário considerar o número, magnitude e intensidade para avaliar as descargas de metais na Antártica (DAHE *et al.*, 1999).

Há cada vez mais evidências a partir de amostragem do gelo e da neve de que o ambiente antártico já está significativamente contaminado com outros metais como o Cromo (Cr), Cu, Zn, Prata (Ag), Bismuto (Bi) e Urânio (U) em consequência do transporte de longa distância a partir dos continentes localizados ao redor (PLANCHON *et al.*, 2002; VALLELONGA *et al.*, 2002; VAN DE VELDE *et al.*, 2005; WOLFF & SUTTIE, 1994; WOLFF *et al.*, 1999).

A bioacumulação de contaminantes pode levar a efeitos deletérios em organismos aquáticos expostos cronicamente, mesmo quando as concentrações na água são muito baixas para representar um perigo de toxicidade aguda (ZAUKE & SCHMALENBACH, 2006). Adaptações evolutivas às condições do ambiente Antártico podem influenciar na sensibilidade dos organismos para o estresse. A maioria dos processos biológicos em bentos e zona de maré nos mares polares, incluindo crescimento, reprodução e metabolismo, são lentos. Isso reduz a capacidade de destoxicação ou remoção de contaminantes tornando os organismos antárticos mais suscetíveis a este tipo de estresse (DUQUESNE *et al.*, 2000a). Portanto, as concentrações dos metais vestigiais no mar de Weddell devem ser principalmente o resultado de processos naturais, e podem, portanto, ser utilizadas para estabelecer a importância relativa desses processos em distribuições de metal em outras partes mais afetadas antropogenicamente do oceano mundial (SAÑUDO-WILHELMY *et al.*, 2002a).

Estudos preliminares da Ilha Rei George mostraram que *N. concinna* (Figura 2) acumulou metais, fato este que sugere seu potencial como referencial para biomonitoramento de contaminação por metais na Antártica (AHN *et al.*, 2002; NAJLE *et al.*, 2000; WEIHE *et al.*;2010). A utilização de outros moluscos como bioindicadores de contaminação por metais em estudos de monitoramento ambiental tem sido relatada em várias localidades

geográficas (AHN *et al.*, 1996; BARGAGLI, 2005; BARGAGLI, 2008; BLANKLEY & BRANCH, 1985; CAROLI *et al.*, 2001b; CHOI *et al.*, 2007; CLASON *et al.*, 2004; DOS SANTOS *et al.*, 2006).

O maior acúmulo de metais nos órgãos viscerais dos organismos indica que quantidades significativas são ingeridas a partir da dieta. Por outro lado, os organismos marinhos podem absorver metais da água circundante na forma dissolvida e particulada (CLASON *et al.*, 2004). Poucos dados estão disponíveis sobre o acúmulo de metais nos moluscos gastrópodes, com referência aos níveis de metais na água do mar circundante ou no alimento disponível em seu habitat (AHN *et al.*, 2002). Após exposição a metais foram observadas alterações histológicas em *N. conccina* tais como vacuolização das células basofílicas e uma acentuada perda da estrutura da glândula do aparelho digestivo, com autólise das células e perda de basofilia (NAJLE *et al.*, 2000).

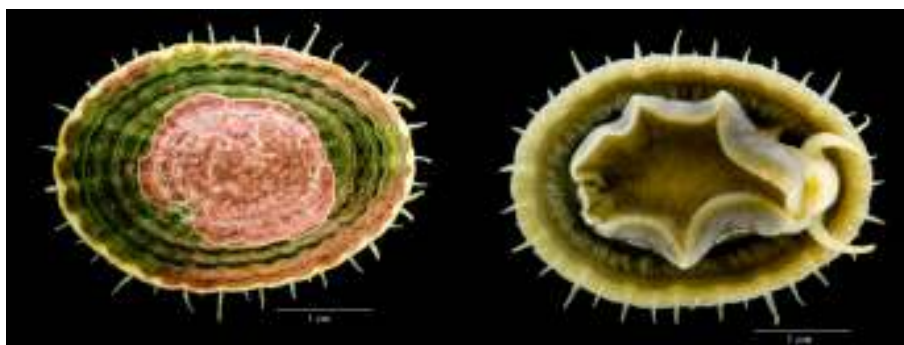


Figura 2: Aspecto geral da morfologia externa da lapa antártica *Nacella concinna* (Gastropoda:Patellidae). Na fotografia da esquerda a visão dorsal do corpo recoberto pela concha e na fotografia da direita visão ventral. (Foto: Gabriel Monteiro, 2011)

As proteínas são essenciais em todos os organismos vivos, desempenhando funções que vão desde estrutural a catalítica. A síntese e a degradação de proteínas são, portanto, processos fisiológicos fundamentais, havendo, dependendo da proteína, um estado de fluxo contínuo, com novas proteínas entrando na via de síntese e outras sendo removidas através de sua degradação. A síntese de proteínas é energeticamente dispendiosa, representando 11- 42% do metabolismo basal dependendo da espécie, sendo , portanto, um componente importante do metabolismo energético dos animais (MARTIN *et al.*, 2003). A contínua síntese e degradação de proteínas são

vitais, não só para a manutenção de tecidos e o crescimento dos organismos, mas também na adaptação às mudanças das condições ambientais. Isto permite aos animais substituir as proteínas desnaturadas ou danificadas através da mobilização de aminoácidos a fim de permitir a regulação metabólica (HAWKINS, 1991).

A exposição de biosensores a poluentes pode ser avaliada através de análise proteômica, onde a comparação do perfil protéico nos permite identificar peptídeos e proteínas que são expressas diferentemente como consequência da adaptação ao tóxico, metabolismo do mesmo ou como reflexo do processo patológico por este induzido (DOWLING & SHEEHAN, 2006; SERAFINI *et al.*, 2010).

Proteômica é o termo utilizado para descrever uma gama de técnicas (Figura 3) através das quais se busca quantificar o conjunto completo de proteínas existentes no interior da célula, ou o proteoma, seja em resposta a alterações das condições ambientais, ou para observar as alterações ao longo do tempo (BERTH *et al.*, 2007a;2007b; NESATYY & SUTER, 2007; TYERS & MANN, 2003). A proteômica é um método da biologia sistêmica que emprega uma perspectiva holística para analisar as interações complexas em sistemas biológicos (BANTSCHIEFF *et al.*, 2007). Ela está embasada em descobertas, não conduzidas por hipóteses, o que significa que o resultado final de um estudo de proteômica é um conjunto de hipóteses testáveis relativas ao funcionamento molecular dos fenômenos observados (TOMANEK & ZUZOW, 2010b). A proteômica pode ser usada para comparar organismos estreitamente relacionados que foram adaptados a diferentes condições ambientais ou expostos a diferentes tipos de stresse ambiental (DOWLING & SHEEHAN, 2006; TOMANEK & ZUZOW, 2010b).

A co-expressão de padrões de proteínas é indicativo de associações através de uma via celular comum (ex.: glicólise ou interação proteína-proteína -PPI). Apesar de estarmos a um passo de descrever diretamente redes de interação proteica (YAMADA & BORK, 2009), estas co-expressões de padrões são ainda só uma etapa em direção a uma compreensão mais abrangente da dinâmica de sistemas celulares em resposta a perturbações causadas pelo ambiente (SOUCHELNYTSKYI, 2005). Consideremos ainda que a análise

proteômica é complementar às análises do transcriptoma, esta, por sua vez, quantifica a abundância de mRNA utilizando *microarrays* ou sequenciamento de todas as moléculas de mRNA (GRACEY & COSSINS, 2003). A variação nos níveis de transcrição, em geral, explicam menos da metade da variação na abundância de proteínas (TOMANEK & SOMERO, 2000). Outra razão para se concentrar na proteômica é que as proteínas representam o fenótipo molecular das células e, como tal, têm um efeito direto sobre a fisiologia dos organismos (FEDER & WALSER, 2005).

Limitações nas técnicas podem restringir o acesso ao proteoma inteiro (AEBERSOLD & MANN, 2003; MANN *et al.*, 2001). Apesar das limitações, a proteômica baseada na espectrometria de massa (MS) tem sido extremamente bem sucedida em descobrir *insights* sobre as complexidades dos sistemas biológicos (CRAVATT *et al.*, 2007).

A idéia principal por trás dos avanços recentes em proteômica é que combinamos peptídeos às identidades de proteínas através da aplicação de MS (AEBERSOLD & MANN, 2003; MANN *et al.*, 2001; NESVIZHSKII *et al.*, 2007). Apesar dos fluxos de trabalho em proteômica (Figura 3) variarem de acordo com os protocolos de isolamento de proteínas, do tipo de espectrometria de massa e de pesquisas em banco de dados, em algum ponto no fluxo de trabalho, as proteínas são digeridas em peptídios pelas proteases que cortam em sítios pré-determinados (comumente utiliza-se a tripsina) (TOMANEK, 2011).

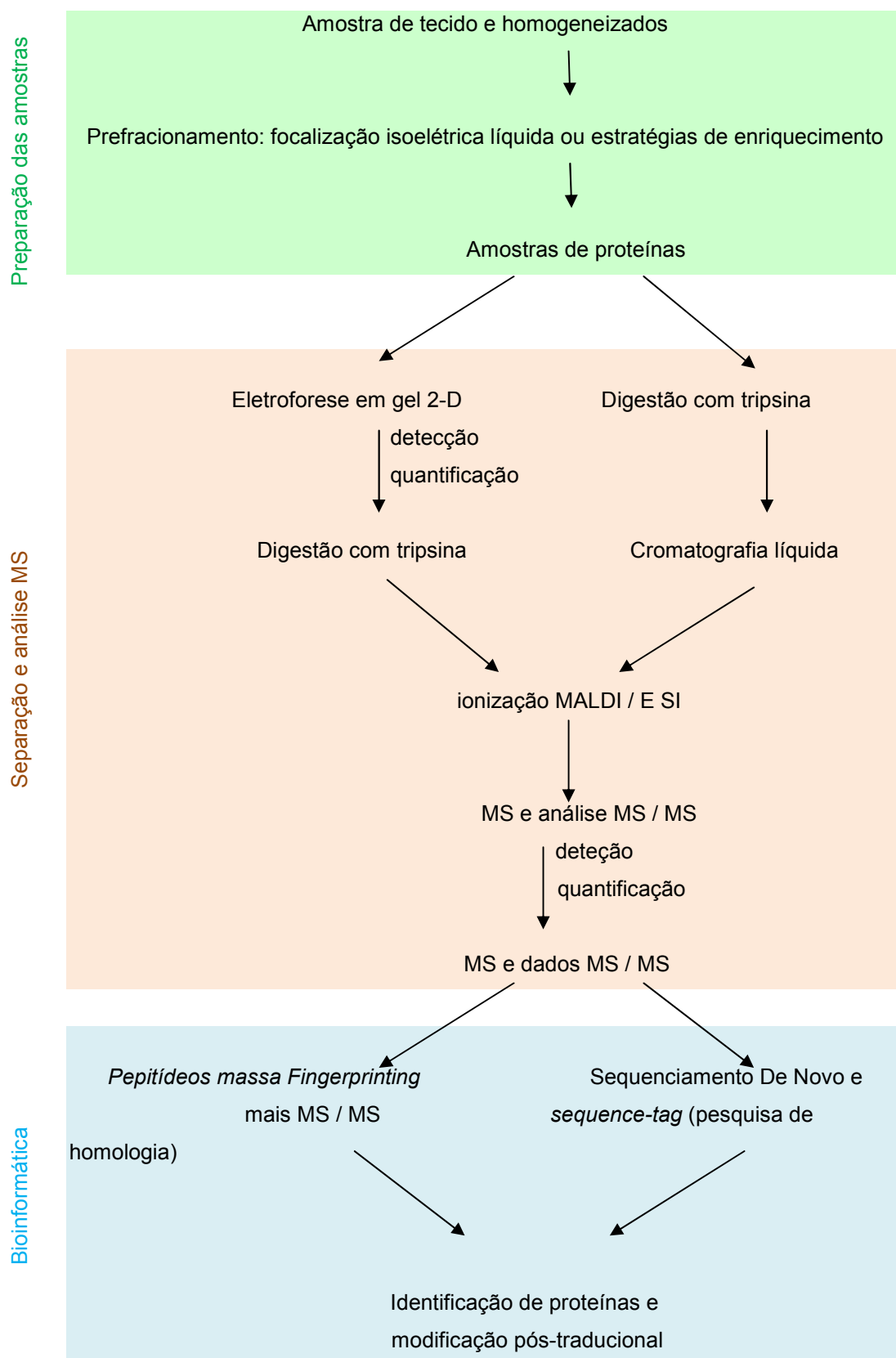


Figura 3: Visão geral dos diferentes fluxos de trabalho em proteômica. Abreviaturas: eletroforese em gel 2-D (bidimensional); MALDI, *matrix-assisted laser desorption ionization*; ESI *electrospray ionization*; MS, espectrometria de massa, MS / MS, espectrometria de massa tandem (TOMANEK, 2011).

Esta abordagem tem sido descrita em diferentes biosensores, entre eles, pode-se destacar a descrição da alteração de proteoma após a exposição de mexilhões (*Mytilus edulis*) a águas contaminadas por petróleo (MANDUZIO *et al.*, 2005) ou em ascídias (SERAFINI *et al.*, 2010; TOMANEK, 2010).

O monitoramento das possíveis consequências da exposição aos metais pode ser realizado por intermédio de biomarcadores ou bioindicadores, principalmente em ambientes aquáticos, nos quais o organismo apresenta contato direto com o contaminante, fato que propicia o diagnóstico do impacto para posterior reparo ou, até mesmo, entendimentos das estratégias utilizadas pelos organismos para sobreviverem frente a situações extremas (ATLI & CANLI, 2007; CHANDRAN *et al.*, 2005; OEHLMANN *et al.*, 2003; SHEEHAN & POWER, 1999).

Em nosso trabalho aplicamos técnicas de proteômica que permitem revelar proteínas envolvidas em processos dinâmicos que ocorrem após a perturbação (exposição ao metal) de um dado estado fisiológico, através da comparação da sua concentração celular, antes e após essa perturbação (HAWKINS, 1991; JOO *et al.*, 2003; MANDUZIO *et al.*, 2005; TRUEBANO *et al.*, 2010). Primeiro analisamos o chumbo (capítulo 1), metal que possui a característica de ter origem antropogênica. Depois o cobre (capítulo 2), um metal também muito estudado em toxicologia e com participação fisiológica em moluscos.

2. OBJETIVOS

Analizar os efeitos dos metais, Chumbo (Pb) e Cobre (Cu) sobre o metabolismo da lapa antártica *Nacella concinna*.

2.1. Objetivos específicos

- Verificar a introdução de alterações na expressão protéica em *Nacella concinna* após exposição aos metais Pb e Cu.
- Identificar, em *Nacella concinna*, as proteínas cuja expressão é alterada como consequência da exposição aos metais Pb e Cu e correlacionar sua função com uma possível resposta tóxica, de resistência ou de degradação.
- Levantar hipóteses sobre o(s) mecanismo(s) de ação das proteínas alteradas em *Nacella concinna* decorrentes da exposição aos metais Pb e Cu.

3. METODOLOGIA

3.1. Arranjo experimental

- Os exemplares de *N. concinna* foram coletados durante a Operantar XXIX verão de 2010-2011 e Operantar XXX verão de 2011 -2012. Os animais foram removidos de seu substrato rochoso com o auxílio de uma lâmina arredondada.

- As coletas foram feitas em duas regiões da Ilha Rei George – Baía do Almirantado. Em *Punta Plaza* (62°04'14,5"S; 58°24'11,9"W) e *Botany Point* (62°06'15,7"S; 58°21'14,0"W) (Figura 4).
- Os exemplares adultos (> 30 mm) coletados para os bioensaios foram medidos e mantidos no módulo de aquários II da EACF por um período de aclimatação de 72 horas, temperatura de 0°C, salinidade de 34, aeração contínua e fotoperíodo de 12 horas luz/ 12 horas escuro. Sexos não foram distinguidos.
- Durante os experimentos os aquários foram mantidos nas mesmas condições abióticas da aclimatação.
- Para o experimento de exposição a cada metal isoladamente (Cu, Pb) grupos de 36 animais foram colocados em aquários de 36 litros;
- Os animais foram expostos as seguintes concentrações de metais: 0,9µgL⁻¹ (concentração 1) e 3,0µgL⁻¹ (concentração 2) de Cobre e 0,12µgL⁻¹ (concentração 1) e 0,25µgL⁻¹ (concentração 2) de Chumbo
- Os tempos de exposição para o chumbo foram 12, 24, 48 e 168 horas.
- Os tempos de exposição para o cobre foram 12, 24, 48 horas.
- Para cada concentração os animais foram mantidos como controle, isto é, não foram expostos a metais;
- Para cada situação experimental 6 animais foram sacrificados (controle, concentração 1 e concentração 2) e amostras de tecido branquial foram retiradas e congeladas em nitrogênio líquido visando posterior processamento.

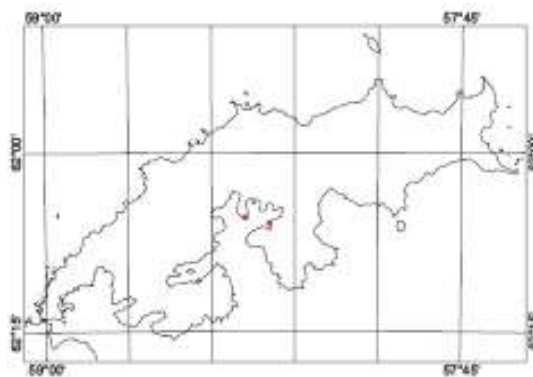


Figura 4: Pontos de coleta na Baía do Almirantado, Ilha Rei George. Ponto vermelho à esquerda Punta Plaza ($62^{\circ}04'14,5''S$; $58^{\circ}24'11,9''W$) e ponto vermelho à direita Botany Point ($62^{\circ}06'15,7''S$; $58^{\circ}21'14,0''W$). (King George Island 1:100000. Fonte: Freiburg: Institut Für Physische Geographie – 2001).

3.2. Solução estoque dos metais

Chumbo

1 mg de $Pb(NO_3)_2$ foi pesado e transferido para um balão volumétrico e dissolvido em água destilada. O volume foi completado até 1 L, assim obtivemos 1 L de uma solução estoque 1,0 mg/L ($1.000\mu\text{g/L}$) de nitrato de chumbo (II). Ao retirar 0,19 mL desta solução e completarmos o volume até 1 L com água utilizada no experimento, obtivemos uma solução $0,19\ \mu\text{g/L}$ de $Pb(NO_3)_2$, na qual $0,12\ \mu\text{g/L}$ corresponde a Pb^{2+} . Ao retirar 0,39 mL desta solução e completarmos o volume até 1 L com água utilizada no experimento, obtivemos uma solução $0,39\ \mu\text{g/L}$ de $Pb(NO_3)_2$, na qual $0,25\ \mu\text{g/L}$ corresponde a Pb^{2+} .

Cobre

1 mg de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ foi pesado e transferido para um balão volumétrico e dissolvido em água destilada. O volume foi completado até 1 L, assim obtivemos 1 L de uma solução estoque 1,0 mg/L ($1.000\mu\text{g/L}$) de sulfato de cobre (II). Ao retirar 3,55 mL desta solução e completarmos o volume até 1 L com água utilizada no experimento, obtivemos uma solução $3,55\ \mu\text{g/L}$ de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, na qual $0,9\ \mu\text{g/L}$ corresponde a Cu^{2+} . Ao retirar 11,80 mL desta solução e completarmos o volume até 1 L com água utilizada no experimento, obtivemos uma solução $11,80\ \mu\text{g/L}$ de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, na qual $3,0\ \mu\text{g/L}$ corresponde a Cu^{2+} .

3.3. Homogeneização dos tecidos

As brânquias foram descongeladas e homogeneizadas com um homogeneizador de vidro esmerilado usando uma proporção de 1:4 de tecido para tampão, refrigerados com gelo, contendo 7molL^{-1} ureia, 2molL^{-1} tiourea, 23mmolL^{-1} ASB-14 (amidosulfobetaina 14), 40mmolL^{-1} Tris-base, tampão 0,5% pH 4–7 de gradiente imobilizado (IPG) (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) e 40mmolL^{-1} ditiotretitol. Após centrifugação à temperatura ambiente durante 30 minutos a 16.100g o sobrenadante foi precipitado através da adição de quatro volumes de 10% ácido tricloroacético em acetona gelada. Esta solução foi armazenada a -20°C durante a noite. No dia seguinte, as proteínas precipitadas foram decantadas por centrifugação a 4°C durante 15 minutos a 18.000g . O sobrenadante foi eliminado e o sedimento remanescente foi lavado com acetona resfriada em gelo e centrifugado novamente. O sedimento lavado foi ressuspenso por agitação em vórtex (5 min) em tampão de reidratação (7molL^{-1} ureia, 2molL^{-1} tiourea, 3.25mmolL^{-1} ácido colamidopropil-dimetilamonio-propanesulfônico (CHAPS), 2% nonil fenoxipolietoxietanol-40 (NP-40), 0.0005% Bromofenol Blue, 0.5% tampão IPG, 100mmolL^{-1} ditioeritritol). A concentração de proteínas foi determinada com o Quant Kit 2D (GE Healthcare, Piscataway, NJ, EUA), de acordo com as instruções do fabricante

3.4. Eletroforese bidimensional em gel

As proteínas foram separadas de acordo com o seu ponto de gradiente isoelétrico (p_i) e de pH imobilizado (IPG) (tiras de pH 4-7, 11cm; GE Healthcare) utilizando $400\mu\text{g}$ de proteína por tira. O protocolo de focalização isoelétrica foi iniciado com um passo de re-hidratação passiva (5h), seguido por 12 horas de re-hidratação ativa (50 V) usando uma célula de focalização isoelétrica (BioRad, Hercules, CA, EUA). As seguintes condições de funcionamento foram usadas durante a execução de focagem isoelétrica: 500V durante 1 hora, 1000V durante 1 hora e 8000V durante 2,5 horas (todas as alterações ocorreram no modo rápido). Seguindo a focalização isoelétrica (figura 6), as tiras de gel foram congeladas a -80°C . Para executar a segunda dimensão em gel (separação de proteínas por massa molecular), as tiras de

IPG congeladas foram descongeladas e incubadas em tampão de equilíbrio (375 mmolL^{-1} Tris-base, 6 mmolL^{-1} ureia, 30% glicerol, 2% dodecil sulfato de sódio (SDS), 0.0002% Bromofenol Blue) durante 15 minutos. Primeiramente com 65 mmolL^{-1} dihiotreitól e, depois, após decantação da solução, em tampão de equilíbrio 135 mmolL^{-1} iodoacetamida. Tiras de IPG foram colocadas no topo de um gel de poliacrilamida a 11,8%, com uma solução de agarose a 0,8% contendo tampão de Laemmli de eletroforese SDS (25 mmolL^{-1} Tris-base, 192 mmolL^{-1} glicina, 0.1% SDS). Os géis foram corridos verticalmente a 200V durante 55 minutos com um banho maria de água em recirculação fixada a 10°C utilizando células Criterion Dodeca (BioRad) (figura 5).



Figura 5: Visão geral dos fluxo de trabalho em proteômica realizado no The *Environmental Proteomics Laboratory*, California Polytechnic State University (Cal Poly), Estados Unidos.

Os géis foram corados com corante Coomassie Blue coloidal (G-250) durante a noite e descorados por lavagem repetida com água Milli-Q por, pelo menos, 48 horas. As imagens dos géis 2-D resultantes foram digitalizadas com um scanner Epson transparência 1280 (Epson, Long Beach, CA, EUA).

3.5. Análise de imagens em gel

Imagens digitalizadas dos géis 2-D foram analisadas com o software de imagem Delta2D (versão 4.3; Decodon, Greifswald, Alemanha) (BERTH *et al.*, 2007b).

Uma vez que a separação das proteínas foi completada o próximo passo foi a quantificação de proteínas, que utiliza os programas de computador e softwares específicos para determinar a abundância relativa de cada *spot* – de proteína através de todos os grupos experimentais. Primeiro, pequenas variações nas posições dos *spots* que aparecem nos géis foram eliminadas (BERTH *et al.*, 2007a). Isto foi feito através de um processo chamado de "deformação", no qual cada gel é sobreposto e os *spots* correspondentes em cada gel são ligados e ajustados utilizando linhas vetoriais para conectá-los. As imagens são então transformadas, ou deformadas, de acordo com os vetores para produzir uma sobreposição exata (Figura 6) (ARORA *et al.*, 2005; BERTH *et al.*, 2007a).

Após o ajuste das posições dos *spots* de todos os géis foram combinadas através da deformação e o software Delta 2D compilou os pontos correspondentes a uma única imagem (figura 6), que é representativa de cada gel do grupo experimental (LOPEZ, 2000). O próximo passo foi definir os limites de cada *spot* individualmente em um processo chamado de "detecção de *spot*". Este utiliza modelos Gaussianos de intensidade de *spots* para determinar automaticamente limites do *spot* (BERTH *et al.*, 2007a; RAMAN *et al.*, 2002). *Spots* automaticamente detectados foram então editados para garantir todos os limites representam *spots* verdadeiros.

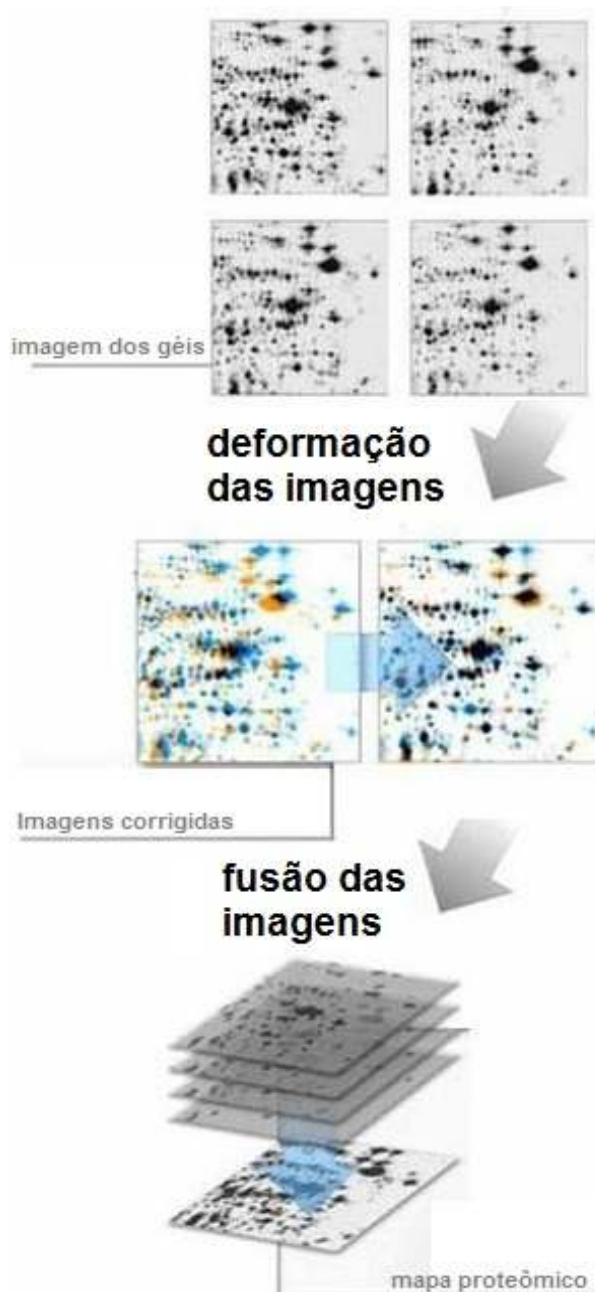


Figura 6: Deformação e fusão das imagens dos géis adaptado de (BERTH *et al.*, 2007a).

Uma vez definidos os *spots*, eles foram quantificados com base na densidade de pixels, a qual fornece uma estimativa relativa da expressão da proteína (RAMAN *et al.*, 2002). As quantificações dos *spots* foram normalizadas para atenuar as diferenças entre as imagens dos géis. Estas podem ser causadas por pequenas variações na quantidade de proteína, quantidade de corante, eficiência e inconsistências na digitalização de imagem (BERTH *et al.*, 2007a). A normalização foi feita convertendo os volumes originais dos *spots* em volumes relativos. Para tanto, compara-se os pixels

contidos em um único *spot* com o número total de pixels no gel. Deste modo, o volume de cada *spot* está representado como uma porcentagem do total, eliminando o efeito de pequenas diferenças de gel para gel (ARORA *et al.*, 2005).

3.6. Espectrometria de massa

Após a análise estatística, as proteínas que alteraram significativamente em abundância em resposta a exposição aos metais foram excisadas a partir dos géis mais representativos utilizando um perfurador de tecido (Beecher Instruments, Prairie, WI, EUA). Os pontos dos géis que foram excisados foram descorados por duas lavagens com 25 mmolL^{-1} bicarbonato de amônia em 50% acetonitrila antes de serem desidratados com 100% acetonitrila e subsequentemente digeridos com $11 \text{ ng}\mu\text{L}^{-1}$ tripsina (Promega, Madison, WI, USA) durante a noite a 37°C . Foi utilizado um tampão de eluição (0.1% ácido trifluoroacético (TFA): acetonitrila 2:1) e um SpeedVac (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), para extrair e concentrar proteínas digeridas. As proteínas digeridas no tampão de eluição foram misturadas com $5\mu\text{l}$ de solução de matriz (0.2 mmolL^{-1} ácido cinâmico α -hidroxiciano em acetonitrila) e vistas em uma placa-alvo Anchorchip® (Bruker Daltonics Inc., Billerica, MA, EUA). Os *spots* de proteínas alvo foram lavados com 0,1% de TFA em 10 mmolL^{-1} fosfato de amônia e re-cristalizado com uma mistura de acetona:etanol: 0.1% TFA (6:3:1 v:v:v).

Os “Peptide mass fingerprints” (PMFs) foram obtidos em um conjunto de matriz assistida por laser de ionização de dessorção de tempo-de-voo (MALDI-TOF-TOF) espectrometro de massa (Ultraflex II; Bruker Daltonics Inc.). Após PMF, foram selecionados seis ou mais peptídeos a partir do espectro para espectrometria de massa *tandem*. Os espectros de massa foram analisados com flexAnalysis (versão 3.0; Bruker Daltonics Inc.) aplicando as seguintes condições: o algoritmo TopHat para a subtração da linha de base, análise Savitzky-Golay para análise de smoothing ($0,2m/z$; número de ciclos = 1) e um algoritmo SNAP de pico de detecção (sinal-para-ruído: 6 para MS e 1,5 por

MS/MS). O estado de carga dos peptídeos foi assumido como sendo +1. Tripsina foi utilizada para a calibração da massa.

Uma vez que o genoma da lapa Antártica, *N. concinna*, não é conhecido, a identificação das proteínas foi feita por homologia. Para identificar as proteínas o Programa Mascote (versão 3.1 ; Matrix Science Inc. , Boston , MA, EUA) foi utilizado e PMFS combinados e espectros de massa em *tandem* em uma pesquisa contra duas bases de dados. Um dos bancos de dados utilizado foi o Patellostropoda que continha 1.512.528 sequências e 346.221.826 resíduos. O outro banco de dados foi o Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia - NCBI (Bethesda , MD, EUA), com 4.626.804 sequências e 1.596.079.197 resíduos. No caso dos péptidos que corresponderam a múltiplos membros de uma família de proteínas, a proteína apresentada foi selecionada com base tanto na pontuação mais alta e no maior número de peptídeos correspondentes. Parâmetros da pesquisa foram definidos da seguinte forma: a especificidade das enzimas: tripsina, uma perda de clivagem permitida. Modificações variáveis; carbamidometilação de cisteína e a oxidação da metionina. Para o conjunto MS foi definido o precursor tolerância de massa de íons para 0,6 Da. A busca de peso (Mowse) e a pontuação molecular que indicava um sucesso significativo foi dependente do banco de dados: escores mais altos do que 46 foram significativos ($P < 0,05$). No entanto, só foram aceitas identificações positivas, que incluíam dois peptídeos correspondentes, independentemente da pontuação Mowse.

3.7. Mapas de calor (*Heat maps*)

Mapas de calor (*heat maps*) são representações visuais de dados quantitativos sobre dois eixos. O eixo x geralmente reflete amostras individuais em cada grupo experimental e o eixo y é constituído por grupos de parâmetros medidos (BORLAND & TAYLOR, 2007), neste caso, as proteínas. Mapas de calor foram gerados através da junção de proteínas significativas em grupos com base em similaridades nos seus perfis de expressão (ZVELEBIL & BAUM, 2008).

Observamos que o campo entre os eixos é composto de uma série de quadrados coloridos, lado a lado, de modo a refletir a quantificação. O esquema de cores quantitativo foi escolhido em uma escala logarítmica (azul = menor, laranja = maior). Como tal, os mapas de calor são ferramentas de visualização flexíveis para agrupar dados e explorar padrões (PLEIL *et al.*, 2011). Podem ser dispostos de modo a explorar uma hipótese particular e permitem uma visão rápida de dados com uma terceira dimensão quantitativa capturada como cores diferentes. (PLEIL *et al.*, 2011). Ambos os eixos são, geralmente, subagrupados em clusters proteicos. A técnica de agrupamento é utilizada para identificar os padrões que revelaram a dinâmica das proteínas (RAO *et al.*, 2008).

3.8. Análise estatística

Para as análises proteômicas volumes pontuais normalizados foram analisados dentro do Delta2D utilizando um teste t com base numa distribuição nula que foi gerada usando 1000 permutações dos dados, o que representa uma distribuição não-normal e variância desigual das variáveis de resposta (volumes dos *spots* de proteína). Para o *two-way* ANOVA foi utilizado um valor de $p < 0,02$ para limitar o número de falsos positivos de conta para as comparações múltiplas, em vez de usar uma abordagem ligeiramente mais conservadora falso-*discovery*, mantendo o habitual valor $P < 0,05$. Para o agrupamento hierárquico, foi utilizado a média de ligação dentro do conjunto de ferramentas de estatística do Delta2D usando coeficientes de correlação de Pearson.

Durante a espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz e tempo de voo/tempo de voo (MALDI-TOF/TOF) a cada uma das proteínas que tem correspondência no banco de dados foi atribuída uma pontuação que representa a probabilidade de uma determinada correspondência ser devida ao acaso. Se a contagem for superior ao limiar de significância, o que significa um valor de $p < 0,05$, e dois ou mais fragmentos peptídicos são correspondentes, a análise foi considerada estatisticamente significativa e a proteína é considerada identificada. Para tanto foi utilizada a ferramenta de busca MASCOTE que emprega o algoritmo de peso molecular

na busca (MOWSE), o qual apresenta como pontuação - $10 \cdot \log_{10}(P)$, onde P representa a probabilidade absoluta de que a correspondência observada é devido a um evento aleatório. Assim, com o algoritmo MOWSE, uma alta pontuação significa uma baixa probabilidade de que a correspondência seja falsa.

A análise de componentes principais (ACP) foi realizada para diferentes grupos de variáveis e baseada na matriz de correlação dessas variáveis, com o uso do programa Delta2D. Para cada ACP, foi construído o círculo de autovetores das variáveis e o diagrama de ordenação das amostras, para os dois primeiros componentes, representados pelos eixos x e y (respectivamente, primeiro e segundo eixo). No diagrama de ordenação, desenhou-se uma elipse da área de segurança do conjunto de amostras de cada tempo de exposição/concentração do metal. A probabilidade de que os valores estejam localizados dentro da área marcada pela elipse é função do valor do coeficiente que controla o tamanho da elipse. Em uma matriz original de dados, cada sítio tem um valor para cada variável ambiental. Na ACP, cada sítio tem um valor para cada componente. Os componentes podem ser vistos como "super-variáveis", contruídos pela combinação da correlação entre as variáveis e são extraídos em ordem decrescente de importância em termos de sua contribuição para a variação total dos dados. Autovetor é o valor que representa a contribuição de cada variável em cada componente (eixos) e funciona como coeficientes de correlação que variam de -1 até +1. As variáveis com elevado autovetor no primeiro eixo tendem a ter autovetor inferior no segundo eixo. Autovalor é o valor que representa a contribuição relativa de cada componente para explicar a variação total dos dados. Existe um autovalor para cada componente. Matematicamente, o processo de extrair mais eixos pode ir até o número de eixos ou componentes igualar-se ao número de variáveis, porém os eixos posteriores vão contribuir cada vez menos para explicar os dados (KENT & COKER, 1992). Na maioria dos estudos, como no caso presente, usam-se apenas os dois primeiros eixos, considerados suficientes para explicar os dados e pela facilidade de interpretação de um gráfico em duas dimensões.

CAPÍTULO 1

TIME COURSE OF LEAD INDUCED PROTEOMIC CHANGES IN GILL OF THE ANTARCTIC LIMPET NACELLA CONCINNA (GASTROPODA: PATELLIDAE).

Cláudio Adriano Piechnik¹, Martina Höckner², Maria Rosa Dmengen Pedreiro¹,
Lucélia Donatti¹, and Lars Tomanek^{*3}

¹Universidade Federal do Paraná

Department of Cell Biology

Adaptive Biology Laboratory

Curitiba, Paraná,

Brazil

²University of Innsbruck

Institute of Zoology

Technikerstraße 25

6020 Innsbruck

Austria

³California Polytechnic State University

Department of Biological Sciences

Center for Coastal Marine Studies

Environmental Proteomics Laboratory

1 Grand Ave.

San Luis Obispo, CA 93407-0401

U.S.A.

E-mail: ltomanek@calpoly.edu

* Author for correspondence

1. ABSTRACT

Antarctic invertebrates are adapted to a constantly cold environment, which is undergoing rapid environmental change due to climate change, including warming and melting ice. Another threat is the exposure to heavy metals, including lead, due to the presence of humans in Antarctica and a greater exposure to heavy metals worldwide; with winds disposing of it on ice and rapidly melting ice transferring it to the nearby benthic environment. Here we exposed Antarctic limpets of the species *Nacella concinna* to 0 (control), 0.12 and 0.25 $\mu\text{g l}^{-1}$ lead for 12, 24, 48 and 168 h. We subsequently quantified the changes in abundance of proteins from gill, using 2D gel electrophoresis and tandem mass spectrometry. We identified several antioxidant proteins, including the heavy-metal binding *Mn*-superoxide dismutase and ferritin, with increasing abundances at 12 and 24 h, indicating greater production of reactive oxygen species. Chaperones involved in the redox-dependent maturation of proteins in the endoplasmic reticulum (ER) showed lower abundance with lead, possibly due to a change in the redox state of this cellular compartment. Higher abundance of two proteasome α subunits with lead at 24 and 168 h suggested higher rates of protein denaturation by the proteasome. Lead also increased the abundance of *Zn*-binding carbonic anhydrase at 12 h, suggesting a challenge to the acid-base balance of gill cells. Metabolic proteins like arginine kinase, the glycolytic triose phosphate isomerase and enolase as well as pyruvate dehydrogenase increased abundance in response to lead at 168 h, suggesting a greater ATP turnover rate. Finally, changes in abundance of one isoform of the small G-protein *cdc42*, a signaling protein to modify cytoskeletal structures, first increased with lead at 12 h and subsequently reversed to a lower abundance with at least one of the lead concentrations at 24, 48 and 168 h of exposure. Because of *cdc42*'s effect on myosin light chain kinases, possible downstream effects of these changes included possible shifts in the composition of the tail region of the thick filament through decreasing abundance of myosin heavy chain and paramyosin at 12 h. Subsequently, increasing abundance of four myosin light chain isoforms at 24 and 168 h suggested that the catalytic rate of the myosin ATPase is also affected by lead. We hypothesize that by replacing protein-bound metals lead caused an increase in ROS and an acid-base challenge in gill, thereby causing an inhibition of protein maturation in the ER, an increase in ATP buffering by arginine kinase and glycolytic proteins, as well as changes in abundance of *cdc42* that affected thick and possibly thin filaments over the 168 h time course of lead exposure.

Key words: Acid-base balance, Antarctica, Carbonic anhydrase, Cdc42, Chaperones, Cytoskeleton, Endoplasmic reticulum, Energy metabolism, Ferritin, Gill, Heavy metal, Lead, Limpet, Oxidative stress, Protein homeostasis, Thick filament (myosin)

2. INTRODUCTION

Climate change is affecting the fauna of the Antarctic Peninsula through a number of rapid and wide-ranging shifts to the physical and chemical environment (HUMBERT, 2012; ROGELJ *et al.*, 2012; VAUGHAN *et al.*, 2003). Given the relative stasis of the Antarctic environment for the last 12 MYR, which has given rise to a unique fauna that has gained and lost biochemical adaptations unique to their environment, the magnitude and pace of climate change constitute a challenge to survival of the Antarctic fauna. Specifically, the transfer of heavy metals from ice to the sea through increased melting constitutes a challenge to cellular homeostasis of a number of Antarctic marine invertebrates, and in particular the limpet *Nacella concinna* (WEIHE *et al.*, 2010). These and other changes of the environment are predicted to have wide-ranging consequences to the Antarctic ecosystem (CLARK *et al.*, 2013b).

Because of its toxicity to aquatic organisms and their potential to bioaccumulate, the effect of metals has been studied for several Antarctic marine species (AHN *et al.*, 1996; HILL *et al.*, 2009a; HUSMANN *et al.*, 2012; JOEST & ZAUKE, 2008; METCHEVA *et al.*, 2010; RIBEIRO *et al.*, 2011). The relatively high concentrations of the metals Al, Co, Ni, Cu, Zn, Cd, Pb, Mn, Fe, As and Se in Antarctic waters have been attributed to water input from progressive deglaciation, soil composition, weathering of volcanic lithogenic rock and atmospheric deposition (AHN *et al.*, 2004; AHN *et al.*, 2002; NEDZAREK *et al.*, 2014; SANCHEZ-HERNANDEZ, 2000; SAÑUDO-WILHELMY *et al.*, 2002b). In addition, the natural background levels of trace metals have been elevated since the establishment of bases on the Antarctic continent (CROCKETT & WHITE, 2003; STARK *et al.*, 2006; WEBSTER *et al.*, 2003). During the austral summer the circumpolar vortex disappears and long-term records of mineral dust, black carbon and Pb in the South Pole and several coastal Antarctic stations indicate a greater transport of air masses poleward (WOLFF & CACHIER, 1998). For example, contamination of Antarctic snow by aerosols containing Pb has been widely documented and generally has been attributed to leaded gasoline (PLANCHON *et al.*, 2003), mining of

non-ferrous metals, smelting or other anthropogenic sources in South America, Africa and Australia. Moreover, while the deposition of Pb in Antarctic snow has been decreasing in recent decades, the deposition of Cu, Zn and other elements has been increasing (PLANCHON *et al.*, 2002). Heavy metal emissions from human activities in Antarctica have the potential to cause environmental contamination in specific areas. For example, the main anthropogenic emissions within Antarctica are related to the burning of fuel for the operation of power plants, motorcycles, trucks, ships and aircrafts (BOUTRON & WOLFF, 1989). Indeed, the increased levels of Pb concentrations recorded in the proximity of the research stations indicated an anthropogenic origin of the contamination (NEDZAREK *et al.*, 2014).

Evolutionary adaptations to the Antarctic environmental conditions can influence the sensitivity of organisms to stress (RODRIGUES *et al.*, 2011; RODRIGUES *et al.*, 2013; MACHADO *et al.*, 2014; RAGA *et al.*, 2015). Most biological processes in the benthos and tidal zone of the polar seas, including growth, reproduction and metabolism are slow, which reduces the ability to detoxify and remove contaminants, making Antarctic organisms especially sensitive to additional environmental stress (DUQUESNE *et al.*, 2000b; MAJER *et al.*, 2014). In combination with the projections of increasing basal melt rates in the Weddell Sea sector of the West Antarctic ice sheet (HUMBERT, 2012), the sensitivity to pollutants has the potential to be particularly stressful in the near future. Specifically, dissolved metals can be absorbed from the water column directly into the gills of mollusks (Weihe *et al.* 2010). Furthermore, the bioaccumulation of contaminants, resulting in the increase in tissue concentration, can cause harmful effects in aquatic invertebrates, even when concentrations in water are too low to carry the danger of acute toxicity (ZAUKE & SCHMALENBACH, 2006).

Antarctic limpets have been widely used to study physiological responses to environmental stress (ABELE *et al.*, 1998; BOWGEN *et al.*, 2007; HAWES *et al.*, 2010; MALANGA *et al.*, 2005; MALANGA *et al.*, 2007; MORLEY *et al.*, 2014; OBERMUELLER *et al.*, 2011; WEIHE & ABELE, 2008). Previous studies

conducted in Antarctica, including King George Island, showed that *N. concinna* accumulated a considerable amount of metals in different tissues (AHN *et al.*, 2004; AHN *et al.*, 1999; AHN *et al.*, 2002; NAJLE *et al.*, 2000). Importantly, environmental stress, including exposure to different metals, led to the activation of the anti-oxidant system, an important indicator for the perturbation of the general redox system of the cell (WEIHE *et al.*, 2010).

As a systems biology approach, proteomics provides a broader, more unbiased, perspective, providing insights into how the cellular system changes in response to stress and detecting changes that were not considered, enabling the discovery of novel biomarkers and of assessing the effects to a broader range of cellular processes (DOWLING & SHEEHAN, 2006; TOMANEK, 2014;2015). As a number of recent studies on the proteomic responses of marine organisms to environmental stress, e.g. temperature, osmolality, hypoxia and pH, as well as pollutants, have shown, a proteomics approach can generate a number of novel hypotheses on how cells respond to environmental stress (DILLY *et al.*, 2012; FIELDS *et al.*, 2014; FIELDS *et al.*, 2012; GARLAND *et al.*, 2015; SERAFINI *et al.*, 2011; TOMANEK, 2012b; TOMANEK & ZUZOW, 2010a; TOMANEK *et al.*, 2012; TOMANEK *et al.*, 2011). Proteomic analyses of the response to heavy metals and other pollutants have been particularly successful in identifying novel patterns of cellular responses in temperate organisms (LIU & WANG, 2012), characterizing unique changes in protein abundance in response to specific stressors (MURALIDHARAN *et al.*, 2012; THOMPSON *et al.*, 2012). Therefore, the application of proteomics to study the response of Antarctic organisms to heavy metal exposure can potentially provide insights into the effects of pollutants on the cellular responses in organisms with a slow metabolism and lower detoxification rate (LUQUE-GARCIA *et al.*, 2011). This is a promising approach, especially since proteomic studies on Antarctic organisms are largely absent (TOMANEK, 2014; TRUEBANO *et al.*, 2013). Our results from exposure of Antarctic limpets to Pb detected changes in several cellular processes associated with protein homeostasis, energy metabolism, production of reactive oxygen species,

cellular signaling, and cytoskeletal modification, which offer insights into why cold-adapted organisms may be particularly sensitive to pollutant stress.

3. MATERIALS AND METHODS

3.1. Animal collection and maintenance

The Antarctic limpets (> 30 mm) were collected manually on rock surfaces at low tide during the austral summer 2010/2011 from King George Island, South Shetland Islands, Admiralty Bay at Plaza Point (62°04'14, 5"S; 58°24'11,9"W) and Botany Point (62°06'15,7"S; 58°21'14,0"W). Limpets were acclimated to laboratory conditions at the Brazilian Antarctic Station Comandante Ferraz for 72 h in an air-conditioned laboratory. Limpets were placed in recirculating aquaria. Salinity was 35psu, water temperature 0°C and photoperiod 12/12 h. Genders were not distinguished. No mortalities occurred during the acclimation period.

3.2. Experimental design

The limpets were exposed to lead dissolved in water at concentrations of 0.0 (control), 0.12 and 0.25 μgL^{-1} . The exposure times were 12, 24, 48 and 196 h. Lead was added to the aquaria at the start of the experiments from that made up using stock solution. In this experiment also the control was tested. In this present study we chose exposure concentrations lower than those typically used in experimental accumulation studies to identify the cellular responses at the level of the proteome at very low concentrations (LEMOS *et al.*, 2009). Gill tissue was sampled from all treatment groups ($N=6$ for all groups) and subsequently kept at -80°C .

3.3. Homogenization

Frozen gill tissue was homogenized with an ice-cold ground-glass homogenizer in a ratio of 1:4 of tissue to homogenization buffer: 7 mol l⁻¹ urea, 2 mol l⁻¹ thiourea, 1% ASB-14 (amidodisulfobetaine-14), 40 mmol l⁻¹ Tris-base, 0.5% immobilized pH 4–7 gradient (IPG) buffer (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) and 40 mmol l⁻¹ dithiothreitol. The homogenate was subsequently centrifuged at room temperature for 30 min at 16,100 **g** and the supernatant was used for further processing. Proteins of the supernatant were precipitated by adding four volumes of ice-cold 10% trichloroacetic acid in acetone and incubating the solution at –20°C overnight. After centrifugation at 4°C for 15 min at 18,000 **g**, the supernatant was discarded and the remaining pellet was washed with ice-cold acetone, and centrifuged again before being re-suspended through vortexing in rehydration buffer: 7 mol l⁻¹ urea, 2 mol l⁻¹ thiourea, 2% CHAPS (cholamidopropyl-dimethylammonio-propanesulfonic acid), 2% NP-40 (nonyl phenoxyethylpolyethoxyethanol-40), 0.002% Bromophenol Blue, 0.5% IPG buffer and 100 mmol l⁻¹ dithioerythritol. The protein concentration was determined with the 2D Quant kit (GE Healthcare), according to the manufacturer's instructions.

3.4. Two-dimensional gel electrophoresis

Proteins (400 µg) were loaded onto IPG strips (pH 4–7, 11 cm; GE Healthcare) for separation according to their isoelectric point (pI). We started the isoelectric focusing protocol with a 5 h passive rehydration step (0 V), followed by 12 h of active rehydration (50 V), using an isoelectric focusing cell (BioRad, Hercules, CA, USA). The following protocol was used for the remainder of the run (all voltage changes occurred in rapid mode): 500 V for 1 h, 1000 V for 1 h, and 8000 V for 2.5 h. The strips were frozen at –80°C. Frozen strips were thawed and incubated in equilibration buffer (375 mmol l⁻¹ Tris-base, 6 mol l⁻¹ urea, 30% glycerol, 2% SDS [sodium dodecyl sulfate] and

0.002% Bromophenol Blue) for 15 min, first with 65 mmol l⁻¹ dithiothreitol and then, second with 135 mmol l⁻¹ iodoacetamide. IPG strips were placed on top of a 12% polyacrylamide gel with a 0.8% agarose solution containing Laemmli SDS electrophoresis (or running) buffer (25 mmol l⁻¹ Tris- base, 192 mmol l⁻¹ glycine and 0.1% SDS). Gels were run (Criterion Dodeca; BioRad) at 200 V for 55 min with a recirculating water bath set at 10°C. Gels were subsequently stained with colloidal Coomassie Blue (G-250) overnight and destained by washing repeatedly with Milli-Q (Millipore, Billerica, MA, USA) water for 48 h. The resulting gel images were scanned with a transparency scanner (model 1280; Epson, Long Beach, CA, USA).

3.5. Gel image analysis

Digitized images of two-dimensional gels were analyzed using Delta2D (version 4.3; Decodon, Greifswald, Germany) (BERTH *et al.*, 2007a). We used the group warping strategy to connect gel images through match vectors. All images within each metal concentration and time of exposure treatment were fused into a composite image (proteome map), which represents mean volumes for each *spot*. *Spot* boundaries were detected within the proteome map and transferred back to all gel images using match vectors. After background subtraction, protein *spot* volumes were normalized against total *spot* volume of all proteins in a gel image.

3.6. Mass spectrometry

Proteins that significantly changed in abundance in response to treatments were excised from gels using a tissue puncher (Beecher Instruments, Prairie, WI, USA). Gel plugs were destained twice with 25 mmol l⁻¹ ammonium bicarbonate in 50% acetonitrile, dehydrated with 100% acetonitrile and digested with 11 ng l⁻¹ of trypsin (Promega, Madison, WI, USA) overnight at 37°C. Digested proteins were extracted using elution buffer (0.1%

trifluoroacetic acid [TFA]/acetonitrile; 2:10 and concentrated using a SpeedVac (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The elution buffer containing the digested protein was mixed with 5 μl of matrix solution (0.2 mg m l^{-1} - hydroxycyano cinnamic acid in acetonitrile) and *spotted* on an AnchorchipTM target plate (Bruker Daltonics Inc., Billerica, MA, USA). The spotted proteins were washed with 0.1% TFA and recrystallized using an acetone/ethanol/0.1% TFA (6:3:1) mixture.

Peptide mass fingerprints (PMFs) were obtained on a matrix- assisted laser desorption ionization tandem time-of-flight (MALDI- TOF-TOF) mass spectrometer (Ultraflex II; Bruker Daltonics Inc.). We chose a minimum of six peptides to conduct tandem MS in order to obtain information about the b- and y-ions of the peptide sequence.

To analyze the peptide spectra we used flexAnalysis (version 3.0; Bruker Daltonics Inc.) and applied the TopHat algorithm for baseline subtraction, the Savitzky–Golay analysis for smoothing (with: 0.2 m/z ; number of cycles) and the SNAP algorithm to detect peaks (signal-to-noise ratio: 6 for MS and 1.5 for MS/MS). The charge state of the peptides was assumed to be +1. We used porcine trypsin for internal mass calibration. To identify proteins we used Mascot (version 3.1; Matrix Science Inc., Boston, MA, USA) and combined PMFs and tandem mass spectra in a search against two databases. One database included the sequences of Patellogastropoda that contained 1512528 sequences and 346221826 residues (NCBI). The second database used was NCBI National Center for Biotechnology Information (Bethesda, MD, USA) with 4626804 sequences and 1596079197 residues (Mollusca). In the event of peptides matching to multiple members of a protein family, we selected the protein with the highest score and the highest number of matching peptides. Search parameters were set as follows: enzyme specificity: trypsin; one missed cleavage permitted; variable modifications: carbamidomethylation of cysteine and oxidation of methionine. For tandem MS we set the precursor ion mass tolerance to 0.6 Da. The molecular weight search (MOWSE) score that indicated a significant hit was dependent on the database: scores higher than

46 were significant ($P < 0.05$). Nevertheless, we only accepted positive identifications that included two matched peptides regardless of the MOWSE score.

3.7. Statistical analysis

Normalized spot volumes were analyzed within Delta2D (version 4.3; Decodon, Greifswald, Germany). We conducted a two-way ANOVA to estimate the relative importance of the factors metal concentration and exposure time. For the two-way ANOVA, a null distribution was generated using 1000 permutations to account for the unequal variance and non-normal distributions of the response variables, and a P -value of 0.02 was used to limit the number of false positives instead of using a multiple-comparison correction. Following the two-way ANOVA, *post-hoc* testing to compare treatments was conducted using Tukey's analysis ($P < 0.05$), using Minitab (version 16; Minitab Inc., State College, Pa, USA). For the hierarchical clustering we used average linking within the statistical tool suite within Delta2D, using a Pearson's correlation metric.

In addition we used a principal component analysis (PCA) within Delta2D to assess the variation among treatments and to evaluate the contribution of single proteins to the variation. The results of the PCA comparing treatments were interpreted with the help of loadings; we used these plots to assess which proteins contributed the most to the component of interest.

4. RESULTS AND DISCUSSION

Our proteomic analysis of gill tissue of *N. concinna* in response to various lead concentrations generated a fused image, or proteome map, comprising 96 2D gels (Fig. 1; $N=6$ for each time point and treatment). After careful reviewing and editing spot boundaries on this fused image, we detected 319 protein spots. Of these, 64.9% (207) changed abundance in response to exposure time, lead

concentration (main effects) or their interaction (two-way permutation ANOVA; $P \leq 0.02$). We were able to identify 42.1% (87) of the proteins that changed (or 27.3% of the total), using tandem mass spectrometry (Table S1). In addition to indicating the overall effect of lead concentration or exposure time and their interaction within the heat maps, we also compared treatments for each protein that showed significant changes in abundance (Tukey post-hoc pairwise comparison based on a general linear model; $P \leq 0.05$), which we indicated in each of the figures presenting changes in abundance for an individual protein (see below). As the former analysis is based on data from all and not just one protein, significance in the former does not mean that at least one pairwise comparison is significant (although it is the case for a majority of the proteins).

It is important to consider that protein abundance can change because of synthesis, post-translational modifications (PTMs) or degradation. Thus, when we refer to abundance changes of protein spots, one or a combination of these processes may be responsible. Furthermore, as we are able to separate a number of isoforms of a protein, it is possible that others are outside the pH or mass range we analyzed and thus the overall sum of these isoforms does not have to represent the total abundance of the protein. Thus, the inferences we put forward herein are considered hypotheses, which require further validation. To discuss our results we will first present the results of principal component analyses and then discuss the cellular processes associated with the function of specific proteins as we grouped proteins into the subsequent categories: protein homeostasis, energy metabolism, oxidative stress, and cytoskeletal proteins (see below).

Fig. 1

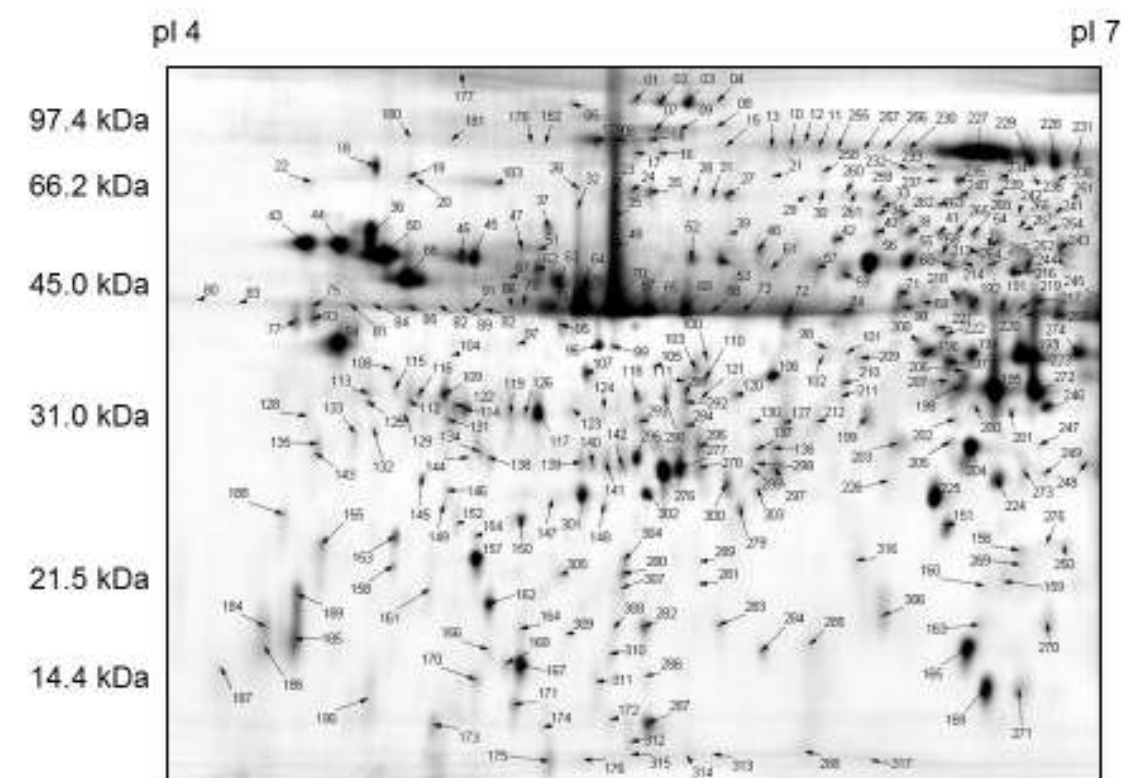


Figure 1: Fused gel image (proteome map) depicting 319 protein spots from gill tissue of the Antarctic limpet *Nacella concinna*. The proteome map represents average pixel volumes for each protein spot. Numbered spots were those that changed abundance in response to time of exposure and concentration of lead (two-way permutation ANOVA; $P \leq 0.02$) and were identified using tandem mass spectrometry (for identifications see Table S1 **Principal component analyses (PCAs)**)

PCAs were conducted to assess the contribution of the two factors, time and lead concentration, or their interaction, generating the variation in protein abundance (Fig. S1 and Table S2). However, due to a lack of a clearer separation between control and treatment groups as well as a dominance of cytoskeletal proteins contributing to the highest loadings, we simplified our analysis and conducted a PCA for each time point separately (Figs 2A-D). Along the x-axis, based on the changes in abundance of 87 proteins, the resulting PCAs separated the control group from those exposed to lead (principal component 1) at all four time points (12, 24, 48 and 168 h). PC1 of all four analyses explained 19-29% of the variation, with the greatest variation (29%) after the longest exposure time (168 h or seven days), suggesting that the effect of lead increased with time.

For each time point, PC2 separated the 0.12 μgL^{-1} from the 0.25 μgL^{-1} treatments between the positive and negative sections of the y-axis, respectively. Interestingly, a single outlier seemed to have contributed majorly to the separation (along PC2) of the two lead exposure treatments at 12 h, because with the exception of this one outlier, both treatments are overall less separated at 12 h than at any other time point (Fig. 2A). These results suggest that the effects of elevated lead levels start to manifest themselves as early as 12 h into the exposure, but increase further with time.

Loadings for a principal component 1 and 2 are either highly positive or negative (Tables 1-4), often but not exclusively coinciding with higher abundances in treatments that are either within the positive or negative section of the x- or y-axis, respectively. These trends don't have to be significant in pairwise comparisons of abundance levels based on the Tukey post-hoc analysis (see below), which we will use later to describe the cellular changes in response to lead in further detail. The loadings provide a first exploratory assessment of the possible changes that accompany the separation of treatment groups. A comparison of loadings of proteins representing different functional categories along PC1, showed positive loadings of at least one of three antioxidant proteins (indicated in gray), including the iron-binding ferritin, the mitochondrial *Mn*-superoxide dismutase (*Mn*-SOD), and aldehyde dehydrogenase (ALDH7), which is involved in the detoxification of aldehydes

originating from lipid peroxidation (BROCKER *et al.*, 2011), during all four time points (Tables 1-4), suggesting that lead caused a change in the abundance of at least one of these three stress proteins at all times.

Proteins representing energy metabolism (also indicated in blue), specifically the tricarboxylic acid (TCA) cycle reactions of pyruvate dehydrogenase (PDH), malate dehydrogenase (MDH) and dihydrolipoyl dehydrogenase (DHLDH), which is a subunit of either the PDH or the α -ketoglutarate dehydrogenase enzyme complex, showed negative loadings, meaning lower abundances during lead treatment at 12, 24 and 48 h (Tables 1-4). Phosphorylase b kinase, which regulates glycogen phosphorylase and thus glycogen metabolism (MICHAL & SCHOMBURG, 2012), showed negative loadings (lower abundances with lead) at 48 h. Together, these results indicate a reduction in abundance of proteins involved in specific metabolic pathways, i.e. TCA cycle, early on. The most common category, cytoskeletal proteins (yellow), was mainly represented by two groups of proteins (thick and thin filaments), myosin heavy and regulatory light chains (MHC and MLC) as well as paramyosin and actin in PC1 of all four time points. However, all three MHC, MLC and paramyosin showed opposite (negative at 12 h and positive at 48 h) loadings for PC1, suggesting that their contribution to the separation changed over the time course of lead exposure (Tables 1-4). This suggests that lead caused changes in the actin-myosin filaments of limpet gill over time.

Proteins belonging to the functional category of protein homeostasis (the endoplasmic reticulum calreticulin and protein disulfide isomerase, GRP78 and T-complex protein 1 β) showed positive loadings at 12, 24 and 168 h (red), possibly indicating a greater requirement to increase re-folding of denaturing proteins with lead.

Finally, several signaling proteins showed high loadings along PC1 (Tables 1-4). The small G-protein cdc42, a key regulator of cytoskeletal structures under stress (MARKS *et al.*, 2009), showed negative and positive loadings (lower and higher abundances with lead exposure - see below) at 24 and 48 h, respectively, suggesting a possible PTM induced by lead.

PC2 separated the effect of the lower versus the higher lead concentrations. Positive loadings generally indicate higher abundances in the lower concentrations whereas negative loadings generally indicate higher protein abundances at the higher lead concentration. It is important to state that we might see different responses to the two concentrations with time.

Proteins involved in energy metabolism, specifically the glycolytic enzymes phosphoglycerate kinase and α -enolase, and the TCA cycle isocitrate dehydrogenase (ICDH), showed negative loadings (higher abundances at 0.25 μgL^{-1} lead) for PC2, while PDH showed a positive loading (higher at 0.12 μgL^{-1}) at 12 h, possibly indicating a higher activity of glycolysis at the higher lead concentration (Table 1). This trend continues at 24 h, with two isoforms of triose phosphate isomerase (TPI) and arginine kinase (AK), which temporarily buffers the increased ATP demand during stress, showing negative loadings (higher abundances at 0.25 μgL^{-1} lead). Two PDH isoforms showed negative loadings for PC2 at 48 h. While one of these two isoforms still contributed to negative loadings, another showed positive loadings at 168 h, indicating that the PDH reaction was a possible site of regulation during prolonged exposure, possibly as part of the longer-term homeostatic response to lead. Other metabolic proteins, including arginine kinase, DHLDH and methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase (MMSDH) showed negative loadings for PC2 at 168 h and higher abundances at 0.25 μgL^{-1} lead. Overall, metabolic, mainly glycolytic, proteins contribute more negative loadings to PC2, which generally accompanies higher abundances, and supposedly greater glycolytic rates, at 0.25 μgL^{-1} lead.

Ferritin showed one isoform that contributed positive and two that contributed negative loadings to PC2 at 48 and 168 h. The other anti-oxidant protein that contributed positive loadings was peroxiredoxin1/2 (PRX1/2) at 168 h, coinciding with (non-significantly) lower abundance at 0.12 μgL^{-1} lead (see below), therefore departing from the assumption that positive loadings are associated with higher abundances in treatments on the positive range of the axis.

Again, the most common functional group, cytoskeletal proteins (mainly actin and MHC/MLC), were represented among the positively and negatively contributing proteins, especially at 12, 24 and 48 h, but less so at 168 h (Tables 1-4). In this context, it might be important that two different isoforms of cdc42 contributed high negative loading for PC2 at 12 and 24 h, possibly affecting the signaling cascade leading to cytoskeletal changes.

Finally, at 12 and 24 h, serine/threonine-protein phosphatase and cdc42 showed positive and negative loadings for PC2, possibly representing different and opposing signaling pathways affecting MLC (see below). Both, phosphorylase b kinase (involved in glycogen metabolism) and calcium-dependent protein kinase (probably involved in the phosphorylation of MLC isoforms) both contributed positive loadings to PC2 at 168 h, but not because of higher abundances at $0.12 \mu\text{gL}^{-1}$ lead (Table 2D).

12 hour exposure to lead (all significant proteins)

Fig. 2A

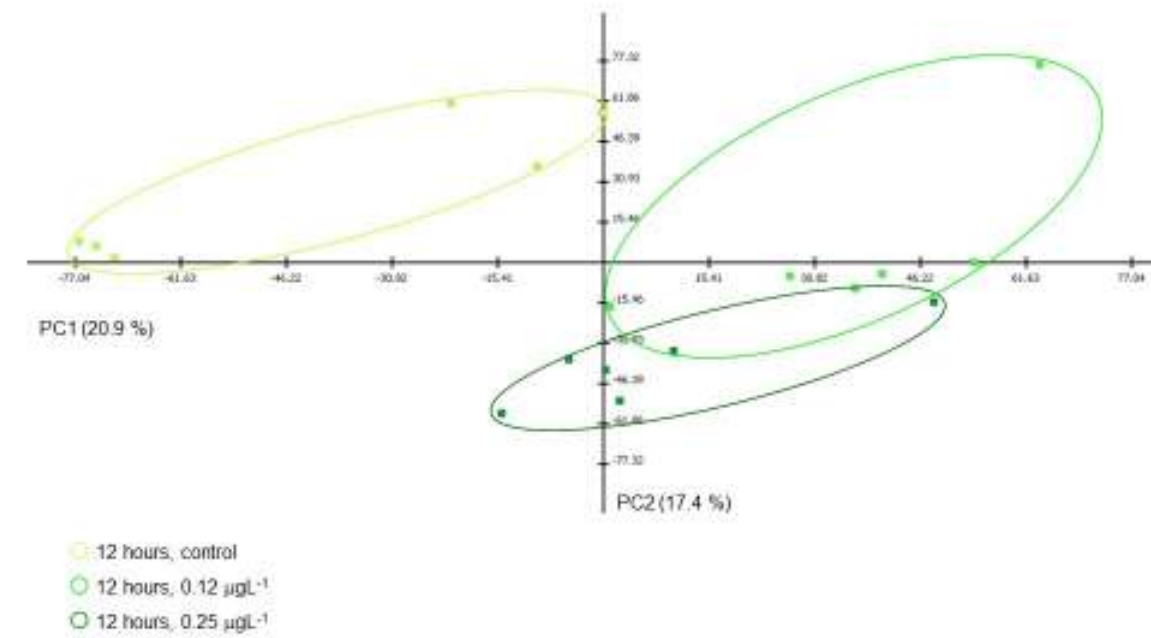


Figure 11: Principal component analysis (PCA) based on gill proteins that were identified and showed a significant change with lead organized by time. (A) 12 h, (B) 24 h, (C) 48 h, and (D) 168 h exposure (based on a two-way permutation ANOVA; $P \leq 0.02$). Each color represents a treatment group of *Nacella concinna* of a different combination of exposure time and lead concentration – for the 12 h time point: light green: control (0.0 µgL⁻¹); green: 0.12 µgL⁻¹; dark green: 0.25 µgL⁻¹. For the 24 h time point: light pink: control; pink: 0.12 µgL⁻¹; purple: 0.25 µgL⁻¹. For 48 h: yellow: control; orange: 0.12 µgL⁻¹; red: 0.25 µgL⁻¹. For 168 h: light blue: control; blue: 0.12 µgL⁻¹; dark blue: 0.25 µgL⁻¹. Principal components 1 and 2 (PC1 and PC2) and the percentage of the total variation of the selected (significant proteins) data set they explain are shown. See text for explanation of PC1 and PC2 for each PCA. (continues on the following pages)

24 hour exposure to lead (all significant proteins)

Fig. 2B

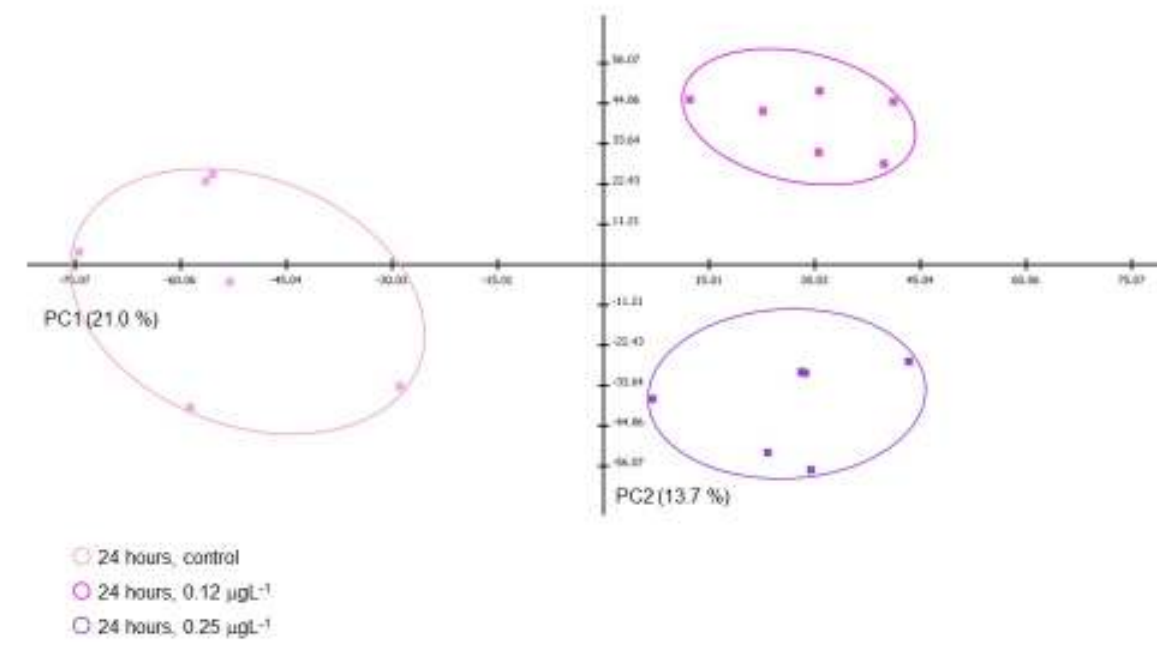


Figure 2: (sequel)

48 hour exposure to lead (all significant proteins)

Fig. 2C

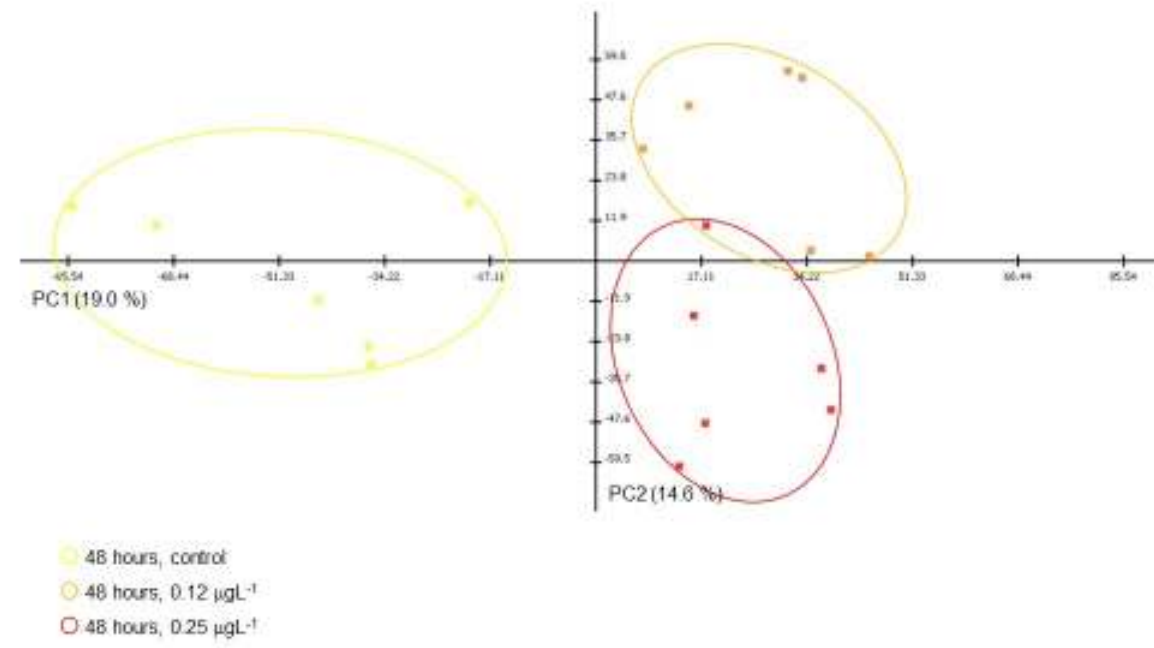


Figure 2: (sequel)

168 hour exposure to lead (all significant proteins)

Fig. 2D

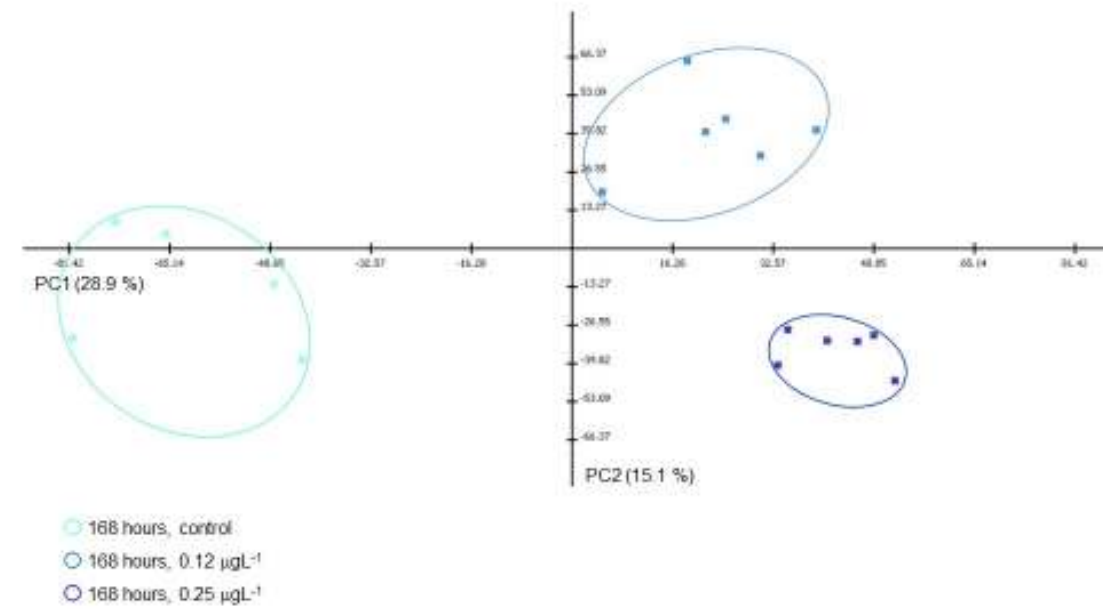


Figure 2: (sequel)

Table 1: Positive and negative loadings for principal component 1 and 2 of proteins significant for 12 hours exposition to lead (compare with Fig. 2A).

Component Loading Rank	Principle Component 1		Principle Component 2	
	Protein (Spot ID)	Loandin Value	Protein (Spot ID)	Loandin Value
Positive Loadings for 12 hours				
1	(a) Ferritin (162)	1,81208	(c) Actin (103)	2,05570
2	Actin (285)	1,80768	eIF 3 (210)	1,98197
3	Carbonic anhydrase (195)	1,68094	Actin (114)	1,80019
4	β Tubulin (165)	1,63848	Tropomyosin (22)	1,78655
5	Pyruvate dehydrogenase E1 (198)	1,47488	Actin (122)	1,76191
6	Methylmalonate-semialdehyde dehy (211)	1,45828	Pyruvate dehydrogenase E1 (132)	1,69542
7	Actin (96)	1,44798	Actin (116)	1,67519
8	Actin (116)	1,39061	Actin (104)	1,57708
9	Calreticulin (109)	1,34643	Calreticulin (109)	1,56808
10	Mit. Malate dehydrogenase (272)	1,28358	Serine/threonine phosphatase 2 A (123)	1,48852
Negative Loadings for 12 hours				
1	(b) Carbonic anhydrase (197)	-1,97391	(d) Isocitrate dehydrogenase NADP (245)	-1,69668
2	Dihydrolipoyl dehydrogenase (254)	-1,79706	Carbonic anhydrase (204)	-1,65000
3	Pyruvate dehydrogenase E1 (14)	-1,69043	Myosin heavy chain (63)	-1,58034
4	Myosin heavy chain (241)	-1,64151	Protein disulfide isomerase (50)	-1,57609
5	Myosin regulatory light chain (189)	-1,63204	Actin (62)	-1,55668
6	Actin (36)	-1,45007	α -enolase (56)	-1,40424
7	Myosin heavy chain (179)	-1,43709	Phosphoglycerate kinase (192)	-1,40243
8	Myosin regulatory light chain (185)	-1,41410	Cdc42 (205)	-1,34103
9	Paramyosin (181)	-1,41350	β Tubulin (165)	-1,18197
10	Dihydrolipoyl dehydrogenase (244)	-1,34183	Carbonic anhydrase (195)	-1,16624

Table 2: Positive and negative loadings for principal component 1 and 2 of proteins significant for 24 hours of exposition to lead (compare with Fig. 2B).

Component Loading Rank	Principle Component 1		Principle Component 2	
	Protein (Spot ID)	Loading Value	Protein (Spot ID)	Loading Value
Positive Loadings for 24 hours				
1	(a) Actin (218)	1,92827	(c) Actin (10)	2,05474
2	Ferritin (162)	1,87892	Myosin heavy chain (9)	2,04783
3	Actin (65)	1,87017	Actin (137)	1,95309
4	Mn Superoxide dismutase (160)	1,86687	β Tubulin (46)	1,91382
5	Actin (95)	1,86657	Actin (64)	1,90539
6	78 kDa Glucose-regulated protein (20)	1,85595	Myosin regulatory light chain (119)	1,86439
7	Actin (76)	1,79823	Actin (112)	1,81726
8	Myosin heavy chain (179)	1,70460	Serine/threonine phosphatase 2 A (123)	1,80209
9	Actin (62)	1,70186	G protein β (292)	1,75428
10	Aldehyde dehydrogenase (264)	1,66479	Myosin heavy chain (241)	1,66965
Negative Loadings for 24 hours				
1	(b) Carbonic anhydrase (197)	-1,88689	(d) β Tubulin (169)	-1,94819
2	Actin (143)	-1,73734	Arginine kinase (274)	-1,74492
3	Actin (114)	-1,70659	Paramyosin (181)	-1,59505
4	Cdc42 (205)	-1,68771	Filamin-C (233)	-1,58944
5	Actin (116)	-1,64557	Myosin catalytic light chain (186)	-1,45870
6	Peroxidase 1/2 (247)	-1,43176	Cdc42 (283)	-1,43678
7	Mit. Malate dehydrogenase (272)	-1,38728	Actin (122)	-1,40147
8	α -enolase (56)	-1,08086	Triosephosphate isomerase (249)	-1,34969
9	Actin (115)	-1,06304	Triosephosphate isomerase (224)	-1,20213
10	Pyruvate dehydrogenase E1 (14)	-1,04308	Actin (70)	-1,19122

Table 3: Positive and negative loadings for principal component 1 and 2 of proteins significant for 48 hours of exposition to lead (compare with Fig. 2C).

Component Loading Rank	Principle Component 1		Principle Component 2	
	Protein (Spot ID)	Loading Value	Protein (Spot ID)	Loading Value
Positive Loadings for 48 hours				
1	(a) Actin (114)	1,79489	(c) Dihydropyridyl dehydrogenase (254)	1,93543
2	Paramyosin (181)	1,73677	β Tubulin (169)	1,77021
3	Cdc42 (205)	1,62010	Phosphoglycerate kinase (192)	1,67557
4	Arginine kinase (237)	1,42303	Actin (143)	1,57960
5	Methylmalonate-semialdehyde dehyd. (264)	1,38784	Ferritin (162)	1,55136
6	Myosin catalytic light chain (184)	1,35179	β Tubulin (165)	1,46007
7	eIF3 (210)	1,34459	Calreticulin (43)	1,34515
8	Myosin heavy chain (179)	1,32972	Actin (122)	1,32463
9	Myosin regulatory light chain (189)	1,29358	Aldehyde dehydrogenase fam. 7 (242)	1,30168
10	Methylmalonate-semialdehyde dehydrog (211)	1,25447	Actin (297)	1,30147
Negative Loadings for 48 hours				
1	(b) Phosphorylase kinase α β (234)	-1,95837	(d) Actin (191)	-2,10195
2	Isocitrate dehydrogenase NADP (245)	-1,85437	Pyruvate dehydrogenase E1 (14)	-2,02865
3	Actin (218)	-1,81707	Proteasome β (305)	-1,93822
4	ADP Ribosylation factor (270)	-1,78843	Actin (36)	-1,81667
5	Pyruvate dehydrogenase E1 (132)	-1,74433	Myosin catalytic light chain (186)	-1,80209
6	Actin (116)	-1,63297	Ferritin (heavy) (66)	-1,74955
7	Ca-dependent protein kinase 2 (150)	-1,50677	Actin (62)	-1,69322
8	Mit. Malate dehydrogenase (272)	-1,49816	Actin (287)	-1,64958
9	Carbonic anhydrase (195)	-1,43945	Pyruvate dehydrogenase E1 (110)	-1,59030
10	Actin (137)	-1,40709	Actin (76)	-1,58938

Table 4: Positive and negative loadings for principal component 1 and 2 of proteins significant for 168 hours of exposition to lead (compare with Fig. 2D).

Component Loading Rank	Principle Component 1		Principle Component 2	
	Protein (Spot ID)	Loading Value	Protein (Spot ID)	Loading Value
Positive Loadings for 168 hours				
1	(a) Actin (95)	1,5955	(c) Actin (143)	2,0585
2	T-complex protein β (42)	1,5809	Phosphorylase kinase α β (234)	2,0316
3	Actin (36)	1,5724	78 kDa Glucose-regulated protein (20)	1,9043
4	β Tubulin (165)	1,5665	Ferritin (162)	1,6372
5	Mn Superoxide dismutase (160)	1,5632	Peroxidase 1/2 (247)	1,6149
6	Carbonic anhydrase (197)	1,5207	Tropomyosin (125)	1,5748
7	Actin (64)	1,4717	Carbonic anhydrase (195)	1,5445
8	Protein disulfide isomerase (50)	1,4279	α -enolase (56)	1,4599
9	Myosin regulatory light chain (119)	1,4178	Pyruvate dehydrogenase E1 (132)	1,4240
10	Ferritin (heavy) (188)	1,3907	Ca-dependent protein kinase 2 (150)	1,3333
Negative Loadings for 168 hours				
1	(b) Actin (104)	-1,6740	(d) Ferritin (316)	-1,9341
2	Myosin heavy chain (63)	-1,4921	Filamin-C (233)	-1,8132
3	Actin (122)	-1,4826	Dihydrolipoyl dehydrogenase (244)	-1,6989
4	Actin (137)	-1,4699	β Tubulin (169)	-1,5692
5	Actin (79)	-1,4534	Isocitrate dehydrogenase NADP (245)	-1,5393
6	Actin (52)	-1,4478	Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase (211)	-1,4885
7	Proteasome β (305)	-1,4102	Arginine kinase (237)	-1,4212
8	Actin (287)	-1,3614	Myosin heavy chain (179)	-1,4186
9	Carbonic anhydrase (204)	-1,3315	Pyruvate dehydrogenase E1 (14)	-1,3285
10	Actin (96)	-1,3308	Actin (76)	-1,3116

4.1. Oxidative stress

Protein abundances of isoforms of four antioxidant proteins, *Mn*-SOD, PRX1/2, ALDH7 and ferritin, changed throughout the entire exposure time (Figs 3 and 4). In cluster I, both *Mn*-SOD and two isoforms of ferritin increased with at least one of the lead concentrations at 12, 24 and 168 h. Protein abundance in cluster II, represented by PRX1/2 and ALDH7, tended to be lowest at 0.12 μgL^{-1} lead at 24 and 168 h, indicating a concentration-dependent response. Cluster III included two ferritin isoforms, which mainly showed an increase with time.

The reactions of *Mn*-SOD and PRX1/2 are first reducing superoxide anions (O_2^-) to hydrogen peroxide (H_2O_2), which is subsequently reduced to water, respectively, relying on NADPH as the reducing equivalent to reduce oxidized PRX through the thioredoxin and thioredoxin-reductase reactions (MAILLOUX *et al.*, 2013; MURPHY, 2009). Although potentially closely linked through their products and substrates, the changes in abundance of these two proteins did not cluster together. This is most likely because *Mn*-SOD and PRX1/2 are localized in the mitochondrion and cytosol, respectively. Specifically, *Mn*-SOD increased at 0.12 μgL^{-1} lead at 12 h relative to the control, but was not significantly elevated at higher lead concentrations again until 168 h (Fig. 4). PRX1/2 was lower at 0.25 μgL^{-1} lead in comparison to the control at 24 h (Fig. 4). Overall, higher lead concentrations decreased PRX1/2 levels at 24 h. Subsequent time points showed similarly low PRX1/2 levels regardless of treatment conditions. However, lead was associated with (not significantly) higher abundances at 12 and 48 h (Fig. 4). It is possible that PRX1/2 generally functions as an early response protein to elevated levels of H_2O_2 , as it has been shown to signal to the cell the presence of higher levels of H_2O_2 by oxidizing other proteins (JARVIS *et al.*, 2012). The changes in abundance of PRX1/2 showed an interaction effect, suggesting that it responded in phases, possibly in response to early cellular responses, e.g. a shift in acid-base balance due to changes in carbonic anhydrase at 12 h (see below).

The ferritin holoenzyme is a 24-mer that can contain different ratios of heavy (H) or light (L) subunits (MACKENZIE *et al.*, 2008). We were able to identify two of the isoforms (spots#188 and 66) as most likely representing the

heavy chain, which has ferroxidase activity and thus is able to convert Fe^{2+} to Fe^{3+} (AROSIO & LEVI, 2010). While the first of these two (spot#188) showed higher abundance for at least one of the two lead treatments relative to the control at 12 and 24 h of exposure, the second one (spot#66) showed overall higher levels with time (regardless of lead), starting at 24 h (Figs 3 and 4). However, this suggests that lead exposure causes an increase in ferritin (H) abundance, most likely to convert Fe^{2+} to Fe^{3+} at a higher rate to lower the risk of Fe^{2+} reacting with H_2O_2 to form the more reactive hydroxyl radical (Fenton reaction) during the first 24 h.

The other two isoforms of ferritin (spot#162, 316) could not be unequivocally identified as either one of the subunits, although their mass was lower in comparison. One of them (spot#162), clustering with *Mn-SOD*, showed higher abundance for at least one of the two lead treatments relative to the control throughout the entire exposure and was significant for a lead main effect (Fig. 3). The other one (spot#316) showed an overall increase in abundance with time. In contrast to the heavy chain, the light chain lacks the ferroxidase activity but instead facilitates the storage of iron and thereby sequesters Fe^{2+} from the cytosol, again, to prevent the Fenton reaction from generating hydroxyl radicals (AROSIO & LEVI, 2010). Regardless of which subunit these isoforms represent, they sequester or convert Fe^{2+} and thereby show antioxidant activity. Ferritins have been isolated in a number of marine mollusks (HE *et al.*, 2013; and references therein), including limpets (BURFORD *et al.*, 1986; WEBB *et al.*, 1986), and are likely involved in the innate immune response to pathogens by withholding iron (ONG *et al.*, 2006). Furthermore, their abundance is regulated by heavy metals such as Fe, Cu and Cd (QIU *et al.*, 2008; ZHENG *et al.*, 2010; ZHU *et al.*, 2011). Ferritin was induced after 6 h of exposure to Cd, Pb and Fe in the heteronemertean worm *Dendrorhynchus zhejiangensis* (LI *et al.*, 2012) and after four weeks of simultaneous exposure to both elevated P_{CO_2} and Cu in the oyster *Crassostrea virginica* (GOTZE *et al.*, 2014). In contrast, exposure to Cd, Cu and Zn lowered the expression of the ferritin transcript in the oyster *Saccostrea glomerata* (TAYLOR *et al.*, 2013), suggesting that metals might

have different effects on the transcriptional and translational regulation of ferritin.

Cluster I showed consistently higher abundance for at least ferritin throughout the entire exposure, suggesting that it is one of the most consistent responses to lead. This provides an indication that the antioxidant system of the cell is responding to an increase in ROS, which can, if not scavenged, disrupt various cellular structures and functions, e.g. the cytoskeletal dynamics, in other mollusks (MCDONAGH *et al.*, 2006; TOMANEK, 2012a). Protein damage by ROS can in turn challenge protein homeostasis.

Fig. 3

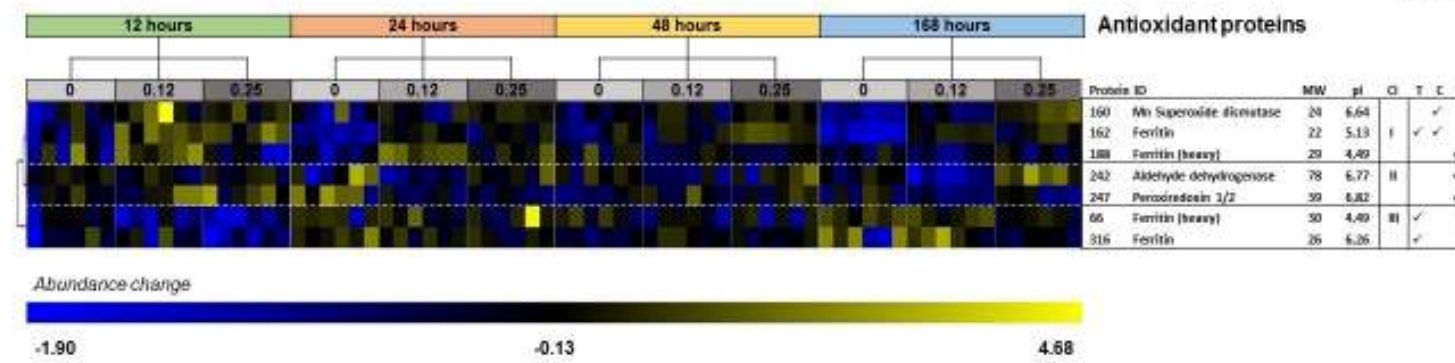


Figure 12: Hierarchical clustering of changes in abundance of antioxidant proteins. Clustering is based on Pearson's correlation of the response to lead exposure (control, 0.12 μgL^{-1} and 0.25 μgL^{-1}) for 12, 24, 48 and 168 h of gill proteins from the Antarctic limpet *Nacella concinna*. Blue coloring represents a lower than average protein abundance (standardized values normalized volumes), whereas yellow represents greater than average protein abundance. Each column represents an individual limpet, grouped by treatment (N=6 for each treatment). The rows represent the standardized abundances of proteins that are identified to the right and whose molecular mass and isoelectric point is listed. Significances for time of exposure, concentration or interaction effect are listed based on a two-way permutation ANOVA ($P \leq 0.02$).

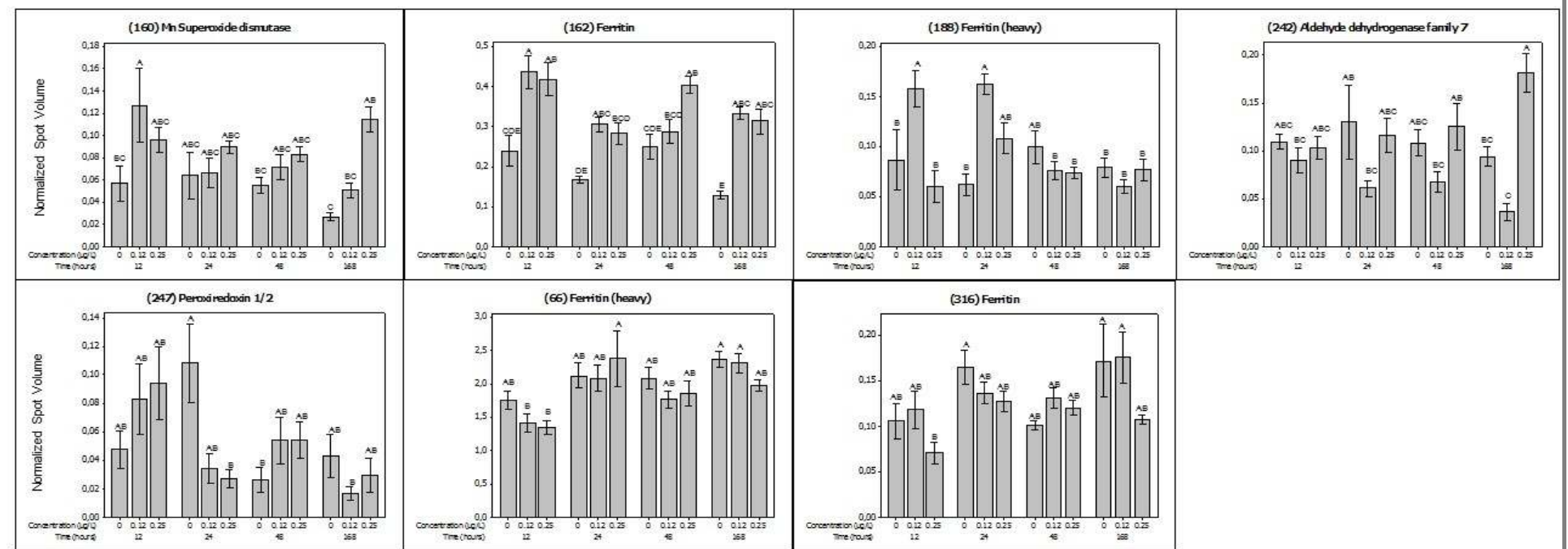


Figure 13: Changes in abundance of antioxidant proteins. Changes in abundance of antioxidant proteins from gill of *Nacella concinna* in response to lead exposure (control, 0.12 $\mu\text{g/L}$ and 0.25 $\mu\text{g/L}$) for 12, 24, 48 and 168 h. Spot volumes were obtained by normalizing against the volume of all proteins and show means \pm 1 s.e.m. (N=6). Means that do not share a letter are significantly different (Tukey's post-hoc analysis after general linear model; $P < 0.05$). Spot numbers are shown in parentheses.

4.2. Protein homeostasis

Proteins that responded to elevated concentrations of lead involved several molecular chaperones, proteases that eliminate aberrant proteins and proteins regulating protein synthesis (MORIMOTO *et al.*, 2012). Stress conditions can lead to the misfolding of proteins, which, if they cannot be refolded, will have to be degraded, otherwise they increase the rate of the formation of protein aggregates. In addition, *de novo* protein synthesis is prone to generate misfolded proteins as the proteins emerging from the ribosome are not fully folded and thus are more likely to expose hydrophobic side chains that are normally buried inside the protein. It is known that heavy metals interfere with protein folding *in vivo*, presenting one of the main mechanisms of metal toxicity (TAMÁS *et al.*, 2014). Metal toxicity derives, besides from impaired protein folding, from the competition with essential metal ions and the formation of metal protein complexes.

The proteins we identified include five isoforms of molecular chaperones, three proteasome subunits and one translation initiation factor (Figs 5 and 6). Cluster I showed changes in abundance of two chaperones: T-complex protein 1 (TCP1), a tubulin chaperone (STERNLICHT *et al.*, 1993), and the ER PDI both showed interaction effects and contributed positive loadings to PC1 at 168 h (Fig. 2D and Table 4). Both proteins showed significantly greater abundances with elevated lead at 48 h (Fig. 6), indicating that it took at least that long to induce protein damage that triggered increasing abundances of molecular chaperones.

Cluster II included one isoform of the ER calreticulin and the eukaryotic translation initiation factor 3 (eIF3) (Fig. 5). Overall, abundances of both of these proteins were lower with elevated lead, although only the abundance of eIF3 at 12 h was significantly lower at $0.25 \mu\text{gL}^{-1}$ (Fig. 6). The lower abundance of eIF3 suggest a reduction in protein synthesis (SHEIKH & FORNACE, 1999), and possibly lower levels of total protein, as has been shown in the green mussel *P. viridis* upon chronic lead exposure (HARIHARAN *et al.*, 2014).

Cluster III included three proteasome isoforms and two ER chaperones, an isoform of calreticulin and glucose-regulated protein 78 (GRP78) (Fig. 6). The most common response among these proteins were higher abundances at

0.12 μgL^{-1} lead at either 48 or 168 h, significantly so at least in one of these two time points for three of the proteins. It is therefore not surprising that three of these proteins contribute high loadings to PC2 at several time points (Fig. 2 and Tables 1-4). It is interesting that a concentration even higher than 0.12 μgL^{-1} lead did not cause an increase in abundance, possibly suggesting a mechanism for the phenomenon of hormesis (LEFCORT *et al.*, 2008; MOLLEREAU *et al.*, 2014).

Four of the chaperones, PDI, GRP78 and the two isoforms of calreticulin, responded to lead with a time-dependent increase or decrease, are located in the ER (ARAKI & NAGATA, 2012; BRAAKMAN & HEBERT, 2013), suggesting that lead affected protein folding and maturation in the ER, e. g. glycosylation in case of calreticulin (LIU *et al.*, 1997). Furthermore, the ER compartment is more oxidized than other cellular compartments to facilitate the formation of disulfide bonds by PDI (BULLEID, 2013). Any challenges to the redox balance of the cell therefore quickly affect protein maturation in the ER (CSALA *et al.*, 2010). Finally, maturation of secretory proteins in the ER is closely linked to the transport of vesicles via the Golgi apparatus and tubulin, as it provides the microtubular structures for vesicle transport. Thus, the observation that a tubulin chaperone is affected by lead exposure, in addition to several ER chaperones, further supports the hypothesis that lead caused a challenge to protein maturation in the ER. The identity of the proteins transported to the membrane, possibly for insertion into the cytoplasmic membrane or for secretion is unclear.

Lead has been found to bind to GRP78 and to impair its function as a chaperone in rat glioma cells (Qian *et al.* 2006). GRP78 was the chaperone with the highest constitutive level of expression and GRP78 mRNA levels increased with temperature in *N. concinna* (Clark *et al.* 2008). Another study on the Antarctic limpet showed that GRP78 is probably responsible for a more general stress response upon stressful conditions in the inter-tidal zone in comparison to other family members of the heat shock proteins (Clark and Peck 2009). The induction of PDI in Chinese mitten crabs upon Cd exposure suggested an

important role for this molecular chaperone during the response to heavy metal exposure (Silvestre et al 2006).

The elevated levels of proteasome subunits suggested that low levels of lead ($0.12 \mu\text{gL}^{-1}$) induce greater levels of protein degradation than higher levels at 48 and 168 h. It is likely that degradation, by removing aberrant proteins and preventing the formation of protein aggregates, is a response towards reestablishing protein homeostasis and that the lack of this response at the higher lead concentration is an indication of the toxicity of lead (Tyedmers et al. 2010).

In summary, lead exposure mainly caused an increase in protein degradation (cluster III) while simultaneously inhibiting part of the cellular machinery in charge of maintaining homeostasis, e.g. TCP1, early on (cluster I) and protein maturation in the ER later on. Lead ($0.25 \mu\text{gL}^{-1}$) also inhibited the initiation of protein synthesis (eIF3) early on. Our results, together with previous studies, strongly support the hypothesis that lead affected protein homeostasis, specifically protein degradation and maturation, in *N. concinna* gill.

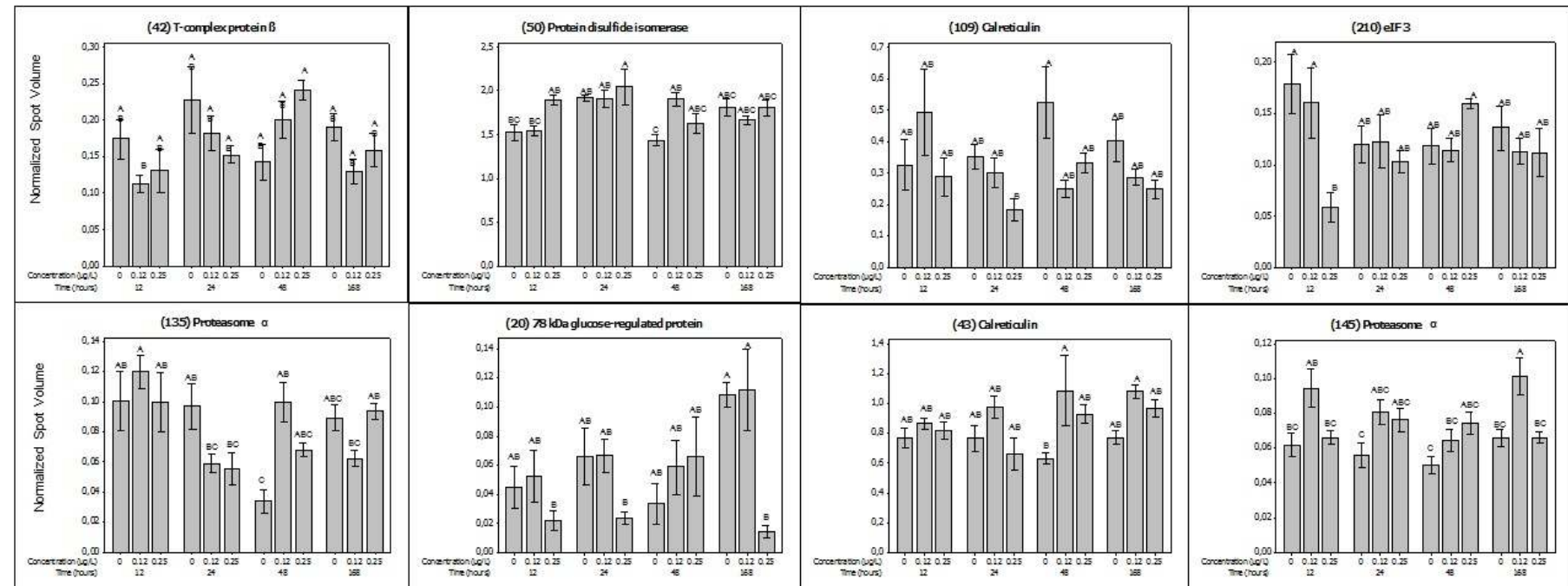


Figure 15: Changes in abundance of proteins representing protein homeostasis. Changes in abundance of proteins representing protein homeostasis from gill of *Nacella concinna* in response to lead exposure (control, 0.12 μg/L-1 and 0.25 μg/L-1) for 12, 24, 48 and 168 h. For additional details, see Fig. 4.

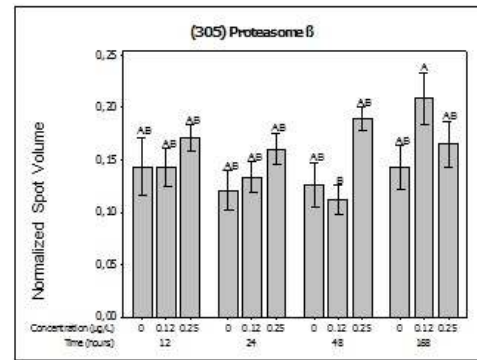


Figure 6: (sequel)

4.3. Energy metabolism

Proteins representing phosphotransferases, glycolysis and the tricarboxylic acid (TCA) cycle were all identified to be responding to lead exposure (Figs 7 and 8). In addition, several isoforms of carbonic anhydrase (CA) indicated that lead affected the formation of bicarbonate from metabolic CO₂ and therefore acid-base balance. We also included a signaling protein, phosphorylase kinase a (β subunit), as it is likely involved in the breakdown of glycogen via glycolysis (GRIFFITHS, 1981; MICHAL & SCHOMBURG, 2012).

Cluster I included proteins, PDH E1 β and two isoforms of CA, which increased abundance for both lead concentrations at 12 h, and mitochondrial malate dehydrogenase (mMDH), which showed higher abundance at 0.12 $\mu\text{g l}^{-1}$ only (Fig. 8A). One CA isoform (spot#204) maintained higher abundance with lead until 48 h, but then reversed, with (0.25 $\mu\text{g l}^{-1}$) reducing abundance. Both CA isoforms contributed high loadings to PCs at 12, 48 and 168 h (Tables 1-4). The PDH isoform (spot#198) did so as well for 12 h. Thus, the proteins of this cluster greatly contributed to the separation of treatment groups and increased abundances “early” during the time course.

Cluster II included one isoform of PDH (E1 subunit), dihydrolipoyl dehydrogenase (DDLHDH) and phosphorylase kinase β and two of triose phosphate isomerase (TPI) and methylmalonate semialdehyde dehydrogenase (MMSDH), which is part of the valine oxidation pathway (CLAESSENS *et al.*, 2007; WANDERS *et al.*, 2012)(Fig. 7). The common feature of this cluster is the lower abundances at elevated lead with prolonged exposure time, with three of the proteins showing a concentration main effect. Both phosphorylase kinase β and TPI showed significant lower abundance late (24, 48 and 168 h) in the exposure for one of the lead concentrations (Fig. 8). The former also contributed positive loadings to PC2 at 168 h (Table 4C).

Two out of four proteins showed lower abundance with lead at 12 h in cluster III: PDH E1 α (spot#110) and CA (spot#197) (Fig. 7C). The other two proteins, the phosphotransferase arginine kinase and the glycolytic phosphoglycerate kinase showed interaction effects but no significant pairwise comparisons.

Cluster IV included eight metabolic proteins total, three of which showed higher abundances with one of the lead concentrations relative to the control at 24 h, six did so at 168 h, but two of those also showed lower abundances with lead at 48 h (Figs 7 and 8D). Among those proteins that showed greater abundance with lead at 168 h are isoforms of arginine kinase, the glycolytic TPI and enolase, the E1 subunit of PDH, DHLDH and O-glycosyl hydrolase. Thus, lead increased arginine kinase, two glycolytic proteins, PDH and a TCA cycle protein, suggesting an increase in metabolic demand with lead exposure at 168 h. The proteins in this group represent the “late” response cluster.

One of the two arginine kinase isoforms (spot#274) had a ten times higher abundance at 168 h of lead exposure. Two of the low-abundance TPI isoforms showed lower, the high-abundance isoform (spot#224) even higher abundance with lead at 168 h. TPI levels could be shifting due to PTMs or total abundance could increase to accelerate the rate of glycolysis. An increase in overall glycolysis is also supported by an increase of α enolase at $0.25 \mu\text{gL}^{-1}$ at 168 h. The third glycolytic protein, phosphoglycerate kinase, did not show any significant differences in abundance at 168 h. Of the four PDH isoforms, one was low-abundant (spot#132), two medium-abundant (spots#110 and 14) and one highly abundant (spot#198). One of the medium-abundant isoforms (spot#14) increased abundance with lead at 24 h and 168 h, the highly abundant one did so at 12 h. The TCA cycle proteins NAD-ICDH, DHLDH (two isoforms) and mMDH, showed no consistent changes. The two DHLDH isoforms showed lower (spot#244) and higher (spot#254) abundances with lead at 12 h and 168 h, respectively, possibly shifting PTMs. The NADP-dependent ICDH showed lower abundance with lead at 48 h, possibly inhibiting the efficient scavenging of ROS, as this process relies on NADPH as reducing equivalent (MAILLOUX *et al.*, 2013; MURPHY, 2012). One MMSDH decreased abundance with $0.12 \mu\text{gL}^{-1}$ relative to the control at 168 h. MMSDH is involved in valine metabolism, which, together with the metabolism of other branched-chained amino acids, resembles in many ways the β -oxidation of fatty acids (SALWAY, 2004), and can respond in opposite direction to glycolysis in

response to a high fat load in humans (CLAESSENS *et al.*, 2007). In conclusion, exposure to lead for 168 h increased the abundance of a number of metabolic proteins representing phosphotransferases, glycolytic reactions and the reaction of pyruvate dehydrogenase but not those of the TCA cycle, with DHLDH (spot#254) being the exception. Lead has been shown to affect enzymes involved in carbohydrate metabolism, including glycolysis, in rats and humans, in part through the induction of insulin resistance (KASPERCZYK *et al.*, 2013; MOSTAFALOU *et al.*, 2015). Exposure to cadmium decreased glycogen content in liver and muscle tissue of the common carp, consistent with a higher rate of glycolysis (CICIK & ENGIN, 2005).

Of the three carbonic anhydrase isoforms, two that differed by mass clustered together (cluster I) and showed higher abundance with lead at 12 h as well as 24 and 48 h (spot#204 only). The latter isoform then reversed this patterns and showed lower abundance relative to the control at 0.25 μgL^{-1} at 168 h. The third isoform (spot#197) showed lower abundance with lead at 12 h. CA activity is important for acid-base balance and ion transport, specifically in the gill. Heavy metals, i.e. cadmium, have been shown to inhibit CA in a tissue-specific matter in the European eel (*Anguilla anguilla*) and gills of the crabs *Callinectes sapidus* and *Carcinus maenas*, possibly because Cd might replace the Zn associated with CA, thereby rendering it inactive (LIONETTO *et al.*, 2000; SKAGGS & HENRY, 2002b). In humans, lead has been shown to be a very effective non-competitive inhibitor of CA (EKINCI *et al.*, 2007). Cadmium also inhibited CA of the mussel *Mytilus galloprovincialis* in mantle but not digestive gland (CARICATO *et al.*, 2010). Our results suggest that the effect on the abundance of CA depended on the specific isoform. If these changes in abundance are increasing activity or are an indication of compensating for an inactive enzyme and the overall effect is still one of lower CA activity, is unclear.

Phosphorylation of the β -subunit of phosphorylase kinase *a* converts the inactive phosphorylase *b* into the active *a* form, which catalyzes glycogenolysis (FISCHER, 2013; MICHAL & SCHOMBURG, 2012). Importantly, phosphorylase kinase *a* showed lower abundance with lead, significantly so at 12, 24 and 48 h,

suggesting that its activity of phosphorylating phosphorylase *b* and thus catalyzing the breakdown of glycogen decreased with lead. However, since the β subunit of phosphorylase kinase has to be phosphorylated to form the fully active holozyme (MICHAL & SCHOMBURG, 2012), the effect of this isoform on glycogen metabolism depends on identifying its phosphorylation status, which we weren't able to do.

In summary, given these results we hypothesize that lead increased the abundance and possibly the activity of CA and thus affected acid-base balance at 12 h and that prolonged exposure (168 h) induced an increase in phosphotransferases and glycolysis in gill of *N. concinna*.

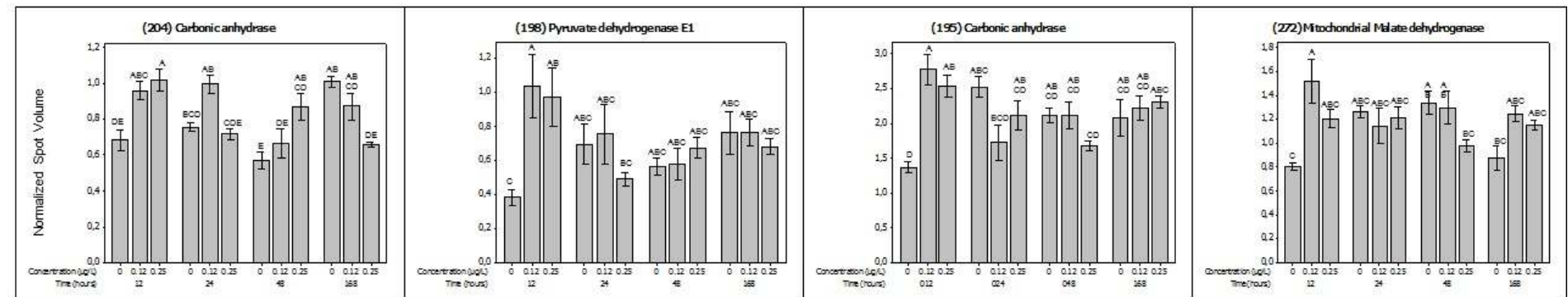


Figure 17: Changes in abundance of proteins representing energy metabolism. Changes in abundance of proteins representing energy metabolism from gill of *Nacella concinna* in response to lead exposure (control, 0.12 µg/L and 0.25 µg/L) for 12, 24, 48 and 168 h. Proteins belong to cluster I (A), II (B), III (C) and IV (D) of Fig. 7. For additional details, see Fig. 4.

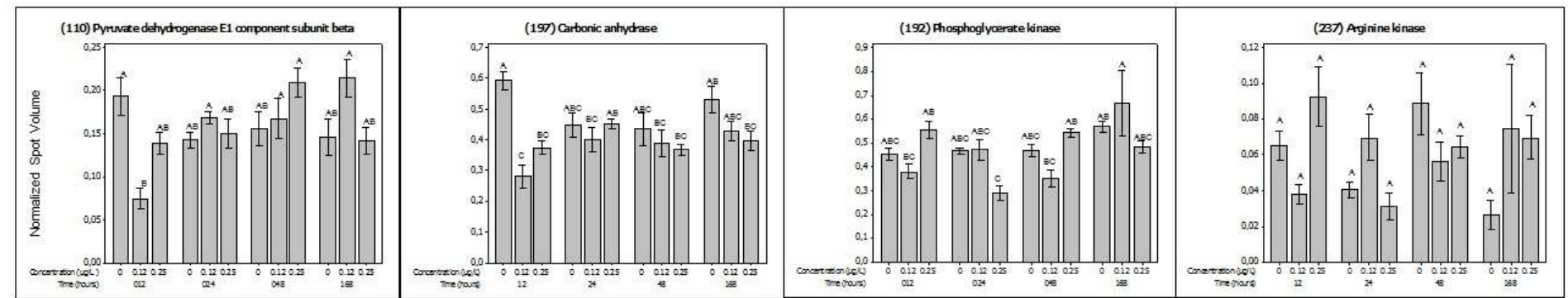


Figure 8: (sequel)

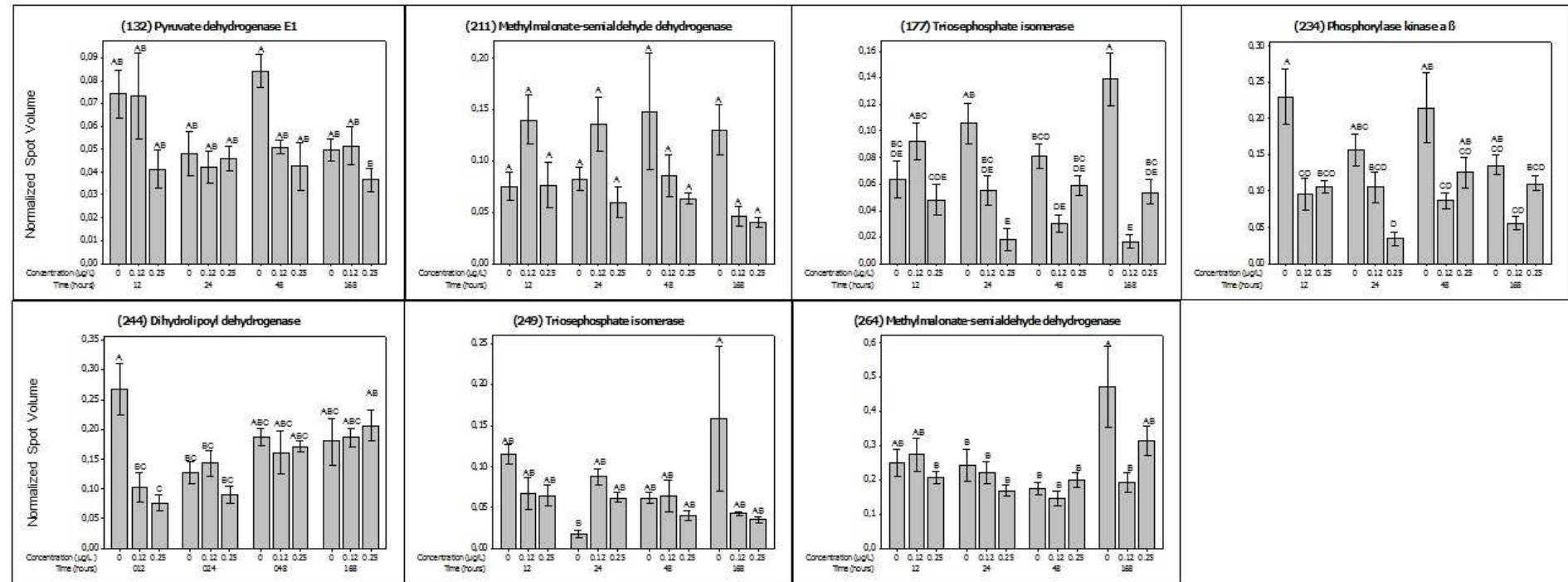


Figure 8: (sequel)

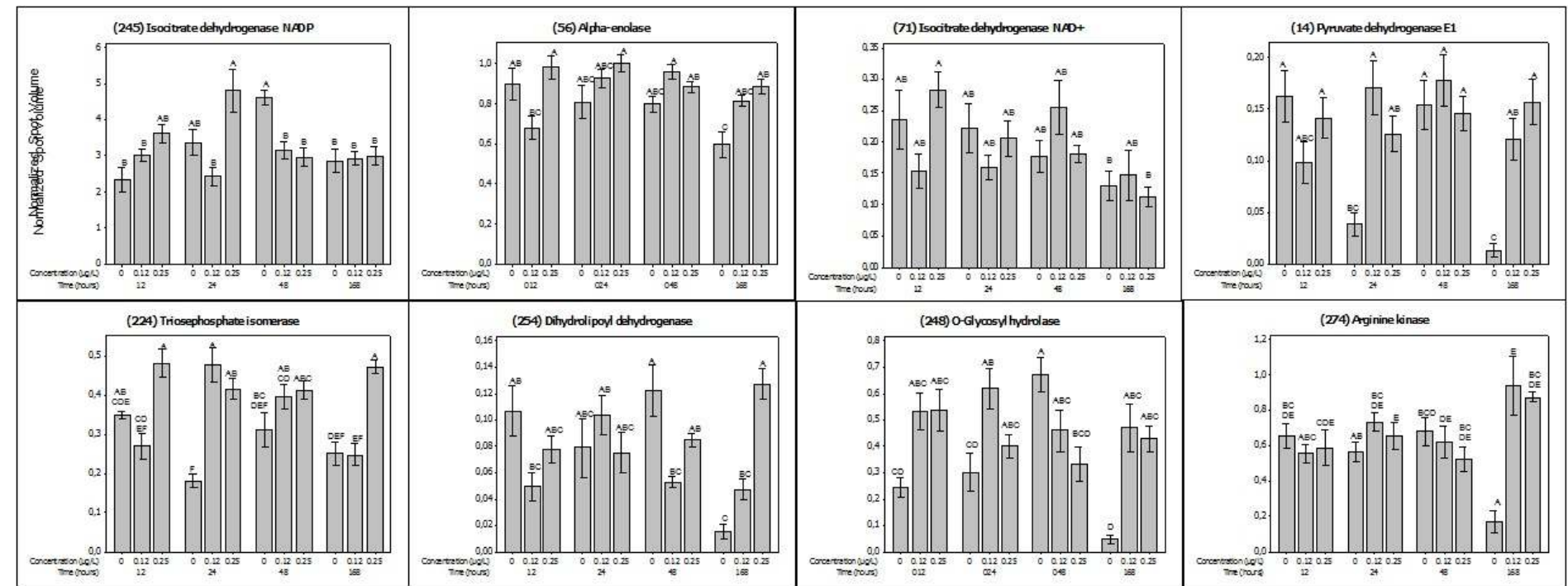


Figure 8: (sequel)

4.4. Cytoskeletal proteins

We can distinguish five clusters of changes in abundance of proteins related to the cytoskeleton (Fig. 9). Besides a number of actin and myosin heavy and light chain isoforms (MHC and MLC, respectively), we identified smooth muscle paramyosin, tropomyosin, calponin and filamin C, which directly interact with actin filaments (LEE & DOMINGUEZ, 2010). In addition, we included several signaling proteins that are involved in cytoskeletal rearrangements during stress (*cdc42*), affect MLC activity through (de-) phosphorylation (serine/threonine phosphatase 2A and Ca-dependent protein kinase 2) and vesicular transport involving the cytoskeleton (ADP-ribosylation factor).

The first cluster included five actin isoforms with consistently (around 15 kDa) higher molecular mass than typical for the monomeric actin (~45 kDa). The abundance of these actins generally increased at 0.25 μgL^{-1} at 24 h, and 0.12 μgL^{-1} lead at 48 h, but at 168 h the abundance of all isoforms decreased with increasing lead (Fig. 9).

Cluster II included eight actins, five of about 45kDa, two with slightly higher (51kDa) and one with lower (37kDa) mass. In addition, this cluster included two tropomyosin isoforms that greatly differed in mass (96 and 45kDa) and a MLC isoform of twice the typical mass (~43kDa). Finally, this cluster included serine threonine phosphatase 2A, Ca-dependent protein kinase 2, the small G-protein *cdc42* and the trimeric G-protein β subunit, all signaling proteins that are putatively playing a role in regulating the phosphorylation of MLC isoforms. The overall change in abundance of proteins in this cluster indicate an increase with 0.12 μgL^{-1} lead at 12 h, but then a subsequent decrease with lead over the remaining exposure period. This pattern is illustrated best by *cdc42* (spot#205; Fig. 10A). However, both serine threonine phosphatase 2A and Ca-dependent protein kinase 2, which cluster with *cdc42*, do not show an interaction but instead a time effect (Fig. 9).

Cellular (non-muscle) tropomyosin (Tm) is mainly associated with actin (GUNNING *et al.*, 2008). While the typical Tm molecule is a dimer of about 35kDa, the mass of the two Tm isoforms of this cluster is greater (45 and 96kDa), but similar to the mass we observed in another invertebrate

(GARLAND *et al.*, 2015). Interestingly, over 40 Tm splice variants are associated with the cytoskeleton of non-contractile cells, highlighting the potential for various actin regulatory functions (GUNNING *et al.*, 2008). Phosphorylation of Tm generates additional isoforms and implicates Tm in the regulation of stress fiber formation. In general, Tm regulates actin conformation and thereby actin-myosin interaction. This interaction is further regulated by MLC isoforms and their phosphorylation status (COLE & WELSH, 2011). Furthermore, both serine threonine phosphatase 2A and Ca-dependent protein kinase 2 might be directly involved in regulating the phosphorylation status of MLC isoforms (BUTLER *et al.*, 2013; STULL *et al.*, 2011). However, potentially even more significant, further upstream, cdc42, a well-characterized small G-protein, might affect actin-myosin interactions, as cdc42- controlled kinases affect MLC phosphatases, i.e. possibly phosphatase 2A, and thereby inhibit the formation of actin-myosin stress fibers (MARKS *et al.*, 2009). Different types of stress fibers contain distinct combinations of actin, MHL and MLC as well as tropomyosin isoforms and often resemble sarcomere-like contractile structures (VALLENIUS, 2013). Stress fibers are induced in response to mechanical stress triggering the need for cells to oppose or compensate for these forces to maintain their structure (SMITH *et al.*, 2014). The fact that several of these proteins first increased and then decreased with lead, specifically cdc42, which inhibits their formation (MARKS *et al.*, 2009), might suggest a switch from a lower rate early on to a higher rate of stress fiber formation with prolonged exposure to lead. At some point specifically referring to the putative formation of stress fibers, Cd-induced oxidation of peptidyl-cysteines affected a number of cytoskeletal proteins in murine lung epithelial cells, including cdc42 and MLC isoforms (GO *et al.*, 2013).

Cluster III includes three actins of high molecular mass, two myosin heavy chains (MHC) and paramyosin. While the MHC makes up the head as well as the rod of the thick filament (N- and C-terminus, respectively), paramyosin is only part of the rod in invertebrates (CLARK *et al.*, 2002; HOOPER *et al.*, 2008; SQUIRE, 2009). The cluster is characterized by a

decrease in abundance with lead at 12 h, with one MHC (spot#241) and paramyosin being significantly lower at either just $0.12 \mu\text{gL}^{-1}$ or both concentrations, respectively (Fig. 10C). In crustaceans, similar changes are an indication of changes in fiber type (MEDLER *et al.*, 2004), possibly indicating shifts between different types of stress fibers similar but with opposing protein compositions to the changes of cluster II (VALLENIUS, 2013).

Cluster IV included nine actins, with three isoforms representing fragments ranging in mass from 12-18kDa, two tubulins, low mass MHC, the actin-binding and membrane-anchoring filamin-C (VAN DER FLIER & SONNENBERG, 2001) and another isoform of cdc42 (Fig. 9). Four, five and eight proteins of this cluster showed a significant change due to a time or concentration main or an interaction effect, respectively. The cdc42 isoform (spot#283) was in general equally abundant as the isoform from cluster II, but it did not show any significance for pairwise comparisons within a time point (Fig. 10B and C).

The final cluster (V) included three actins (one of a mass of 100kDa), one tubulin, two Tm isoforms, one MHC and four MLC (regulatory and essential isoforms of almost equal mass), calponin, a mechano-sensitive inhibitor of myosin ATPase and (ROZENBLUM & GIMONA, 2008; WU & JIN, 2008) and the ADP-ribosylation factor, which is involved in vesicle formation (MARKS *et al.*, 2009). The general pattern of changes in abundance indicates that most of the proteins in this cluster responded to lead strongly at 24 h and a little less strongly at 168 h, but not at 12 and 48 h. Almost all of the non-actin and non-tubulin proteins graphed showed significant pairwise differences between the control and one or both of the lead concentrations at 24 h, and similarly at 168 h, but with few pairwise significances (Fig. 10C). These results suggest modification of the catalytic rate of actin-myosin interactions, possibly through changes in the phosphorylation of MLC isoforms (compare to the opposite pattern of changes for cdc42[spot#205], which affects MLC kinases at 24, 48 and 168 h), and vesicle formation with lead after 24 and 168 h of exposure.

In summary, lead affected the composition of actin-myosin contractile fibers of all or at least one particularly abundant cell type of the limpet gill. The exact changes are difficult to deduce from the proteins identified and their changing abundances, but involve actin isoforms, which greatly differed in mass, MHC and MLC isoforms as well as paramyosin, which together constitute the thick filament in invertebrates; tropomyosin, which affects the interaction of a number of proteins with actin; two other actin-binding proteins, calponin and filamin-C, and several signaling proteins, most importantly the small G-protein cdc42. We can only infer a broad interpretation of these changes and hypothesize that they indicate that a number of actin-myosin associated protein isoforms undergo changes in abundance with lead, possibly affecting the type and dynamics of actin-myosin stress fibers in non-muscle cells.

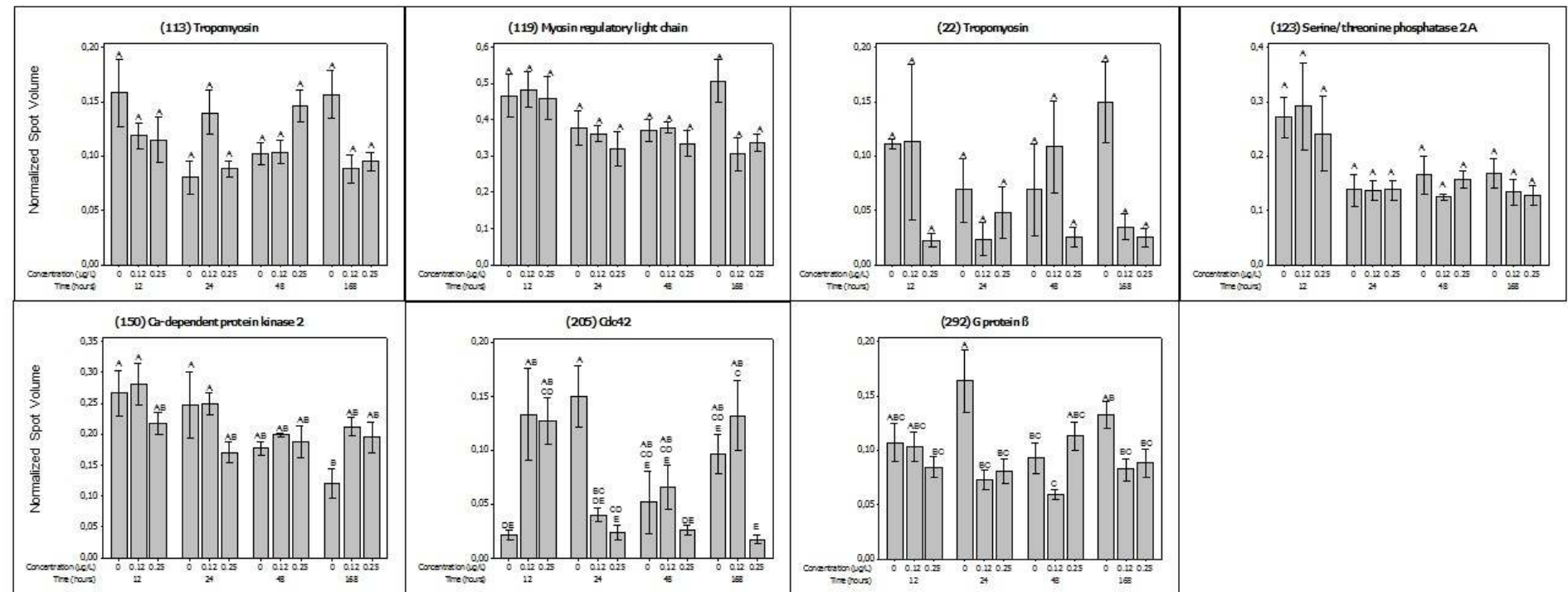


Figure 19: (A) Changes in abundance of proteins representing cytoskeletal structure and dynamic. Changes in abundance of proteins representing cytoskeletal structure and dynamic from gill of *Nacella concinna* in response to lead exposure (control, 0.12 µg/L and 0.25 µg/L) for 12, 24, 48 and 168 h. Proteins belong to cluster II (A), III (B), IV (C) and V (D and E). For additional details, see Fig. 4.

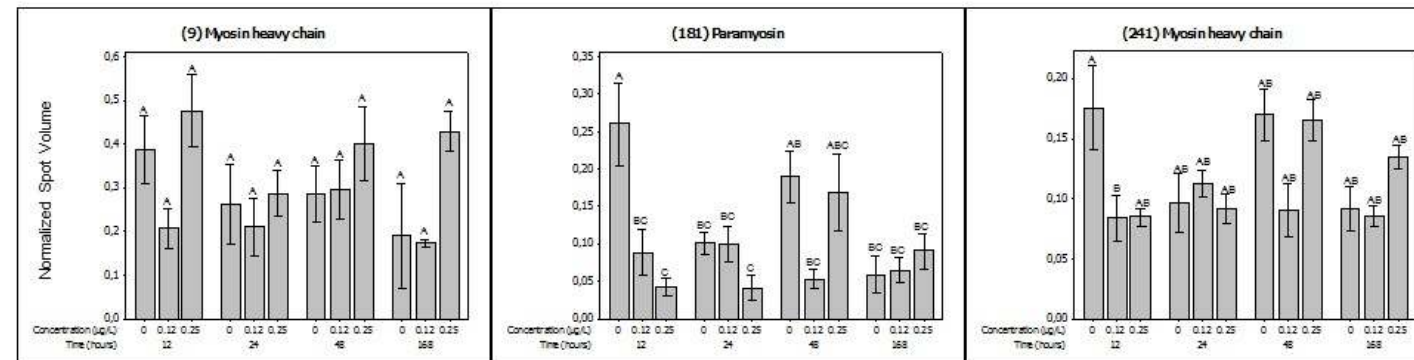


Figure 10: (B) (sequel)

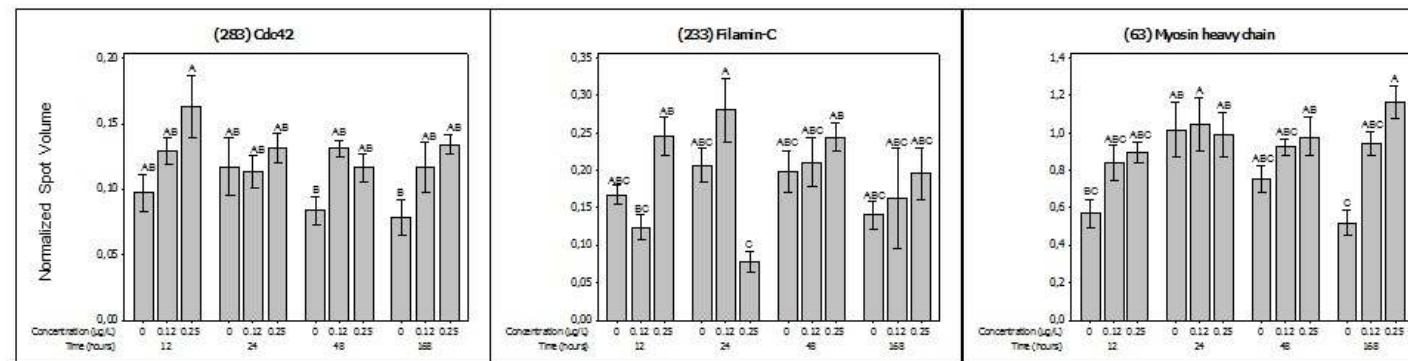


Figure 10: (C) (sequel)

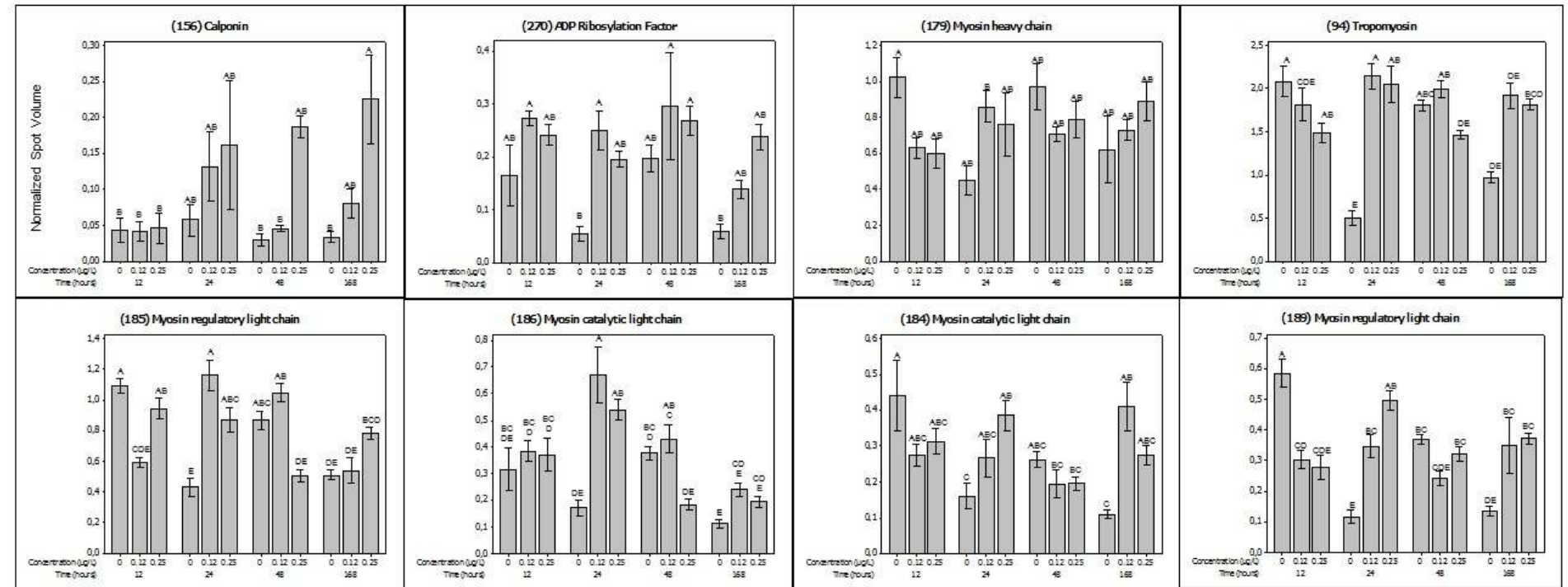


Figure 10: (D) (sequel)

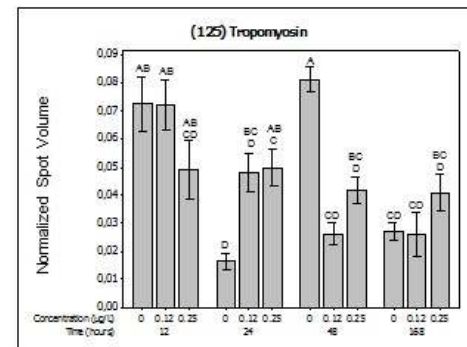


Figure 10: (sequel)

5. CONCLUSION

When we conducted separate analyses for each time point, lead treatments were consistently separated from the control along PC1 and from each other along PC2, more so with time, with an increase of the percentage of PC1 explaining the variation from about 20% at 12, 24 and 48 h to 29% at 168 h (Fig. 2). When we considered loadings to PC1, cytoskeletal proteins contributed more early on and less at 168 h. Instead, more proteins representing oxidative stress, chaperoning and energy metabolism contributed to separating the treatments at 168 h. This suggests that these functions represent some of the possibly longer-term cellular adjustments to establish a new state of homeostasis. It also suggests that lead affects the cytoskeleton early on. More generally, these results demonstrate how the time of tissue collection determines the outcome of the proteomic changes one would observe.

Antioxidant proteins, specifically ferritin and *Mn*-SOD responded with an increase in abundance with lead early on (12 and 24 h) and throughout the experiment (ferritin, spot#162)(Figs 3 and 4). Both proteins are metal-binding proteins and it is possible that lead competes with the binding of these metals. If this affects the function of these proteins, e.g. reducing the rate of scavenging superoxide anions or of binding Fe^{2+} , it is possible that the net generation of ROS will increase and affect other cell components.

It is possible that greater ROS production affected protein maturation in the ER, as this process is closely linked to the redox status of this compartment (CSALA *et al.*, 2010). Furthermore, stressful hypos-saline conditions have suggested a similar link in gill of the mussel *Mytilus* (TOMANEK, 2015; TOMANEK *et al.*, 2012). While several ER chaperones either showed a concentration or interaction effect (few showed significant differences in pairwise comparisons), two α subunits of the proteasome increased with lead at 48 and 168 h, suggesting that protein chaperoning was inadequate to prevent protein denaturation (Figs 5 and 6). The lower abundance of eIF3 with lead at 12 h suggested that protein synthesis was inhibited early on.

Lead also increased the abundance of CA at 12 h, possibly affecting acid-base balance, which could be a secondary stress and a factor affecting a

number of other cellular processes later in the exposure. Again, CA is a metal-binding protein (Zn) and replacing the metal is the most likely mechanism of how lead affects CA (LIONETTO *et al.*, 2000; SKAGGS & HENRY, 2002b). Furthermore, biochemical reactions that increase their rates of supplying ATP under stressful conditions, those of arginine kinase, two glycolytic reactions, catalyzed by TPI and enolase, as well as the reaction of PDH at 168 h, possibly indicate metabolic stress and inhibition or damage to other metabolic pathways. It is possible that a shift in acid-base balance through the increased abundance of CA at 12 h triggered changes that affected energy metabolism later on at 168 h, although the time course of such feedback responses is largely unknown.

Finally, *cdc42*, a key signaling protein of cytoskeletal dynamics, increased in response to $0.12 \mu\text{gL}^{-1}$ at 12 h and subsequently decreased at either one of the lead concentrations at 24, 48 and 168 h (Fig. 10A). Some of the changes that may be downstream from this signaling protein include possible modifications of the tail region of the thick filament, as indicated by a decrease of paramyosin and MHC (spot#241) with lead at 12 h (Fig. 10B). Elevated levels of four MLCs, among them catalytic isoforms, with lead followed at 24 and 168 h and might indicate additional changes linked to the time course of *cdc42* (Fig. 10D). *Cdc42* was also found to increase with heat stress in gill of *Mytilus* (TOMANEK & ZUZOW, 2010a).

Our results indicate that a time course of proteomic changes provides a more comprehensive picture of the dynamics of the cellular response to lead. The proteomic changes also confirm that lead affects a number of metal-binding proteins, including *Mn*-SOD, ferritin and CA, possibly by replacing the metals these proteins are binding for their function. Changes in antioxidant proteins, ER chaperones, metabolic and cytoskeletal proteins, including signaling proteins affecting cytoskeletal dynamics indicate that lead affected the generation of ROS, possibly affecting the highly redox-dependent maturation of proteins in the ER. Furthermore, a shift in abundance towards metabolic pathways that are recruited for ATP synthesis during stress or high ATP turnover, the phosphotransferase shuttle and glycolysis, in response to lead

indicated that the response to lead is energetically challenging. It might be linked to increased abundances of CA with lead early on. Finally, lead might cause restructuring of the thick filaments, including several catalytically active MLC isoforms, possibly leading to the formation of actin stress fibers.

The link between oxidative stress, a challenge to acid-base balance and the activation of cdc42, possibly triggered by increased levels of ROS, might cause downstream effects on protein maturation, energy metabolism and thick filament restructuring. Together, these processes will challenge cellular homeostasis and affect the ability of *N. concinna* to respond to any additional stress, i.e. possible hypo-saline stress from an increase in melting ice, as several of the same processes, e.g. ER protein maturation and antioxidant proteins, are affected by both stresses in gills of mollusks (TOMANEK *et al.*, 2012).

CAPÍTULO 2

RESPOSTAS PROTEÔMICAS INDUZIDAS PELO COBRE EM BRÂNQUIAS DA LAPA ANTÁRTICA *NACELLA CONCINNA* (GASTROPODA: PATELLIDAE).

1. INTRODUÇÃO

A contaminação ambiental é uma ameaça real para as espécies aquáticas. Recentemente o problema tem se agravado, mas os primeiros registros datam do início da era industrial (FINGERMAN *et al.*, 1998). Tradicionalmente a quantidade de metais no ambiente marinho é descrita em concentrações muito baixas e a sua alteração se deve à interferência antropogênica, principalmente nas regiões costeiras (ocupação humana, atividade mineradora ou processamento de produtos químicos e metais), contribuindo para a elevação desses níveis (HEBEL *et al.*, 1999).

Aparentemente, os metais em baixas concentrações atuam muito mais por meio de hormônios e/ou distúrbios enzimáticos do que por meio de outras vias. Já, em concentrações elevadas, podem através de intensa produção de radicais livres e rápidos danos a vários sistemas celulares, resultar em hipóxia e alteração no balanço eletrolítico dos animais (GOTZE *et al.*, 2014; SRIVASTAVA, 1982; VALKO *et al.*, 2005). Poucos estudos têm sido feitos envolvendo processos de desregulação endócrina (FINGERMAN *et al.*, 1998), mas respostas hiperglicemiantes em espécies de invertebrados expostas a diversos poluentes, incluindo pesticidas, hidrocarbonetos e metais, têm sido reportadas por alguns autores (FINGERMAN *et al.*, 1998; RODRÍGUEZ *et al.*, 2007).

O cobre, é um elemento traço essencial para moluscos aquáticos estando presente em enzimas e sendo importante para a funcionalidade da hemocianina, que nos moluscos e outros invertebrados é o pigmento respiratório responsável pelo transporte de oxigênio (BRIX *et al.*, 2011). O cobre está presente no ambiente marinho em concentrações próximas de 0,1 µg Cu/L, mas concentrações maiores são encontradas no Mar do Norte (0,2 a

2,6 µg Cu/L) e em alguns estuários do Reino Unido (2 a 3 µg Cu/L) (DUINKER *et al.*, 1982; MORRIS, 1984) (DUINKER & NOLTING, 1982; MORRIS, 1984). Em concentrações que excedem o valor essencial que é variável de organismo para organismo, o cobre é altamente tóxico (HARRIS, 1991; LAWSON, 1995). Portanto, espécies que habitam zonas de maré e outras regiões costeiras, como a lapa antártica *Nacella concinna*, estão claramente em risco em decorrência dos efeitos tóxicos do cobre. Para serem tóxicos, os metais precisam estar biodisponíveis (MAJER *et al.*, 2014). Estudos recentes revelaram a existência de rotas de tomada de cobre nos moluscos que não a ingestão via dieta, e têm identificado as brânquias como os locais principais da entrada de cobre (HEBEL *et al.*, 1999; RAINBOW & BLACK, 2005). Informações específicas sobre os efeitos de contaminantes em espécies antárticas são necessários para garantir que as normas ambientais constantes no Protocolo de Madri e aplicadas à Antártica sejam apropriadas para as condições locais (BLAY, 1992).

Estudos recentes revelam que quando tratamos do metal cobre um fator a se considerar é a ressuspensão dos sedimentos contaminados que pode ser uma importante via de toxicidade para os organismos antárticos (CAROLI *et al.*, 2001a). Distúrbios como a dragagem, movimentos de embarcações, ventos e tempestades resultam em bioperturbação devido à ressuspensão dos sedimentos (CAROLI *et al.*, 2001b). Isso pode afetar organismos que vivem em proximidade e entram em contato com o contaminante. Estudos prévios revelaram a contaminação dos sedimentos localizados em torno de muitas estações de pesquisa Antártica, muitas vezes resultando em elevadas cargas de contaminação em sedimentos marinhos (CAROLI *et al.*, 2001a; CAROLI *et al.*, 2001b; DUQUESNE *et al.*, 2000b; HILL *et al.*, 2009b).

Apesar das moléculas utilizadas atualmente representarem biomarcadores eficazes para uma gama de espécies, é provável que existam outros genes ou proteínas específicas de tecidos ou espécies que podem ser ferramentas eficazes no biomonitoramento molecular. Uma espécie relevante para a área de estudo também faz com que o estudo seja ecologicamente

relevante (WU & CHEN, 2005).

Investigações de toxicidade e bioacumulação de contaminantes nos organismos em condições de laboratório são os primeiros passos na avaliação da relevância dos produtos químicos tóxicos nos sistemas aquáticos. Neste estudo utilizamos uma abordagem proteômica, dentre elas, a eletroforese de proteínas bidimensional em gel (2-DE), para determinar proteínas que sofrem alteração decorrente da contaminação pelo metal cobre (Cu) em brânquias de lapas antárticas (*Nacella concinna*). A técnica utilizada pode ser mais sensível ou específica do que a faixa atualmente limitada de biomarcadores moleculares utilizados em outras espécies. Isso permite que as mudanças ambientais sutis possam ser detectadas em níveis baixos e fornece informações quantitativas sobre as respostas das proteínas individuais e das atividades biológicas decorrentes destas (NESATYY & SUTER, 2007). Essas abordagens já foram utilizadas anteriormente para detectar biomarcadores para avaliação de contaminantes no mexilhão *Mytilus edulis* (APRAIZ *et al.*, 2006), na ostra *Crassostrea virginica* (CRUZ-RODRIGUEZ & CHU, 2002) e no molusco *Chamaelea gallina* (RODRIGUEZ-ORTEGA *et al.*, 2003).

Nacella concinna é uma espécie com ampla distribuição geográfica e ecologicamente relevante na região costeira da Antártica (ABELE *et al.*, 1998; CLARK *et al.*, 2013a; MALANGA *et al.*, 2005; WEIHE & ABELE, 2008; WEIHE *et al.*). Os moluscos têm sido amplamente utilizados em biomonitoramento devido à sua facilidade em bioacumular contaminantes e sua capacidade de mostrar às relações de tempo e dose-dependente a exposição (GILLIKIN *et al.*, 2005).

Neste capítulo são apresentados os resultados da identificação de proteínas em brânquias de lapas Antárticas, *Nacella concinna*, que são expressas diferencialmente em organismos que foram expostos a duas concentrações de cobre (Cu) ($0,9 \mu\text{gL}^{-1}$ e $3,0 \mu\text{gL}^{-1}$) durante três tempos de exposição (12, 24 e 48 horas) sob condições controladas em laboratório. Os dados laboratoriais foram analisados em um esforço para identificar as

proteínas cujo volume foi alterado por influência do Cu e discriminar os mecanismos de ação das principais proteínas alteradas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Vide introdução geral da tese.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise do proteoma em tecido branquial de *N. concinna*, em resposta as várias concentrações de cobre gerou uma imagem fundida, ou mapa do proteoma, formado por 72 géis 2D (Figura 1) (N=6 para cada concentração e tempo e tratamento). Após uma revisão e edição cuidadosa do limite de *spot* sobre esta imagem fundida, detectamos 78 proteínas significativamente alteradas. Isto significa que 24,6% dos *spots* observados e analisados sofreram alterações em abundância em resposta aos diferentes tempos e concentrações dos tratamentos com o cobre (ANOVA de duas vias, $p < 0,02$).

Utilizando espectrometria de massa *tandem* para todos os *spots* com alteração em volume estatisticamente significante foram identificadas 47 proteínas (60,3%) e gerado a tabela S3 (material suplementar).

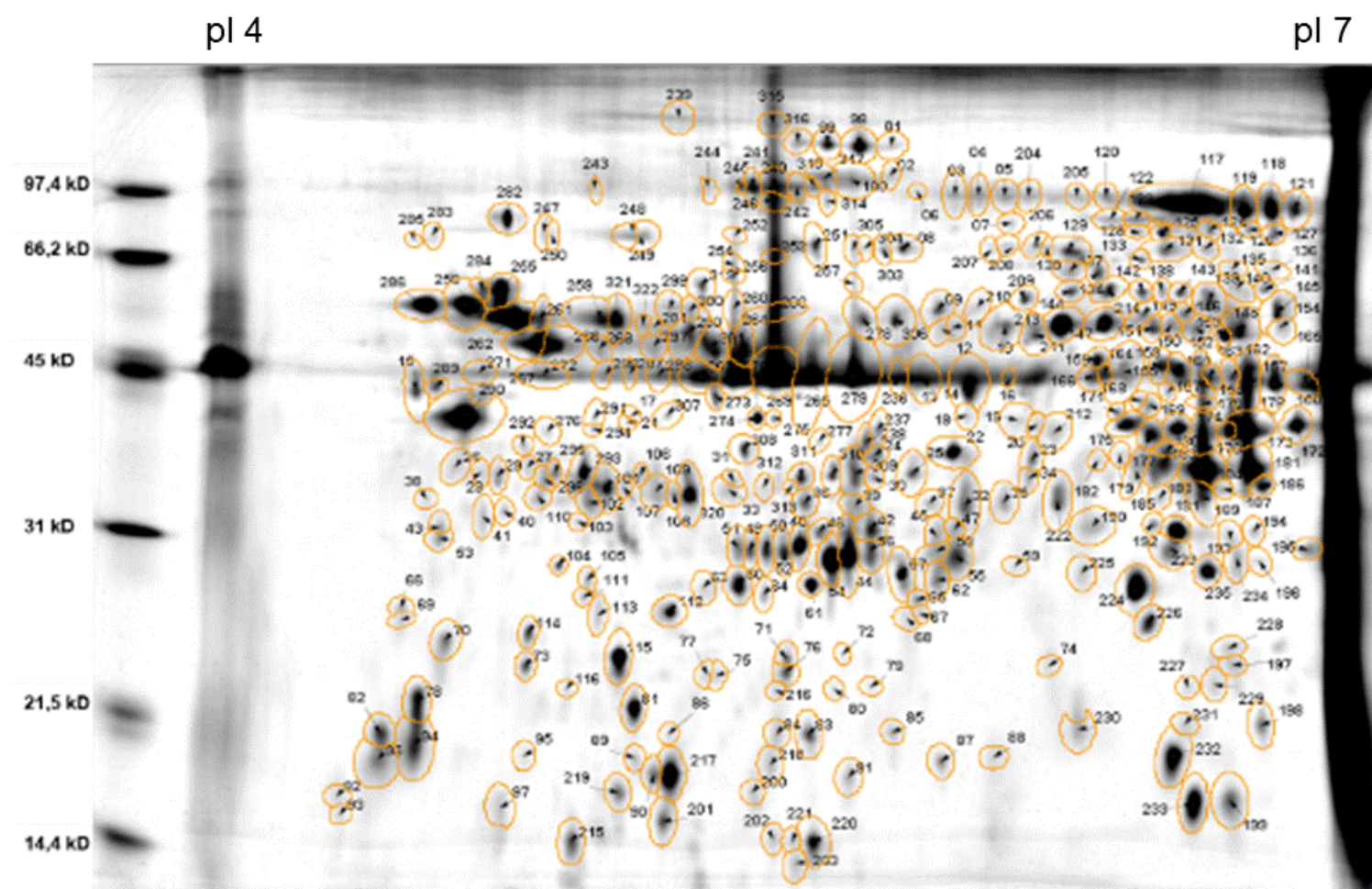


Figura 1: Imagem fusionada de géis (ou mapa do proteoma) representando os 325 spots individuais de proteínas detectadas em brânquias de *Nacella concinna* durante o experimento com cobre. O mapa do proteoma representa a média normalizada dos volumes em pixels para cada spot de proteína em todos os géis nas diferentes concentrações e tempos analisados. Os spots que apresentaram alterações em abundância em resposta aos tratamentos com cobre (two-way ANOVA, $p < 0,02$) foram identificados utilizando espectrometria de massa tandem.

Para facilitar a apresentação dos resultados, segue abaixo, inicialmente os resultados das análises de componentes principais e, em seguida, são discutidos os processos celulares associados com a função de proteínas específicas.

3.1. Análise de Componentes Principais (PCA)

A análise de componentes principais (PCA) foi utilizada para avaliar a contribuição dos dois fatores, tempo e concentração de cobre, ou a sua interação, originando a variação na abundância de proteínas (Figura 2). Entretanto, devido à inexistência de uma clara separação entre os grupos controle e experimentais, bem como uma predominância de proteínas do citoesqueleto que contribuem para as cargas mais elevadas, a análise foi simplificada, e conduzido um PCA para cada ponto de tempo em separado (Figuras 3, 4 e 5).

Ao longo do eixo x, com base nas mudanças na abundância de 78 proteínas, o PCA resultante separa o grupo controle dos expostos ao cobre (componente principal 1) em todos os três pontos de tempo (12, 24, 48h).

PC1 dos três tempos de exposição apresenta 20-22% de variação, com a maior variação (22%) após o tempo de exposição de 24 horas. Observa-se que em 12h de exposição o grupo de menor concentração de cobre ($0,9 \mu\text{gL}^{-1}$) não sobrepõe o grupo controle, porém está próximo deste. Nos dois tempos subsequentes (24 e 48h), para cada tempo, temos a separação entre as seções positivas e negativas do eixo x. Esta se dá completamente no tempo de 24 h e parcialmente no tempo de 48 h no grupo de concentração $3,0 \mu\text{gL}^{-1}$ o que sugere que o efeito do cobre aumentou com a concentração utilizada ao longo do tempo.

Para cada tempo, PC2 observamos a separação dos grupos referentes ao tratamento $3,0 \mu\text{gL}^{-1}$ dos grupos $0,9 \mu\text{gL}^{-1}$ e controle entre as seções positivas e negativas do eixo y, respectivamente. A exceção é observada no tempo de 48 h. Os grupos de concentração $3,0 \mu\text{gL}^{-1}$ e $0,9 \mu\text{gL}^{-1}$ se sobrepõem parcialmente, apesar da maioria das cargas referentes a concentração de $0,9 \mu\text{gL}^{-1}$ se concentrarem no lado positivo do eixo y, mesmo lado do grupo controle. Estes resultados sugerem que os efeitos de níveis de cobre elevados

começam a manifestar-se tanto inicialmente quanto em 48 h de exposição e aumentam ainda mais com a concentração.

As cargas de um componente principal 1 e 2 são altamente positivas ou negativas (Tabela 1). Muitas vezes, coincidindo com a maior abundância de proteínas nos tratamentos que estão dentro da seção positiva ou negativa do eixo x ou y, respectivamente. Estas tendências estatisticamente não tem que ser significativas, quando aplicado testes de comparações de pares dos níveis de abundância com base na análise *post-hoc* de Tukey (ver abaixo), que será utilizada posteriormente para descrever as alterações celulares em resposta ao cobre. As cargas fornecem uma primeira avaliação exploratória das possíveis mudanças que acompanham a separação dos grupos de tratamento.

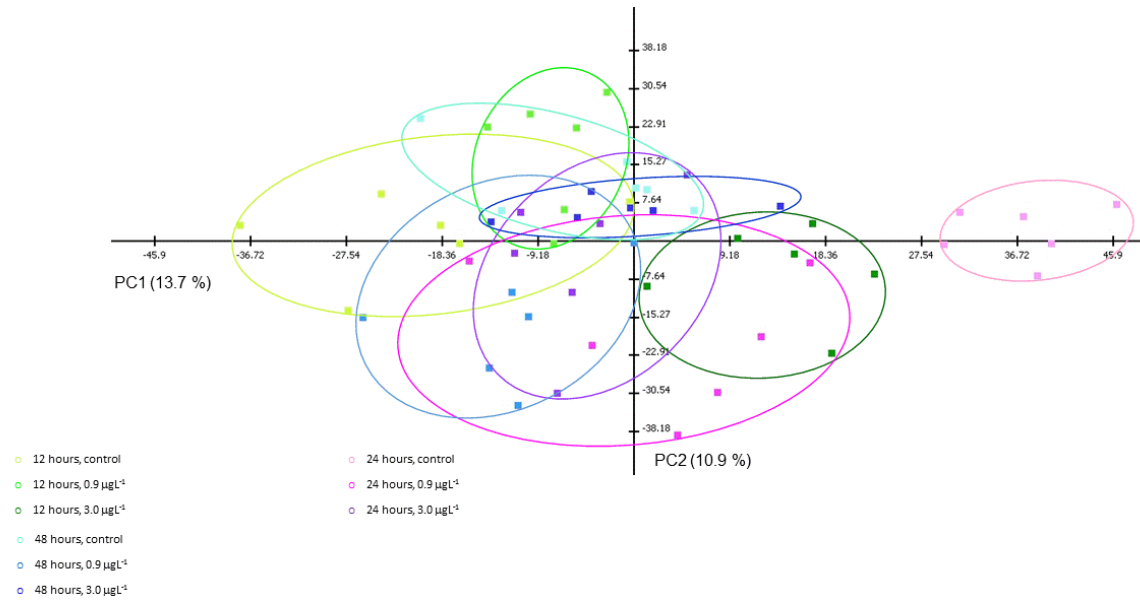


Figura 2: Análise de componentes principais (PCA) com base nas proteínas que foram identificadas e mostraram variação significativa (ANOVA; $P \leq 0.02$). Cada cor representa um grupo de *Nacella concinna* em um determinado tempo e concentração de cobre - controle 12 horas (verde claro), 12 horas de 0,9 μgL^{-1} (verde), 12 horas de 3,0 μgL^{-1} (verde escuro), 24 horas controle (rosa claro), 24 horas de 0,9 μgL^{-1} (rosa), 24 horas de 3,0 μgL^{-1} (roxo), 48 horas controle (azul claro), 48 horas de 0,9 μgL^{-1} (azul) e 48 horas de 3,0 μgL^{-1} (azul escuro). Componentes principais, 1 e 2, e o percentual que explica a variação total do conjunto de dados selecionados (proteína significativa) são mostrados.

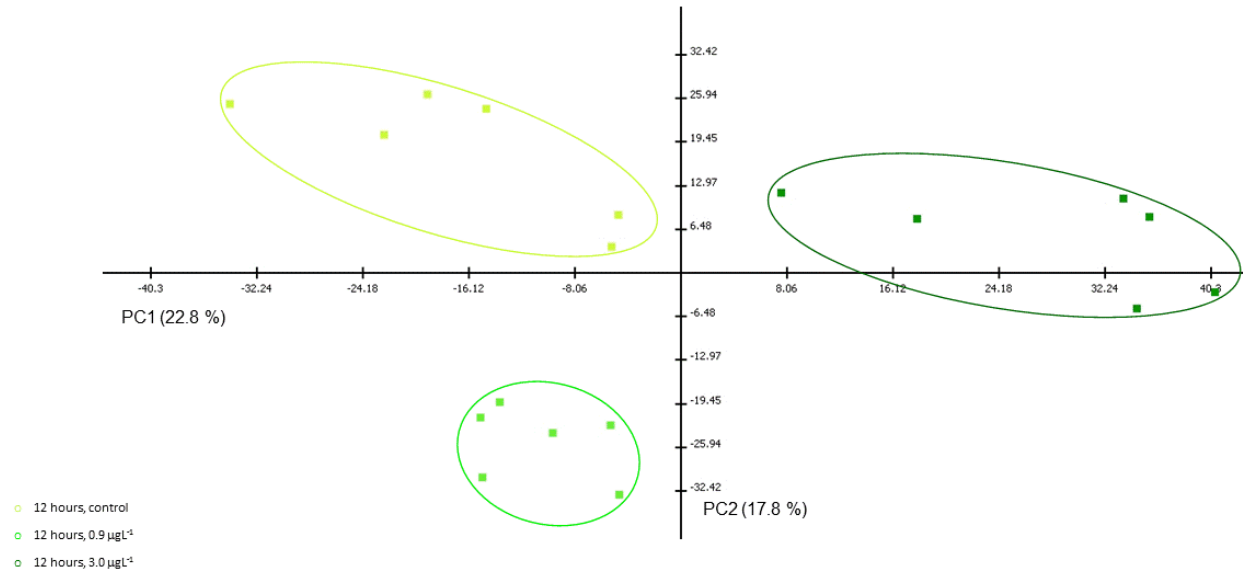


Figura 3: Análise de componentes principais (PCA) com base nas proteínas que foram identificadas e mostraram variação significativa (ANOVA; $P \leq 0.02$). Cada cor representa um grupo de *Nacella concinna* em um determinado tempo e uma determinada concentração de cobre - controle 12 horas (verde claro), 12 horas de 0,9 µgL⁻¹ (verde), 12 horas de 3,0 µgL⁻¹ (verde escuro). Componentes principais, 1 e 2, e o percentual que explica a variação total do conjunto de dados selecionados (proteína significativa) são mostrados.

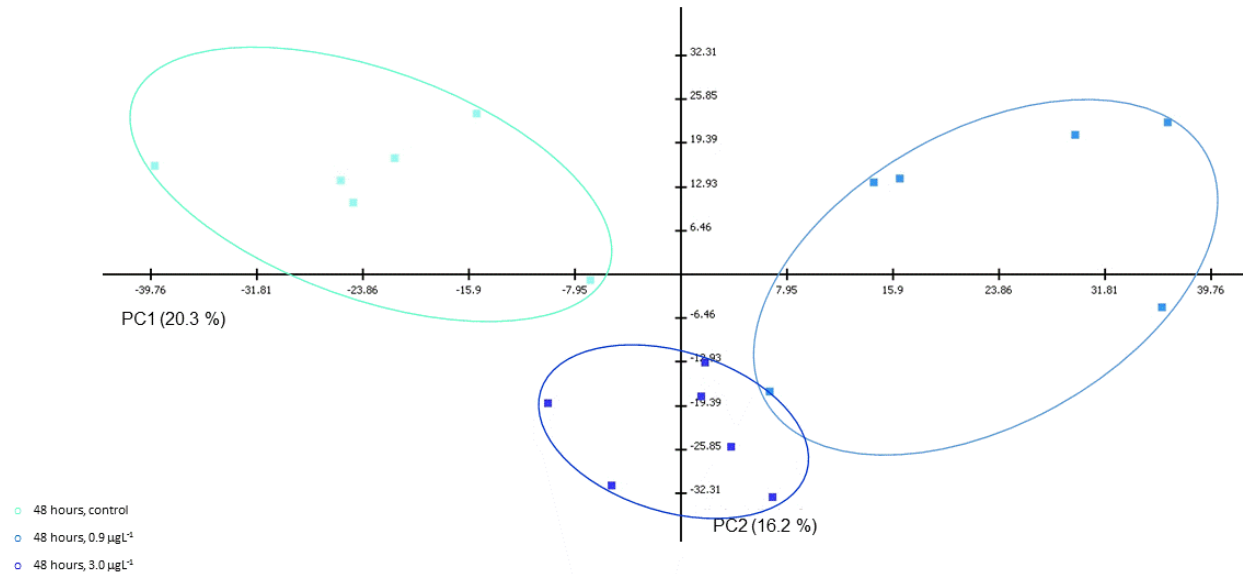


Figura 5: Análise de componentes principais (PCA) com base nas proteínas que foram identificadas e mostraram variação significativa (ANOVA; $P \leq 0.02$). Cada cor representa um grupo de *Nacella concinna* em um determinado tempo e uma determinada concentração de cobre - 48 horas controle (azul claro), 48 horas de $0,9 \mu\text{gL}^{-1}$ (azul) e 48 horas de $3,0 \mu\text{gL}^{-1}$ (azul escuro). Componentes principais, 1 e 2, e o percentual que explica a variação total do conjunto de dados selecionados (proteína significativa) são mostrados.

3.2. Proteínas alteradas

Analisando os resultados obtidos foi verificado um número elevado de proteínas alteradas, especialmente as relacionadas ao citoesqueleto. Diante disto, optamos por selecionar as 10 proteínas com alteração estatisticamente significativa que tiveram maior influência, positiva e negativa nas cargas dos componentes principais e que separam, assim, os grupos experimentais nos PCA's. A tabela 1 contém as identidades destas proteínas.

Visando indicar o efeito global da concentração de cobre utilizada, do tempo de exposição e da interação (tempo e concentração) das proteínas que estão listadas dentro dos mapas de calor foi comparado cada proteína que apresentou mudança significativa em abundância, gerando gráficos de perfis de expressão protéica (teste *post-hoc* de comparação aos pares Tukey com base em um modelo linear geral; $P \leq 0,05$) (Figura 10). A análise estatística principal descrita anteriormente (comparação dos *spots* dos géis 2D entre todos os tratamentos experimentais) leva em consideração a significância de todos os volumes de proteínas de todos os tratamentos. A significância da análise estatística principal não indica que pelo menos uma comparação de pares (teste *post-hoc*) é significativa.

É importante considerar que a abundância de proteínas pode ser alterada devido à síntese, modificações pós-traducionais (PTMs) ou degradação. Assim, quando nos referimos a alterações na abundância de *spots* de proteínas, apenas um ou uma combinação destes processos pode ser responsável.

Além disso, mesmo que uma série de isoformas de uma proteína possa ter sido separada, é possível que outras isomorfias não foram detectadas, pois estão fora do intervalo de pH ou da massa analisados. Assim, a soma geral destas isoformas não precisa representar a abundância total da proteína.

Tabela 1: Cargas positivas e negativas para o componente principal 1 e 2 de proteínas significantes para todos os tempos de exposição ao cobre (compare com a Figura 2).

Componente Ranque da Carga	Componente Principal 1		Componente Principal 2	
	Proteína (<i>Spot</i> ID)	Valor Carga	Proteína (<i>Spot</i> ID)	Valor Carga
Cargas Positivas para todos os tempos				
1	(a) Actina (55)	1,6234	(c) Miosina cadeia regulatória leve (94)	1,8864
2	Paramiosina (58)	1,3028	ATP sintase β Mitochondrial (282)	1,8282
3	Actina (51)	1,2022	HSP 60 (254)	1,7375
4	HSP 70 (241)	1,1868	Piruvato desidrogenase E1 (310)	1,3726
5	Piruvato desidrogenase E1 (188)	1,0743	Arginina quinase (128)	1,3006
6	Proteasoma subunidade alpha tipo-5 (43)	1,0480	Miosina cadeia regulatória leve (78)	1,2511
7	Triose fosfato isomerase (235)	0,9935	Anidrase carbônica 2 (177)	1,1982
8	Miosina cadeia regulatória leve (78)	0,9287	Actina (55)	1,1850
9	Miosina cadeia regulatória leve (94)	0,7539	Actina (45)	1,1146
10	Dihidrolipoil desidrogenase (141)	0,6739	Triose fosfato isomerase (235)	0,8909
Cargas Negativas para todos os tempos				
1	(b) Actina (290)	-2,0265	(d) Miosina cadeia regulatória leve (82)	-1,8421
2	Actina (103)	-1,9965	Actina (102)	-1,7454
3	Actina (264)	-1,8104	Miosina cadeia catalítica leve (66)	-1,7370
4	Actina (270)	-1,8018	Actina (272)	-1,5347
5	Anidrase carbônica 2 (184)	-1,7304	Anidrase carbônica 2 (233)	-1,4209
6	Actina (317)	-1,6641	Cdc42 (73)	-1,3316
7	Anidrase carbônica 2 (177)	-1,6005	Proteasoma subunidade alpha tipo-5 (43)	-1,1767
8	Anidrase carbônica 2 (223)	-1,4778	Factor de iniciação de tradução eucariótico 3 (23)	-1,0078
9	Piruvato desidrogenase E1 (310)	-1,4594	Anidrase carbônica 2 (223)	-0,9355
10	Actina (53)	-1,9965	Tropomiosina (29)	-0,8899

3.3. Proteínas de choque térmico *spots* (#241) e (#254)

Nos nossos resultados dois *spots* com carga positiva, um para o componente 1 (#241) e outro para o componente 2 (#254), foram identificados como proteínas de choque térmico (HSP) (Tabela 1). A alteração observada está de acordo com outros dados previamente informados na literatura envolvendo HSP alterando sua expressão induzida por metais (BOUTET *et al.*, 2003a; CRUZ-RODRIGUEZ & CHU, 2002; DAHLHOFF, 2004; FEDER & HOFMANN, 1999; LUO *et al.*, 2014). As proteínas HSP são proteínas associadas ao funcionamento normal da célula atuando como chaperonas permitindo o enrolamento normal (“folding”) das proteínas (FINK, 1999). As HSP formam um sistema altamente conservado em todos os grupos de seres vivos, sendo comum entre procariontos, plantas e animais (LINDQUIST & CRAIG, 1988).

A alteração observada em HSP70 (#241) indica que o tempo de exposição de 12h, em ambas as concentrações de cobre teve pouca influência na alteração desta proteína (Figura 10). Na sequência, o tempo de 24 h demonstra ser crucial para este *spot*, com resposta de aumento de abundância de HSP70 para ambas as concentrações e maior abundância da proteína na maior concentração de cobre (Figura 6). No tempo de 48 h observa-se um aparente retorno da abundância de HSP70 para ambas as concentrações de cobre em valores inferiores ao do grupo controle.

Após a exposição de *N. concinna* ao cobre a alteração observada na HSP60 (#254) demonstra ser uma resposta em curto prazo, com forte alteração de abundância no tempo de 12 h para ambas as concentrações (Figura 10). Novamente há uma resposta de aumento de abundância da proteína para ambas as concentrações de cobre e maior abundância da proteína na maior concentração. No tempo de 24 h somente a concentração de $3,0 \mu\text{gL}^{-1}$ de cobre ainda induz aumento na abundância deste *spot*. No tempo de 48 h a abundância nos grupos experimentais é inferior à observada nos grupos controles (Figura 6).

As HSP são conhecidas como proteínas de estresse, pois a sua expressão está associada a diversos eventos celulares, dentre eles, a temperatura (função pela qual foram nomeadas HSP), estresse oxidativo, metais, campos magnéticos e

etanol, sendo que todos estes fatores causam danos na estrutura terciária das proteínas. A sua função durante eventos de estresse é evitar o enrolamento incorreto de proteínas e, caso já tenha ocorrido, corrigi-lo ou direcionar a eliminação de proteínas que tenham perdido a sua função (DE POMERAI, 1996; GOERING, 1995; PARSELL & LINDQUIST, 1993; SANDERS, 1993).

As HSP pertencem à grande família das proteínas de estresse, incluindo membros induzíveis e constitutivamente expressos (MCCARTHY & SHUGART, 1990; SANDERS *et al.*, 1991). A classificação das HSP é feita de acordo com o seu peso molecular aparente, e a HSP 90 (83-90kDa), HSP 70 (66-78kDa) e HSP 60 (58-60kDa) são as representantes mais conhecidas (NOVER, 1991; SANDERS, 1993), sendo as duas últimas, normalmente, associadas à resposta a estresse causado por metais. Quando em estresse as células aumentam a produção destas proteínas acumulando-as nos agregados de proteínas com o objetivo de promover o correto enrolamento, corrigir ou eliminar os enrolamentos mal efetuados (DASTOOR & DREYER, 2000).

Estudos indicam que a exposição ao cobre pode estimular o aumento de HSP em tempos determinados, levando-se em consideração a função destas proteínas em condições fisiológicas normais, atuando como chaperonas moleculares que mediam o transporte e o dobramento correto de polipeptídeos (ELLIS & VAN DER VIES, 1991), conforme observamos em nosso experimento. A ação das HSP70 (#241) e HSP60 (#254) é uma resposta em curto prazo, isto é, 24 h e 12 h, respectivamente.

Membros da família HSP60 são as principais proteínas induzidas em anfípodos após exposição a xenobióticos (WERNER & NAGEL, 1997). Aumento no nível do HSP 60 após exposição ao cobre foi detectado em mexilhão (CLAYTON *et al.*, 2000; SANDERS & DYER, 1994) e em nematelmintes *Plectus acuminatus* (KAMMENGA *et al.*, 1998). Elevados níveis de cobre impedem a síntese de proteínas de estresse em resposta ao aumento de temperatura em embriões de ouriço do mar e podem inibir a síntese de proteínas reguladoras (SANDERS & DYER, 1994). Indução de HSP 60, por exposição crônica ao cobre em baixas concentrações, leva ao aumento da resistência a uma variedade de poluentes em exposições subsequentes (WHEELLOCK *et al.*, 1999).

3.4. Fator de iniciação da tradução *spot* (#23)

O fator de iniciação da tradução (#23) em *N. concinna* parece ser mais afetado por exposição à concentração mais elevada, isto é $3,0\mu\text{gL}^{-1}$ (Figura 10). Em 12 h ocorreu diminuição do nível de expressão deste fator, e logo após, em 24 h observa-se uma estabilidade. Além disso, com o aumento da concentração há um aumento na expressão do fator de iniciação da tradução (#23) na maior concentração e em 48 h em comparação com o grupo controle (Figura 6).

O envolvimento detalhado do fator de iniciação de tradução na resposta ao estresse pode ser muito complexo, especialmente considerando o seu papel fundamental na síntese de proteínas. Este fator é um dos mecanismos adicionais, que é ativado antes do início da síntese de proteínas funcionando como um ponto de verificação de qualidade em condições ambientalmente desafiadoras. Isso significa que a regulação do fator de iniciação da tradução determina o grau da síntese de proteínas (SHEIKH & FORNACE, 1999). Em plantas, já foi revelado que a tolerância ao estresse ocorre pelo aumento da síntese de proteínas através de níveis elevados do fator de iniciação da tradução (WANG *et al.*, 2012). O teor de proteínas totais do mexilhão verde *P. viridis*, no entanto, diminuiu após a exposição crônica ao cobre (HARIHARAN *et al.*, 2014).

3.5. Proteossoma subunidade α type-5 *spot* (#43)

Tóxicos causam alterações nas organelas celulares, podendo induzir aumento ou inibição da atividade de diferentes enzimas antioxidantes (SABATINI *et al.*, 2009). A indução de enzimas de defesa antioxidante pode desencadear processos relacionados às condições de estresse oxidativo, já que tais enzimas executam funções importantes na manutenção da homeostase celular (BORKOVIĆ *et al.*, 2008). Entre essas reações, a carbonilação de proteínas tem atraído grande atenção devido à sua natureza irreversível e irreparável. Proteínas carboniladas são marcadas para a proteólise pelo proteossoma, mas podem escapar da degradação e formar agregados de alto peso molecular, que se acumulam ao longo do tempo (NANDI *et al.*, 2006).

Quando observamos as variações do volume do *spot* (#43) proteossoma subunidade α *type-5* (Figura 10) percebemos que os tempos iniciais de exposição ao cobre não tiveram maiores influências sobre a proteína do proteossoma. Porém, no tempo de 48 h o volume sofre um aumento drástico (Figura 6). Esta dinâmica pode indicar um acúmulo de carbonilação de proteínas devido à redução do sistema de defesa antioxidante, ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), a redução da capacidade de remoção de proteínas oxidadas ou aumento da suscetibilidade de proteínas para o ataque oxidativo. As enzimas clássicas envolvidas na destoxicação de ROS como a superóxido dismutase, catalases e peroxidases são também os principais membros da defesa celular contra a carbonilação de proteínas (NYSTRÖM, 2005). Em células eucariontes, proteínas mutadas, danificadas ou com defeitos no seu enovelamento são normalmente degradadas pelo sistema de degradação ubiquitina-proteassoma (UPS). Uma produção excessiva dessas proteínas pode exceder a capacidade do UPS de degradá-las, resultando assim no seu acúmulo e agregação, gerando estresse proteolítico (OLANOW, 2007).

Outra forma de evitar o acúmulo de proteínas modificadas ocorre através das proteínas chaperonas que atuam no desenovelamento de proteínas com configuração incorreta (DAUER & PRZEDBORSKI, 2003). Proteínas agregadas podem causar danos celulares diretos pela alteração morfológica ou pela interferência no tráfego intracelular ou ainda podem sequestrar proteínas importantes para a sobrevivência celular (DAUER & PRZEDBORSKI, 2003; OLANOW, 2007).

3.6. Anidrase carbônica *spots* (#184), (#177) e (#223)

A anidrase carbônica (CA) é uma enzima envolvida em diversas funções como o transporte iônico, a regulação ácido-base e a osmorregulação (BÖTTCHER *et al.*, 1991; COSTLOW, 1959; HENRY, 1988; HENRY & KORMANIK, 1985; VITALE *et al.*, 1999). Para o componente 1 a anidrase carbônica contribuiu fortemente para a carga negativa apresentada e está presente duas vezes, no *spot* (#177) e no *spot* (#223). Fato que pode ser relacionado com a forte influência do cobre na alteração do volume dos *spots* desta proteína.

Na figura 10 no *spot* (#177) quando observamos os três tempos de exposição, em todas as concentrações, houve diminuição do volume destes *spots*. O menor volume foi observado na concentração de $3,0 \mu\text{gL}^{-1}$ de cobre. A única exceção é a concentração de $0,9 \mu\text{gL}^{-1}$, que apresenta menor volume no tempo de 12 h. Já em #223 em todos os tempos de exposição observamos o mesmo padrão, isto é, há um aumento do volume dos *spots* em todas as concentrações de cobre. Na concentração de cobre de $0,9 \mu\text{gL}^{-1}$ a anidrase carbônica apresenta maior volume. Este comportamento antagônico da anidrase carbônica pode estar relacionado com isoformas diferentes, o que levaria as diferenças de peso molecular. Metais podem ter uma ação inibitória na anidrase carbônica em espécies de vertebrados e invertebrados (ROBERTO *et al.*, 2010). Em animais, a anidrase carbônica é encontrada em diversos tecidos e a sua atividade pode variar em função de diferentes isoenzimas e devido a diferenças entre isoformas, resultado de diferentes afinidades de ligação ao metal (LIONETTO *et al.*, 2012).

Para o componente 2 a anidrase carbônica (#184) contribuiu fortemente para a carga negativa apresentada. Houve aumento do volume deste *spot* nos três tempos de exposição (Figura 7) sendo exceção a concentração de $0,9 \mu\text{gL}^{-1}$, que apresenta menor volume no tempo de 48 h. Novamente o *spot* #223, descrito anteriormente apresenta alteração contribuindo negativamente para este componente (Figura 7). Uma possível explicação para as alterações observadas nos *spots* identificados como anidrase carbônica é que o cobre e outros metais atuam como cofatores (VITALE *et al.*, 1999) participando de um mecanismo que atua através da catalisação da hidratação reversível de CO_2 (SKAGGS & HENRY,

2002a). A presença universal da anidrase carbônica no tecido branquial de espécies estudadas até o presente confere a esta enzima um papel crítico nas funções osmorregulatórias das brânquias de invertebrados aquáticos (SKAGGS & HENRY, 2002).

A presença da anidrase carbônica é descrita como alta nas brânquias de invertebrados, mas tal condição é também verificada em outros tecidos, como músculo, coração, gônadas masculinas, hipoderme e glândula digestiva, e até mesmo na hemolinfa. Porém, neste fluido a sua atividade é bem menor e em determinados casos é quase inexistente (VITALE *et al.*, 1999) fato que, não se relaciona com o tecido branquial de *N.concinna*. Esta proteína é, provavelmente, importante sob condições de extrema demanda junto ao transporte de gases, já que possui participação nos mecanismos de liberação de oxigênio nos tecidos, bem como no transporte de gás carbônico, incluindo nas lapas (SCHMIDT-NIELSEN, 1997; WELLS & WONG, 1978). Dezenas de cuproenzimas são conhecidas e a alteração de sua atividade pode ser crítica para alguns organismos. Existe uma grande variedade de proteínas transportadoras de íons específicos e dentre estas, duas enzimas exercem função central na osmorregulação, a Na⁺/K⁺-ATPase e a anidrase carbônica. Alterações como as observadas em nossos experimentos, podem levar a mudanças de gradientes de concentração de sódio e potássio existentes através das membranas celulares que são mantidos pela atividade de uma bomba que requer energia para transportar sódio para fora da célula em troca do potássio. Portanto, a homeostase do cobre é necessária devido a sua participação em uma grande variedade de proteínas de transporte de íons que exercem papel central na osmorregulação (SKAGGS & HENRY, 2002a; TSAI & LIN, 2007).

3.7. Piruvato desidrogenase E1 *spots* (#310) e (#188)

A piruvato desidrogenase (PDH) é um complexo multienzimático mitocondrial que desempenha um papel fundamental no metabolismo aeróbico. É o ponto de entrada dos hidratos de carbono no ciclo do ácido tricarboxílico. A PDH catalisa a descarboxilação oxidativa do produto final da glicólise, o piruvato, para formar acetil-CoA ao reduzir NAD⁺ a NADH. Qualquer interrupção da ação desta enzima compromete a capacidade da célula para atender sua demanda energética e, portanto, pode resultar em danos e morte celular (TABATABAIE *et al.*, 1996). No componente 1 o volume do *spot* (#188) (Figura 10) contribuiu como uma dentre as 10 cargas positivas aumentadas. O tempo de exposição ao cobre que teve influência no volume deste *spot* foi o de 12 h, ou seja, uma resposta a curto prazo. A nossa hipótese para esta alteração vai de encontro com estudos recentes que indicam que a exposição a metais tóxicos pode diminuir o escopo aeróbico de invertebrados aquáticos e perturbar as funções metabólicas e equilíbrio energético nesses organismos (SOKOLOVA & LANNIG, 2008). Exposições ao metal pode resultar em elevação da demanda metabólica basal devido aos custos de regulação positiva de mecanismos protetores celulares, tais como metalotioneínas, glutathione, e outros antioxidantes, chaperonas em vias de reparo celular (SOKOLOVA *et al.*, 2012).

Já o *spot* (#310) a PDH, aparece duas vezes, contribuindo com carga negativa para o componente 1 e com carga positiva para o componente 2 (tabela 1). Houve diminuição no volume deste *spot* em relação aos controles, exceto em 24 h na concentração de 0,9 µg L⁻¹. Um levantamento proteômico de proteínas nativas mitocondriais sugeriu que a piruvato desidrogenase quinase-2 (PDHK2) tem, pelo menos, um tiol que é modificado por baixos níveis de H₂O₂, sendo este um dos mecanismos da sinalização redox. A produção de ROS na cadeia respiratória é importante na sinalização redox e indica como estas espécies reativas podem interagir com as proteínas para alterar a sua função. As proteínas mitocondriais mais sensíveis à produção de ROS endógena foram agrupadas em β oxidação e na regulação da PDH (HURD *et al.*, 2007). Este agrupamento de proteínas modificadas na β oxidação e a PDHK2 podem sugerir que a geração de ROS endógenas mitocondriais pode modular vários locais do metabolismo de hidratos de carbono e a

oxidação dos ácidos graxos controlando a entrada do piruvato no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) (HURD *et al.*, 2012). Outra hipótese que explica esta diminuição pode estar caracterizada em estudos prévios onde a hipóxia induzida leva a piruvato desidrogenase quinase 1 (PDK1) a suprimir ativamente o metabolismo através do TCA diretamente por trans-ativação do gene que codifica a PDK1. A PDK1 inativa a enzima ciclo do TCA, a PDH, que converte o piruvato em acetil-CoA. A expressão forçada de PDK1 em células HIF-1 α nulas submetidas à hipóxia aumenta os níveis de ATP e atenua a hipóxia e a produção de ROS induzida (KIM *et al.*, 2006). A PDK1 é crítica para a atenuação de produção de ROS mitocondrial, manutenção dos níveis de ATP e a adaptação à hipóxia (KIM *et al.*, 2006). Análises exploratórias são necessárias para relacionar as alterações observadas em nossas amostras com outras proteínas de metabolismo energético ou regulatórias presentes.

3.8. Arginina quinase *spot* (#128)

Para o PCA2, a arginina quinase (AK), *spot* #128 influenciou positivamente com sua carga. No tempo de 24 h verificamos aumento significativo de volume de proteínas para este tempo de exposição (Figura 10). Inicialmente, nossa hipótese era de que, devido ao estresse causado pelo cobre, *N.concinna* deixaria de utilizar a via glicolítica (o piruvato) ativando a via metabólica que inclui β oxidação. No entanto, quando foram gerados os perfis de expressão para a AK e analisando as publicações existentes sobre a importância desta proteína no metabolismo energético de moluscos reconsideramos alguns dos nossos pensamentos. A AK e a fosfoarginina em invertebrados são considerados análogos ao fosfato e a creatina quinase em vertebrados desempenhando funções semelhantes, através do fornecimento de ATP adicional durante os períodos de alta demanda de energia e a relação entre a produção de energia e a sua utilização (COYNE, 2011; JIN *et al.*, 2014).

Em invertebrados a AK desempenha uma função central tanto temporal quanto espacial no tamponamento de ATP em células com exigências elevadas de energia, catalisando a fosforilação reversível dependente de magnésio entre a L-arginina e o ATP (JIN *et al.*, 2014). A AK está diretamente associada à contração muscular, regeneração de ATP e transporte de energia no metabolismo energético celular de invertebrados. Um estudo sobre inibição cinética do desdobramento

estrutural durante a desnaturação do dodecil sulfato de sódio (SDS) revelou que a AK foi quase completamente inativada pelo SDS 1,0 mM (SI *et al.*, 2014). A análise cinética demonstrou que a inativação foi uma reação de primeira ordem, com os processos cinéticos mudando de uma monofase para uma bifase, à medida que as concentrações de SDS aumentavam. Os sistemas fosfato quinase fornecem diferentes vantagens para os tecidos com alta demanda e flutuações de energia, em particular atuam como um sistema de tamponamento eficiente de ATP. Aparentemente, nossos dados indicam que o fluxo de energia no tecido branquial de células de *N. concinna* se mantém relativamente estável, o que inclui a atividade da isocitrato desidrogenase e da malato desidrogenase (redução de NAD⁺ para NADH e sua estabilidade ou vice-versa). A via glicolítica, principalmente entre 12 h e 24 h de exposição ao cobre sofre uma entrada auxiliar de energia. Esta pode incluir a participação massiva de aminoácidos como importantes fontes de energia aeróbica (SHI *et al.*, 2012).

3.9. Dihidrolipoil desidrogenase *spot* (#141)

As enzimas componentes do complexo piruvato desidrogenase são: piruvato desidrogenase, dihidrolipoil transacetilase e dihidrolipoil desidrogenase. Para o componente 1, a DLD contribuiu para a carga positiva apresentada. O volume do *spot* (#141) reduziu nos três tempos de exposição, com exceção de 24 h na concentração de 3,0 µgL⁻¹ (Figura 7). Não encontramos trabalhos científicos com dados relacionados a moluscos. Para interpretar este dado consideramos os experimentos utilizando mitocôndrias do cérebro de camundongos *knock-out* heterozigotos deficientes em DLD. Este trabalho relata que a DLD contém piruvato desidrogenase (PDHC) e cetogluturato desidrogenase (KGDHC), e uma deficiência na atividade da DLD afeta principalmente a KGDHC mitocondrial (STARKOV *et al.*, 2004). O trabalho utilizando tecidos de mamíferos demonstrou que a matriz solúvel dihidrolipoil contendo desidrogenases (piruvato e, principalmente, α-cetogluturato desidrogenase) pode também gerar ROS, de certa maneira estimulado pela baixa disponibilidade de NAD⁺ (TRETTER & ADAM-VIZI, 2004). Ainda nos mamíferos, o succinato leva à formação de grandes quantidades de ROS na maioria dos tecidos, uma vez que pode ceder elétrons para a coenzima Q no Complexo III e por

transporte reverso de elétrons, ao Complexo I, onde ocorre a formação de superóxido (TURRENS, 2003).

Já em estudos com fungos, o vazamento de elétrons promovido pela Succinato desidrogenase na cadeia respiratória foi substancial, mas ainda um pouco menor do que o observado com a α -cetoglutarato. Estes resultados confirmam que, embora a cadeia de transporte de elétrons gere ROS, as ROS geradas pela dihidrolipoil desidrogenase contendo enzimas α -cetoglutarato e piruvato desidrogenase foram a principal fonte de ROS no tipo selvagem de *Saccharomyces cerevisiae* (TAHARA *et al.*, 2007).

A dihidrolipoil desidrogenase contendo as enzimas piruvato desidrogenase e α -cetoglutarato é, portanto, uma fonte muito importantes de produção de ROS mitocondrial. A formação de ROS por estas enzimas é fortemente controlada pelos níveis de NADH / NAD⁺ e, assim, diminuem as taxas respiratórias mais altas quando presentes (LIN *et al.*, 2004). A ausência de NAD⁺ mantém a lipoamida desidrogenase no estado reduzido, porque o meio celular é redutor. Consequentemente, há uma maior probabilidade de reações da lipoamida desidrogenase com o oxigênio, gerando ROS (IMLAY, 2003; TAHARA *et al.*, 2007).

3.10. Triose Fosfato Isomerase *spot* (#235)

A triose fosfato isomerase (TPI) é uma proteína, pertencente à classe das isomerases e subclasse das oxidoredutases intramoleculares (KNOWLES, 1991). Apesar de a TPI ter contribuído com cargas positivas, tanto no componente 1 quanto no componente 2 (Tabela 1) a dinâmica apresentada por este *spot* ao logo do experimento não é muito clara (Figura 10) o que dificulta a nossa interpretação de como especificamente esta proteína está envolvida nos diferentes tempos de exposição durante o processo. Dados relacionados a esta proteína quando estudada em moluscos também são escassos. De maneira geral a TPI apresenta-se em sua forma ativa como homodímero, sendo responsável pela conversão reversível de diidroxiacetona fosfato em gliceraldeído 3-fosfato. Esta reação está relacionada com importantes vias metabólicas, como a glicólise, gliconeogênese e síntese de ácidos graxos, responsáveis principalmente pela produção de energia (KNOWLES, 1991; MEYERHOF & BECK, 1944).

3.11. ATP sintase mitocondrial β *spot* (#282)

A ATP sintase é um grande complexo protéico localizado na membrana mitocondrial interna. Este complexo é o principal fornecedor de ATP na maioria das células, sintetizando-o na fase final da fosforilação oxidativa.

A carga deste *spot*, #282, influenciou positivamente o componente 2 (Tabela 1). Em 12 h de experimento houve um aumento deste *spot* em ambas concentrações (Figura 10). Nos tempos seguintes, tanto em 24 h quanto em 48 h de exposição ao cobre ocorreu uma diminuição do volume (Figura 7).

O complexo protéico da ATP sintase é composto por 16 diferentes subunidades, sendo: α , β , γ , δ , ϵ , fazendo parte do componente F1, fração periférica que sintetiza o ATP e, a, b, c, d, e, f, g compondo a fração Fo, fração imersa na membrana que realiza a translocação de prótons (BRANCA, 2004; CHANG *et al*, 2007; SÁNCHEZ-CENIZO, 2010). Na presença de um gradiente de prótons, o complexo F1Fo sintetiza ATP (F1Fo ATP sintase). Entretanto, se não existe potencial de membrana ou gradiente de prótons, a subunidade F1 é isolada de Fo e participa na hidrólise do ATP (F1 ATPase) (CHANG *et al*, 2007). Existem diversos compostos capazes de inibir o fluxo de elétrons em vários pontos da cadeia transportadora de elétrons, e em qualquer ponto que ocorra, o resultado será uma diminuição na função da bomba de prótons e conseqüentemente, inibição da FoF1-ATPase (BOELSTERLI, 2007). Observamos esta diminuição do volume deste *spot* em nossos resultados em 24 h e 48 h que pode ser relacionada com esta condição. Além de inibir as vias metabólicas dependentes da cadeia respiratória para a reoxidação de coenzimas (MARZZOCO & TORRES, 2007), o que dependendo da intensidade pode ocasionar a morte celular.

3.12. Proteína Cdc42 *spot* (#73)

A proteína Cdc42 do *spot* #73 foi uma das 10 proteínas que mais influenciaram o comportamento de nossos componentes revelando uma dinâmica não muito clara de variação. Aparentemente, maiores concentrações de cobre em 12 h de exposição (curto prazo) têm grande influencia no aumento de volume desta proteína (Figura 10). Nos tempos subsequentes de 24 h e 48 h, há um aumento de

volume na concentração de $0,9 \mu\text{gL}^{-1}$, entretanto no tempo de 48 h na concentração de $3,0 \mu\text{gL}^{-1}$ voltamos a ter um volume da Cdc42 semelhante ao do grupo controle (Figura 8).

As alterações do *spot* #73 corroboram, e muito, com as alterações vistas nos componentes 1 e 2 no que diz respeito a proteínas pretencentes ao citoesqueleto, pois a Cdc42 faz parte da família Rho GTPase, proteínas descritas como reguladores da dinâmica da actina. A regulação do filamento de actina está diretamente relacionada à presença de proteínas, principalmente da família Rho GTPases, como a Cdc42, Rac1 e RhoA. Estas proteínas têm funções fundamentais em vários mecanismos essenciais para a sobrevivência da célula, como o recrutamento de actina G para a formação de filamentos de actina, reorganização dos filamentos para a formação de pseudópodes e interação celular, entre outras (COX *et al.*, 1997; HOPPE & SWANSON, 2004; LIU *et al.*, 2009).

A Rac1 e a Rho estimulam a formação de lamelipódios e de *stress fiber* (RIDLEY *et al.*, 1992), respectivamente. Já a Cdc42 promove a formação de filopódios de forma dependente de GTP (KOZMA *et al.*, 1995; LIU *et al.*, 2009). Estas três GTPases, quando ativadas, desencadeiam uma cascata de reações coordenadas (NOBES & HALL, 1995).

Experimentos feitos *in vivo* sugerem que a ativação de Cdc42 estimula a ativação de Rac1 e que, por sua vez, promove a ativação de Rho (KOZMA *et al.*, 1995; NOBES & HALL, 1995). Dentro desta cascata de ativação, os efeitos iniciais são a ativação de Cdc42 induzindo a formação de filopódios. Já os efeitos secundários e terciários incluem a mediação de Rac1 na dinâmica da membrana plasmática e a formação de *stress fiber* mediados por Rho. Essas proteínas, ao interagirem com IQGAP1, promovem a alteração da dinâmica do citoesqueleto de actina afetando algumas atividades celulares como a comunicação intercelular, migração e formação de flagelos, entre outras (CLARK *et al.*, 2002).

3.13. Demais proteínas relacionadas ao citoesqueleto

Se observarmos as proteínas de citoesqueleto, em especial as actinas, estas são proteínas altamente conservadas que participam em muitos processos biológicos importantes, tais como a contração muscular, mobilidade celular e a integridade das células (POLLARD & COOPER, 1986). As alterações observadas

são extremamente difusas e de difícil interpretação. A expressão alterada destas proteínas pode ser relacionada com a interrupção da execução de funções fisiológicas normais em brânquias no que se refere à respiração e ao equilíbrio hídrico e osmótico (PETRAK *et al.*, 2008).

Grande número de proteínas do citoesqueleto foi alterado neste trabalho (Figura 9). Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio podem provocar vários tipos de modificações químicas em proteínas específicas. Estudos anteriores demonstraram níveis significativamente mais elevados de proteína glutationada em brânquias de *Mytilus edulis* coletados em locais considerados poluídos em comparação com o grupo controle (MCDONAGH *et al.*, 2005). Isto correu devido ao fato de que em mexilhões a brânquia é um órgão chave de modificação reversível, em resposta ao estresse oxidativo porque é o primeiro órgão que entra em contato com quaisquer xenobióticos. É plausível que os metais que entram no tecido animal através deste órgão podem causar o estresse oxidativo transiente resultando em glutationação da actina. Modificações reversíveis, particularmente nos resíduos de cisteína, podem ter um duplo papel de proteção contra a oxidação irreversível cisteína e modulação da função da proteína (regulação redox). Estudos demonstraram que os metais, incluindo o cobre, a actina do citoesqueleto de actina e esta, estando intacta, seria essencial para a função normal das integrinas, zonas adesivas, zonas de oclusão e o complexo caderina / catenina (ZALUPS & KOROPATNICK, 2010).

Alterações na expressão de tubulinas são descritas em invertebrados e vertebrados relacionada a metais. Estudo em mosquitos *Anopheles gambiae* confirma que expressões de α tubulina constituem candidatos promissores de indicadores da contaminação por metais (MIREJI *et al.*, 2010). Metais podem se ligar a actina, a tiorredoxina R (TrxR) e muitas outras proteínas o que conduz à inibição da proteína. Este conceito é apoiado pelo fato de que metais, como o arsênio se liga a β -tubulina em seres humanos e inibe a polimerização da tubulina (ZHANG *et al.*, 2007). A sensibilidade do sistema composto por microtúbulos aos íons metálicos causa uma inibição extensiva deste e o mecanismo responsável pelos efeitos inibidores poderia, por conseguinte, ser diretamente relacionado com a ligação do íon a proteína tubulina (LILIOM *et al.*, 2000).

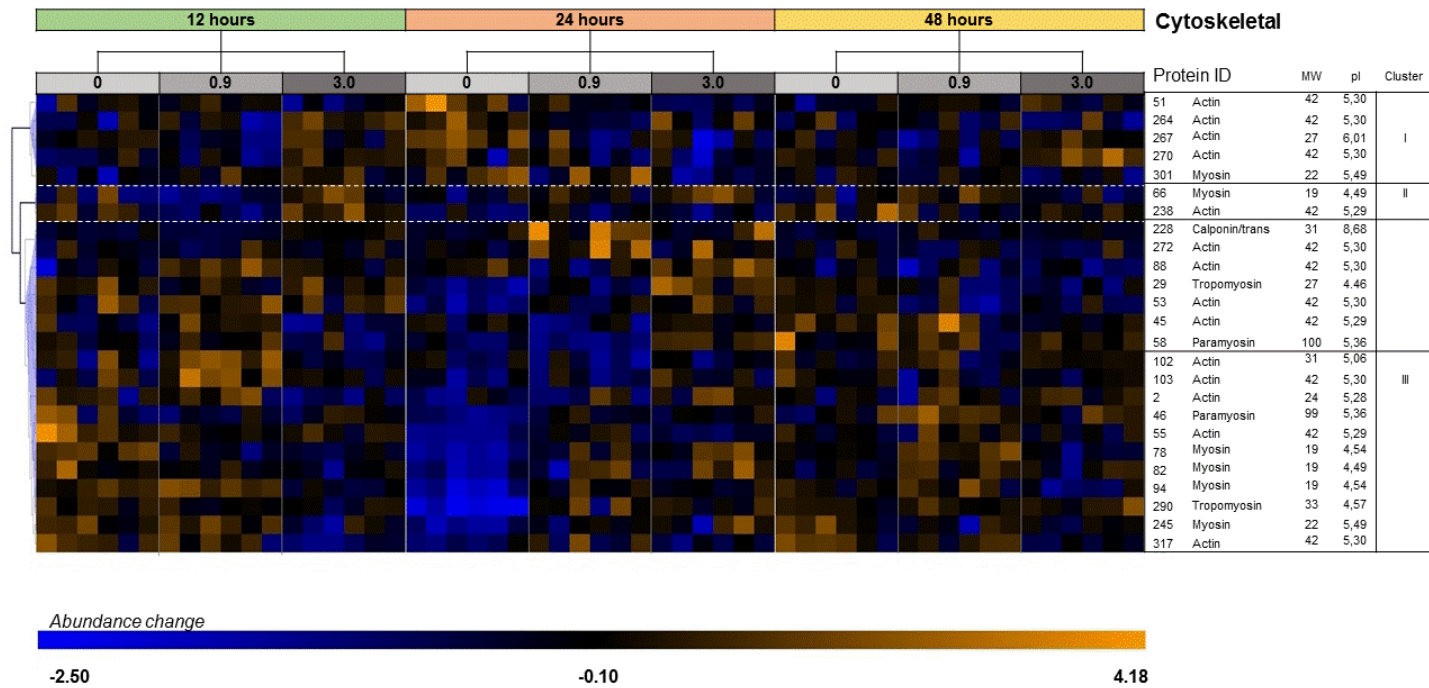


Figura 9: Agrupamento hierárquico de mudanças de abundância de proteínas de citoesqueleto, através da correlação de Pearson, em resposta a exposição ao cobre (controle, 0,9 μgL^{-1} e 3,0 μgL^{-1}) durante três tempos de exposição (12, 24 e 48 horas) de tecido branquial da lapa antártica *Nacella concinna*. A coloração azul representa uma menor abundância média de proteína (valores padronizados e volumes normalizados), enquanto laranja representa maior abundância média de proteínas. Cada coluna representa uma lapa individual, agrupadas por meio de tratamento (N = 6 para cada tratamento). As linhas representam as abundâncias padronizadas de proteínas que estão identificadas à direita cuja massa molecular e ponto isoeléctrico estão listados.

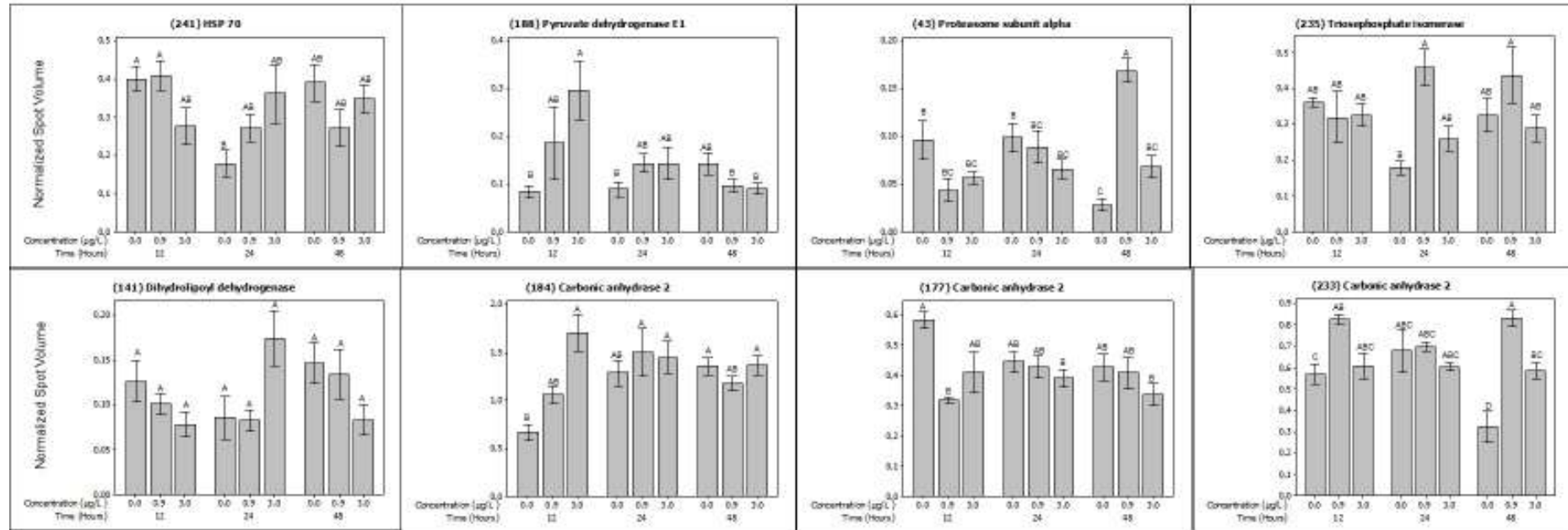


Figura 10: Alterações na abundância de proteínas de brânquia de *Nacella concinna* em resposta à exposição ao cobre (controle, 0,9 µgL⁻¹ e 3,0 µgL⁻¹) para 12, 24, 48 h. Volumes pontuais foram obtidos através da normalização em comparação o volume de todas as proteínas apresentam significa ± 1 s.e.m. (N = 6). Medias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes (teste post-hoc de comparação aos pares Tukey com base em um modelo linear geral; P ≤ 0,05). Os números dos spots estão entre parênteses.

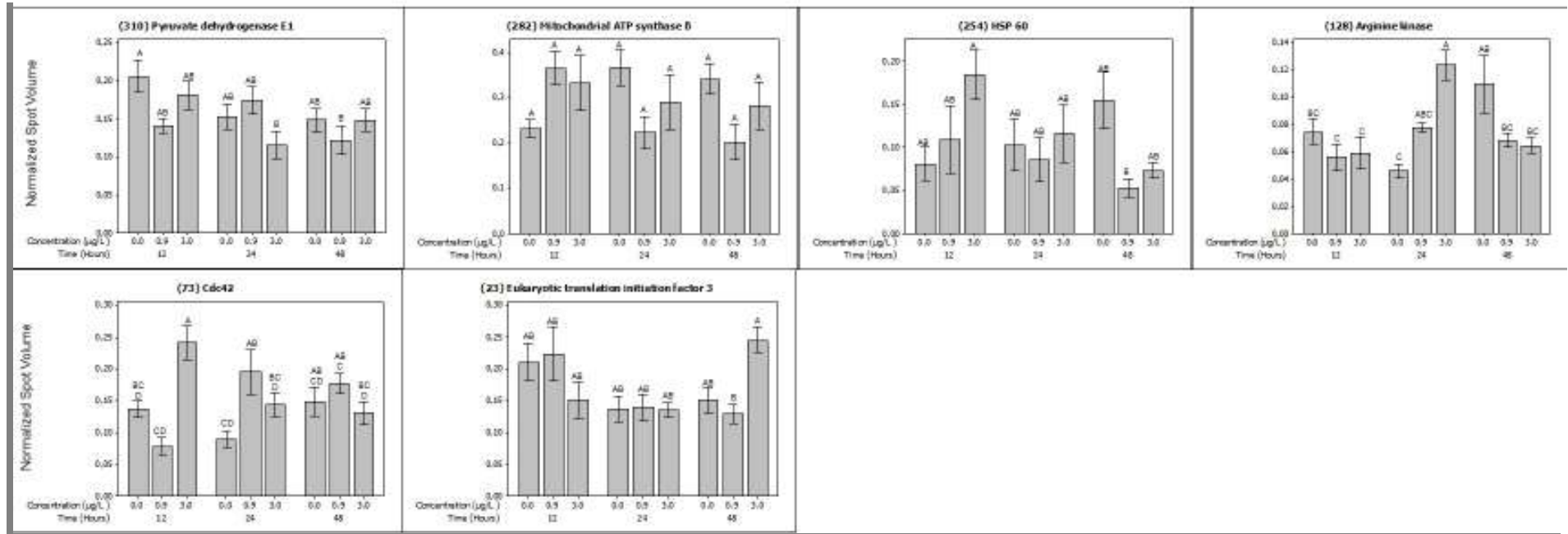


Figura 10: (Continuação)

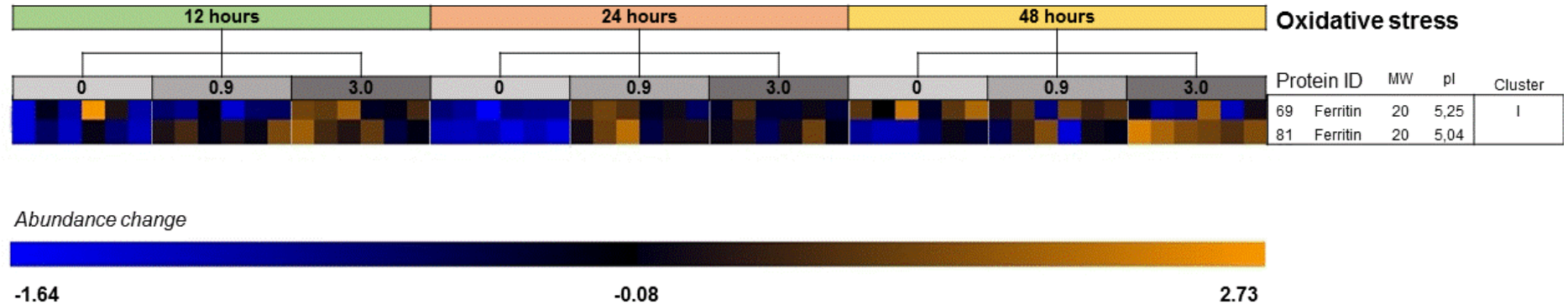


Figura 11: Agrupamento hierárquico de mudanças de abundância de proteínas de estresse oxidativo, através da correlação de Pearson, em resposta a exposição ao cobre (controle, 0,9 µgL⁻¹ e 3,0 µgL⁻¹) durante três tempos de exposição (12, 24 e 48 horas) de tecido branquial da lapa antártica *Nacella concinna*. A coloração azul representa uma menor abundância média de proteína (valores padronizados e volumes normalizados), enquanto laranja representa maior abundância média de proteínas. Cada coluna representa uma lapa individual, agrupadas por meio de tratamento (N = 6 para cada tratamento). As linhas representam as abundâncias padronizadas de proteínas que estão identificadas à direita cuja massa molecular e ponto isoelétrico estão listados.

4. CONCLUSÃO

As análises realizadas neste trabalho revelam que, quando realizadas de forma separadas para cada tempo, os grupos que foram expostos ao cobre foram consistentemente separados do grupo controle ao longo da PC1 e PC2, com certa estabilidade da porcentagem de ambos para explicar a variação com valores entre 16,9% e 22,8% a 12, 24 e 48 h.

A indução da família HSP tem sido estudada extensivamente após exposição a metais em moluscos (CHOI *et al.*, 2007; CRUZ-RODRÍGUEZ & CHU, 2002) incluindo *C. gigas* (BOUTET *et al.*, 2003b), *Ostrea edulis* (BOUTET *et al.*, 2003b) e *Mytilus edulis* (TEDENGREN *et al.*, 1999). Os metais afetam de modo adverso a conformação correta e, conseqüentemente, a função das proteínas. Nas condições em que as proteínas incorretamente dobradas se acumulam nas células, tem início uma resposta ao estresse. Um aumento na abundância destas proteínas de resposta ao estresse é considerado como auxiliar na recuperação de vias metabólicas (ROTHMAN, 1989). No presente estudo podemos observar ação diferenciada das HSPs, ambas relacionadas a uma maior expressão nos tempos de 12 h e 24 h. Isto sugere que a abundância de HSPs pode, mais do que ser altamente dependente da concentração, ter uma dinâmica de acordo com o tempo de exposição. Independentemente disso, a identificação de HSPs associadas com a exposição ao cobre é consistente com a literatura. Estas proteínas, particularmente a HSP 70, têm sido amplamente utilizadas como biomarcadores do estresse ambiental (THOMPSON *et al.*, 2012). As alterações observadas no proteossoma subunidade α corroboram com o fato de que a exposição ao cobre pode estar gerando ROS e que a célula precisa lidar com os desafios fisiológicos na tentativa de manter a homeostase. Normalmente isto exige a disponibilidade de uma série de novas proteínas o que se explicaria pelas alterações observadas no fator de iniciação da tradução.

O cobre também influenciou significativamente a anidrase carbônica (CA), fato que possivelmente pode alterar o equilíbrio ácido-base e ser um fator que afeta um número significativo de outros processos celulares depois da exposição. A CA é uma proteína de ligação a metais (Zn) e a substituição do metal provavelmente é o mecanismo mais provável para explicar como o cobre afeta a CA (LIONETTO *et al.*,

2000;. SKAGGS & HENRY, 2002a). Além disso, as reações bioquímicas relacionadas ao aumento no fornecimento de ATP sob condições de estresse, como a reação de piruvato desidrogenase (PDH), ATP sintase, triose fosfato isomerase (TPI), arginina quinase (AK), e dihidrolipoil desidrogenase (DHD) possivelmente indicam estresse metabólico, inibição e/ou danos a outras vias metabólicas. É possível que uma alteração no equilíbrio ácido-base por meio do aumento da abundância de CA desencadeou alterações que afetaram o metabolismo energético a longo prazo, embora as mudanças que ocorreram ao longo do tempo de tais respostas de *feedback* são, em grande parte, desconhecidas.

A Cdc42, proteína de sinalização chave na dinâmica do citoesqueleto, está aumentada em resposta a $3,0 \mu\text{gL}^{-1}$ a 12 horas e, subsequentemente, na concentração $0,9\mu\text{gL}^{-1}$ de cobre em 24 e 48 horas. Algumas das alterações que podem ser consequências da presença desta proteína de sinalização incluem possíveis modificações da região da cauda do filamento do citoesqueleto e interação dos mesmos. Os resultados sugerem que a exposição ao cobre afeta o metabolismo do citoesqueleto desde o início da exposição ao metal. Além deste grupo, as proteínas com ação de chaperonina e de metabolismo energético contribuíram para separar os grupos experimentais. Isso sugere que essas funções representam alguns dos ajustes celulares e, possivelmente, em longo prazo contribuem para estabelecer um novo estado de homeostase em células de brânquias de *N. concinna*. Os resultados demonstraram como o tempo de exposição ao cobre no tecido branquial determina as alterações proteômicas possíveis de serem observadas dentro dos limites de massa molecular e ponto isoelétrico analisados.

Os nossos resultados indicam alterações proteômicas que se modificam ao longo do tempo e fornecem um quadro mais completo da dinâmica da resposta celular ao cobre. As alterações proteômicas também confirmam que a exposição ao cobre afeta proteínas de ligação a metais, incluindo a ferritina (Figura 11) e a CA, eventualmente pela substituição dos metais de ligação fundamentais na execução da sua função. Alterações em proteínas antioxidantes, de rotas metabólicas de geração de energia, do RE e proteínas do citoesqueleto, afetam a dinâmica do citoesqueleto e indicam que o cobre influencia a geração de ROS, possivelmente afetando a maturação, altamente dependente redox, de proteínas no RE.

DISCUSSÃO FINAL

Os dados proteômicos obtidos neste trabalho demonstraram que mesmo as pequenas alterações nas concentrações de metal provocam diferentes padrões de expressão de proteína em lapas antárticas *N. conccina* (RODRIGUEZ-ORTEGA *et al.*, 2003; SON *et al.*, 2011; THOMPSON *et al.*, 2012)

A análise de componentes principais (PCA) permitiu avaliar, independentemente, a associação do metal dissolvido (chumbo e cobre) e de período temporal (12, 24, 48 ou 168 h), com os proteomas de *N. conccina*.

No organismo, os mecanismos de compensação podem envolver o comportamento de fuga, a aceleração da ventilação, o consumo de oxigênio e a estimulação da alimentação. De forma geral, os processos de compensação celular são essenciais para o organismo sobreviver ao estresse. São energeticamente custosos e podem desviar o fluxo de energia e a potência metabólica de aptidão relacionadas com funções como a reprodução e o crescimento para a manutenção e reparação (WILLMER *et al.*, 2009).

Lapas antárticas expostas aos metais tiveram significativamente menor expressão de diversas proteínas mitocondriais, que são cruciais no metabolismo do ATP. A produção diminuída do ATP, provavelmente, pode afetar a absorção de nutrientes e a manutenção do gradiente de prótons transmembrana visando o transporte de nutrientes para o interior das células (BOYER, 1997).

Existem elementos importantes, neste trabalho, que podemos salientar a partir das listas de proteínas obtidas. Por exemplo, a identificação de proteínas quinases potencialmente importantes na depressão da taxa metabólica que regulam ambos os processos de consumo e produção de ATP. Por fosforilação de enzimas-chave de vias do metabolismo de energia a proteína quinase ativada por AMP mantém uma concentração de ATP celular constante durante o estresse induzido por falta de energia (KARAGOUNIS & HAWLEY, 2009). Adaptações metabólicas e estratégias de sobrevivência ao estresse extremo requerem uma regulação coordenada dos mecanismos de conservação de energia e consumo, a fim de manter o equilíbrio de energia do tecido, como indicado pela diminuição mínima de

ATP e fosfagênios teciduais (CHURCHILL & STOREY, 1996; ISANI *et al.*, 1989; KUROCHKIN *et al.*, 2009; SOKOLOVA *et al.*, 2000; STOREY & CHURCHILL, 1995). Alterações fisiológicas e moleculares, incluindo a interrupção da alimentação, a assimilação e locomoção, a transição parcial de anaerobiose, a sub-regulação da síntese e do transporte da membrana de proteína e/ou ativação de AMPK, podem servir como biomarcadores de transição para a situação bio-energeticamente não sustentáveis (SOKOLOVA *et al.*, 2012). Compensação metabólica durante a exposição ou tensão moderada envolve muitas vezes volume elevado de proteínas (e aumento associado dos custos de manutenção basais) para cobrir o custo energético da expressão de proteínas do estresse e/ou a ativação das vias de degradação de proteínas. A síntese da proteína e o turnover encontram-se entre os mais importantes consumidores de ATP da célula (HOCHACHKA & SOMERO, 2002).

Provavelmente, as lapas antárticas, neste caso *N. concinna*, empregaram estratégias celulares específicas para a detoxicação dos metais, tornando-se tolerantes as concentrações empregadas nos bioensaios. *N. concinna* mostrou notável expressão de diversas proteínas que, em conjunto com a superóxido dismutase (SOD) são a primeira linha de defesa contra as espécies reativas de oxigênio em resposta a exposição aos metais (REGOLI, 2000).

Neste trabalho, provavelmente podemos inferir que foi observado alteração na produção de energia para o sequestro de metal/detoxicação, conforme indicado pelos aumentos significativos de precursor de malato desidrogenase (MDH) (BABBITT *et al.*, 1996; MINARIK *et al.*, 2002). Parece que as disfunções sistêmicas das funções celulares estão associadas com a exposição aos diferentes metais e as desordens podem ser parcialmente relacionadas com as reduções nas taxas de crescimento previamente observadas em populações contaminadas .

Os organismos sujeitos a níveis baixos de estresse ambiental, quando as condições moderadamente desviam do “ótimo”, empregam vários mecanismos celulares, fisiológicos e comportamentais que reduzem o impacto negativo do estresse. Ao nível celular, o estresse moderado induz uma série de respostas comuns, que incluem a reparação de danos ao DNA e de proteínas, a parada do ciclo celular ou a apoptose, a remoção de detritos celulares e moleculares gerado

por tensão e, em geral uma transição de um estado de crescimento celular para um de reparação celular (KASSAHN *et al.*, 2009; KULTZ, 2005).

Há vários mecanismos comuns de manutenção da homeostase das proteínas durante a exposição ao estresse, dentre eles, a ativação e expressão de proteínas de choque térmico (HSPs). Nossos resultados indicam alterações tanto em HSP70 quanto em HSP60. Estas proteínas possuem uma função de chaperonina, ou seja, dobrar as cadeias de polipeptídeos sintetizados e reparar a estrutura molecular ou remover moléculas de proteínas danificadas. Muitos tipos de estresse, como a exposição ao calor e ao frio, poluentes orgânicos, metais, oxidantes, luz ultra violeta e hipóxia podem induzir a expressão de HSPs (ANESTIS *et al.*, 2007; ANESTIS *et al.*, 2008; BUCKLEY *et al.*, 2001; DAHLHOFF, 2004; GONZALEZ-RIOPEDRE *et al.*, 2007; IVANINA *et al.*, 2009; PIANO *et al.*, 2004; SANDERS, 1993; SOTI & CSERMELY, 2000). Algumas HSPs podem também estabilizar os lisossomos prevenindo derramamento do seu conteúdo para o citoplasma e a morte celular (KIRKEGAARD *et al.*, 2010). Proteínas severamente danificadas que não podem ser reparadas pelas HSPs são a ubiquitina-conjugados e direcionadas para a degradação proteolítica e eliminação.

Uma variedade de agentes estressores ambientais, como os metais, induz a geração de ROS acima dos níveis basais normais e, portanto, necessitam de regulação positiva das defesas antioxidantes que elevam o consumo de energia (ABELE *et al.*, 2007; BERTIN & AVERBECK, 2006; KAKKAR & SINGH, 2007; VALKO *et al.*, 2005; WINSTON & DI GIULIO, 1991). A exposição a poluentes também regula positivamente a biotransformação específica de poluente e a destoxicação em invertebrados aquáticos, incluindo proteínas de resistência a multixenobióticos envolvidas na eliminação dependente de ATP de alguns metais vestigiais (BARD, 2000; BROEKS *et al.*, 1996; IVANINA & SOKOLOVA, 2008; IVANINA *et al.*, 2009; SMITAL & KURELEC, 1998).

A ação de chaperonina das HSPs, bem como a ubiquitinação são processos dependentes de ATP que, juntamente com o custo da energia para a síntese de proteínas para a resposta celular ao estresse contribuem elevando a demanda de energia do organismo, de forma sistêmica, durante as exposições ao estresse e requerem suporte de elevados níveis de metabolismo aeróbio (CALOW, 1991; FEDER & HOFMANN, 1999).

Níveis moderados de contaminação também podem alterar significativamente a alocação de energia em animais aquáticos (CALOW, 1991). Normalmente, o consumo de energia é suprimido devido ao declínio em qualquer atividade alimentar ou na eficiência de assimilação (TORO *et al.*, 2003; WANG *et al.*, 2005), enquanto os custos de manutenção do metabolismo permanecem constantes (WIDDOWS & JOHNSON, 1988) ou aumentam várias vezes devido à regulação positiva compensatória de destoxicação e aos mecanismos de proteção celular (CHERKASOV *et al.*, 2006; JEONG & CHO, 2007; LANNIG *et al.*, 2006a; LANNIG *et al.*, 2006b; SOKOLOVA & LANNIG, 2008).

O balanço de energia é um requisito fundamental de adaptação e tolerância ao estresse. É possível explorar as ligações entre o metabolismo, balanço energético e tolerância ao estresse, utilizando invertebrados aquáticos como modelo biológico e demonstrar que o uso de parâmetros-chave do equilíbrio energético podem ser utilizados (SOKOLOVA *et al.*, 2012). As informações obtidas neste trabalho podem auxiliar na integração do entendimento dos efeitos de estresse induzido por metais e as suas interações e prever as consequências de estresse ambiental no organismo e na população de *N. concinna*.

Os dados do presente estudo mostraram que a exposição de *N. concinna* a diferentes concentrações de metais, por diferentes tempos, quando comparado com o controle, tem impactos significativos sobre os proteomas das brânquias. Para cada um dos metais utilizados nos ensaios realizados, a análise 2-D identificou um conjunto distinto de *spots* de proteínas que diferiam em intensidade em cada uma das concentrações e tempos de exposição utilizados.

Isto sugere que os impactos sobre a expressão da proteína é provavelmente devido às variações observadas levando em consideração combinações de tempo de exposição e diferentes concentrações dos metais.

Destacamos a importância da análise de vários tempo de exposição. A variabilidade temporal identificada no estudo atual traz questionamentos de que análises proteômicas baseadas em um único período de tempo e única concentração de metal podem não refletir toda a dinâmica fisiológica, logo, não refletem todas as mudanças nos padrões de expressão de proteínas desenvolvidos pelos tecidos durante ensaios toxicológicos.

REFERÊNCIAS

ABELE, D.; BURLANDO, B.; VIARENGO, A.; PÖRTNER, H.-O. Exposure to elevated temperatures and hydrogen peroxide elicits oxidative stress and antioxidant response in the Antarctic intertidal limpet *Nacella concinna*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 120, n. 2, p. 425-435, 1998.

ABELE, E.; PHILIP, E.; GONZALEZ, P. M.; PUNTARULO, S. Marine invertebrate mitochondria and oxidative stress. **Front Biosci**, v. 12, p. 933-46, 2007.

AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature**. 2003 **Mar 13;422(6928):198-207.**, 2003.

AHN, I.-Y.; CHUNG, K. H.; CHOI, H. J. Influence of glacial runoff on baseline metal accumulation in the Antarctic limpet *Nacella concinna* from King George Island. **Marine Pollution Bulletin**, v. 49, n. 1-2, p. 119-127, 2004.

AHN, I.-Y.; KANG, J.; KIM, D.-Y. A preliminary study on heavy metals in the Antarctic limpet, *Nacella concinna* (Strebel, 1908) (Gastropoda: Patellidae) in an intertidal habitat on King George Island. **Korean Journal of Polar Research**, v. 10, n. 1, p. 1-8, June 1999.

AHN, I.-Y.; KIM, K.-W.; CHOI, H. J. A baseline study on metal concentrations in the Antarctic limpet *Nacella concinna* (Gastropoda: Patellidae) on King George Island: variations with sex and body parts. **Marine Pollution Bulletin**, v. 44, n. 5, p. 424-431, 2002.

AHN, I.-Y.; LEE, S. H.; KIM, K. T.; SHIM, J. H.; KIM, D.-Y. Baseline heavy metal concentrations in the Antarctic clam, *Laternula elliptica* in Maxwell Bay, King George Island, Antarctica. **Marine Pollution Bulletin**, v. 32, n. 8-9, p. 592-598, 1996/9// 1996.

ANESTIS, A.; LAZOU, A.; PORTNER, H. O.; MICHAELIDIS, B. Behavioral, metabolic, and molecular stress responses of marine bivalve *Mytilus galloprovincialis* during long-term acclimation at increasing ambient temperature. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 293, n. 2, p. R911-21, Aug 2007.

ANESTIS, A.; PORTNER, H. O.; LAZOU, A.; MICHAELIDIS, B. Metabolic and molecular stress responses of sublittoral bearded horse mussel *Modiolus barbatus* to warming sea water: implications for vertical zonation. **J Exp Biol**, v. 211, n. Pt 17, p. 2889-98, Sep 2008.

ANISIMOV, O. A.; VAUGHAN, D. G.; CALLAGHAN, T. V.; FURGAL, C.; MARCHANT, H.; PROWSE, T. D.; VILHJÁLMSSON, H.; WALSH, J. E. **Polar regions (Arctic and Antarctic). Climate Change 2007: Impacts, Adaptation and Vulnerability. Contribution of Working Group II to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change, M.L. Parry, O.F. Canziani, J.P. Palutikof, P.J. van der Linden and C.E. Hanson, Eds.** Cambridge: Cambridge University Press, 2007. Disponível em: < <http://www.ipcc-wg2.org/> >.

APRAIZ, I.; MI, J.; CRISTOBAL, S. Identification of proteomic signatures of exposure to marine pollutants in mussels (*Mytilus edulis*). **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 5, n. 7, p. 1274-1285, 2006.

ARAKI, K.; NAGATA, K. Protein folding and quality control in the ER. In: MORIMOTO, R. I.; SELKOE, D. J., *et al* (Ed.). **Protein Homeostasis**. New York: Cold Spring Harbor Press, 2012. p.121-145.

ARORA, P. S.; YAMAGIWA, H.; SRIVASTAVA, A.; BOLANDER, M. E.; SARKAR, G. Comparative evaluation of two two-dimensional gel electrophoresis image analysis software applications using synovial fluids from patients with joint disease. **J Orthop Sci**, v. 10, n. 2, p. 160-6, 2005.

AROSIO, P.; LEVI, S. Cytosolic and mitochondrial ferritins in the regulation of cellular iron homeostasis and oxidative damage. **Biochim Biophys Acta**, v. 1800, n. 8, p. 783-92, Aug 2010.

ATLI, G.; CANLI, M. Enzymatic responses to metal exposures in a freshwater fish *Oreochromis niloticus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 145, n. 2, p. 282-287, 2007.

BABBITT, P. C.; HASSON, M. S.; WEDEKIND, J. E.; PALMER, D. R.; BARRETT, W. C.; REED, G. H.; RAYMENT, I.; RINGE, D.; KENYON, G. L.; GERLT, J. A. The enolase superfamily: a general strategy for enzyme-catalyzed abstraction of the alpha-protons of carboxylic acids. **Biochemistry**, v. 35, n. 51, p. 16489-501, Dec 24 1996.

BANTSCHIEFF, M.; SCHIRLE, M.; SWEETMAN, G.; RICK, J.; KUSTER, B. Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. **Anal Bioanal Chem**, v. 389, n. 4, p. 1017-31, Oct 2007.

BARBANTE, C.; TURETTA, C.; GAMBARO, A.; CAPODAGLIO, G.; SCARPONI, G. Sources and origins of aerosols reaching Antarctica as revealed by lead concentration profiles in shallow snow. **Annals of Glaciology**, vol.27, pp.674-678, v. 27, p. 674-678, 1998.

BARD, S. M. Multixenobiotic resistance as a cellular defense mechanism in aquatic organisms. **Aquat Toxicol**, v. 48, n. 4, p. 357-389, Apr 1 2000.

BARGAGLI, R. Trace metals in Antarctica related to climate change and increasing human impact. **Rev Environ Contam Toxicol.**, n. 166, p. 129-73, 2000.

BARGAGLI, R. Persistent Contaminants in Antarctic Marine Food Chains. In: (Ed.). **Antarctic Ecosystems**: Springer Berlin Heidelberg, v.175, 2005. p.249-289. (Ecological Studies). ISBN 978-3-540-26465-1.

BARGAGLI, R. Environmental contamination in Antarctic ecosystems. **Science of The Total Environment**, v. 400, n. 1-3, p. 212-226, 2008.

BARGAGLI, R.; NELLI, L.; ANCORA, S.; FOCARDI, S. Elevated cadmium accumulation in marine organisms from Terra Nova Bay (Antarctica). **Polar Biology**, v. 16, n. 7, p. 513-520, 1996.

BARGAGLI, R.; SANCHEZ-HERNANDEZ, J. C.; MARTELLA, L.; MONACI, F. Mercury, cadmium and lead accumulation in Antarctic mosses growing along nutrient and moisture gradients. **Polar Biology**, v. 19, n. 5, p. 316-322, 1998.

BARGAGLI, R.; SANCHEZ-HERNANDEZ, J. C.; MONACI, F. Baseline concentrations of elements in the antarctic macrolichen *Umbilicaria decussata*. **Chemosphere**, v. 38, n. 3, p. 475-487, 1999.

BERTH, M.; MOSER, F. M.; KOLBE, M.; BERNHARDT, J. The state of the art in the analysis of two-dimensional gel electrophoresis images. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 76, n. 6, p. 1223-43, Oct 2007a.

_____. The state of the art in the analysis of two-dimensional gel electrophoresis images. **Appl Microbiol Biotechnol**. 2007 Oct;76(6):1223-43. Epub 2007 Aug 23., 2007b.

BERTIN, G.; AVERBECK, D. Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). **Biochimie**, v. 88, n. 11, p. 1549-59, Nov 2006.

BLAIN, S.; QUEGUINER, B.; ARMAND, L.; BELVISO, S.; BOMBLED, B.; BOPP, L.; BOWIE, A.; BRUNET, C.; BRUSSAARD, C.; CARLOTTI, F.; CHRISTAKI, U.; CORBIERE, A.; DURAND, I.; EBERSBACH, F.; FUDA, J.-L.; GARCIA, N.; GERRINGA, L.; GRIFFITHS, B.; GUIGUE, C.; GUILLERM, C.; JACQUET, S.; JEANDEL, C.; LAAN, P.; LEFEVRE, D.; LO MONACO, C.; MALITS, A.; MOSSERI, J.; OBERNOSTERER, I.; PARK, Y.-H.; PICHERAL, M.; PONDAVEN, P.; REMENYI, T.; SANDRONI, V.; SARTHOU, G.; SAVOYE, N.; SCOUARNEC, L.; SOUHAUT, M.; THUILLER, D.; TIMMERMANS, K.; TRULL, T.; UITZ, J.; VAN BEEK, P.; VELDHUIS, M.; VINCENT, D.; VIOLLIER, E.; VONG, L.; WAGENER, T. Effect of natural iron fertilization on carbon sequestration in the Southern Ocean. **Nature**, v. 446, n. 7139, p. 1070-1074, 2007.

BLANKLEY, W. O.; BRANCH, G. M. Ecology of the limpet *Nacella delesserti* (Philippi) at Marion Island in the sub-Antarctic southern ocean. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 92, n. 2-3, p. 259-281, 1985.

BLAY, S. K. New trends in the protection of the Antarctic environment: the 1991 Madrid Protocol. **American Journal of International Law**, p. 377-399, 1992.

BORKOVIĆ, S. S.; PAVLOVIĆ, S. Z.; KOVAČEVIĆ, T. B.; ŠTAJN, A. Š.; PETROVIĆ, V. M.; SAIČIĆ, Z. S. Antioxidant defence enzyme activities in hepatopancreas, gills and muscle of Spiny cheek crayfish (*Orconectes limosus*) from the River Danube. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 147, n. 1, p. 122-128, 2008.

BORLAND, D.; TAYLOR, M. R., 2ND. Rainbow color map (still) considered harmful. **IEEE Comput Graph Appl.** 2007 Mar-Apr;27(2):14-7., 2007.

BÖTTCHER, K.; SIEBERS, D.; BECKER, W.; PETRAUSCH, G. Physiological role of branchial carbonic anhydrase in the shore crab *Carcinus maenas*. **Marine Biology**, v. 110, n. 3, p. 337-342, 1991.

BOUTET, I.; TANGUY, A.; AUFFRET, M.; MUJZIC, N.; MORAGA, D. Expression of HSP 70 in experimentally metal-exposed european flat oysters *Ostrea edulis*. **Journal of Shellfish Research**, v. 22, n. 3, p. 763-766, Dec 2003a.

BOUTET, I.; TANGUY, A.; ROUSSEAU, S.; AUFFRET, M.; MORAGA, D. Molecular identification and expression of heat shock cognate 70 (hsc70) and heat shock protein 70 (hsp70) genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. **Cell Stress & Chaperones**, v. 8, n. 1, p. 76-85, Spr 2003b.

BOUSTRON, C. F.; WOLFF, E. W. Heavy metal and sulphur emissions to the atmosphere from human activities in Antarctica. **Atmospheric Environment (1967)**, v. 23, n. 8, p. 1669-1675, 1989.

BOWGEN, A. D.; FRASER, K. P. P.; PECK, L. S.; CLARKE, A. Energetic cost of synthesizing proteins in Antarctic limpet, *Nacella concinna* (Strebel, 1908), is not temperature dependent. **American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 292, n. 6, p. R2266-R2274, Jun 2007.

BOYD, P. W. **Ocean iron cycle. In: Surface Ocean - Lower Atmosphere Processes.** Washington, DC: AGU, 2009. 329 ISBN 978-0-87590-477-1. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1029/GM187> >.

BOYD, P. W.; DONEY, S. C.; STRZEPEK, R.; DUSENBERRY, J.; LINDSAY, K.; FUNG, I. Climate-mediated changes to mixed-layer properties in the Southern Ocean: assessing the phytoplankton response. **Biogeosciences**, v. 5, n. 3, p. 847-864, 2008.

BOYD, P. W.; HUTCHINS, D. A. Understanding the responses of ocean biota to a complex matrix of cumulative anthropogenic change. **Marine Ecology Progress Series**, v. 470, p. 125-135, December 06, 2012 2012.

BOYD, P. W.; STRZEPEK, R.; FU, F.; HUTCHINS, D. A. Environmental control of open-ocean phytoplankton groups: Now and in the future. **Limnology and Oceanography**, v. 55, n. 3, p. 1353-1376, 2010.

BOYER, P. D. The ATP synthase--a splendid molecular machine. **Annu Rev Biochem**, v. 66, p. 717-49, 1997.

BRAAKMAN, I.; HEBERT, D. N. Protein folding in the Endoplasmic Reticulum. In: FERRO-NOVICK, S.; RAPOPORT, T. A., *et al* (Ed.). **The Endoplasmic Reticulum**. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Press, 2013. p.63-79.

BRIX, K. V.; ESBAUGH, A. J.; GROSELL, M. The toxicity and physiological effects of copper on the freshwater pulmonate snail, *Lymnaea stagnalis*. **Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology**, v. 154, n. 3, p. 261-267, Sep 2011.

BROCKER, C.; CANTORE, M.; FAILLI, P.; VASILIOU, V. Aldehyde dehydrogenase 7A1 (ALDH7A1) attenuates reactive aldehyde and oxidative stress induced cytotoxicity. **Chem Biol Interact**, v. 191, n. 1-3, p. 269-77, May 30 2011.

BROEKS, A.; GERRARD, B.; ALLIKMETS, R.; DEAN, M.; PLASTERK, R. H. Homologues of the human multidrug resistance genes MRP and MDR contribute to heavy metal resistance in the soil nematode *Caenorhabditis elegans*. **EMBO J**, v. 15, n. 22, p. 6132-43, Nov 15 1996.

BUCKLEY, B. A.; OWEN, M. E.; HOFMANN, G. E. Adjusting the thermostat: the threshold induction temperature for the heat-shock response in intertidal mussels (genus *Mytilus*) changes as a function of thermal history. **J Exp Biol**, v. 204, n. Pt 20, p. 3571-9, Oct 2001.

BULLEID, N. J. Disulfide bond formation in the mammalian endoplasmic reticulum. In: FERRO-NOVICK, S.; RAPOPORT, T. A., *et al* (Ed.). **The Endoplasmic Reticulum**. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Press, 2013. p.81-92.

BURFORD, M. A.; MACEY, D. J.; WEBB, J. Hemolymph ferritin and radula structure in the limpets *Patelloida alticostata* and *Patella peronii* (Mollusca: Gastropoda). **Comparative Biochemistry & Physiology**, v. 83A, p. 353-358, 1986.

BUTLER, T.; PAUL, J.; EUROPE-FINNER, N.; SMITH, R.; CHAN, E. C. Role of serine-threonine phosphoprotein phosphatases in smooth muscle contractility. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 304, n. 6, p. C485-504, Mar 2013.

CALOW, P. Physiological costs of combating chemical toxicants: Ecological implications. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology**, v. 100, n. 1-2, p. 3-6, 1991.

CARICATO, R.; LIONETTO, M. G.; DONDERO, F.; VIARENGO, A.; SCHETTINO, T. Carbonic anhydrase activity in *Mytilus galloprovincialis* digestive gland: sensitivity to heavy metal exposure. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, v. 152, n. 3, p. 241-7, Sep 2010.

CAROLI, S.; CESCO, P.; WALTON, D. W. H. **Environmental Contamination in Antarctica: A Challenge to Analytical Chemistry**. Elsevier Science, 2001a. ISBN 9780080531076. Disponível em: <
<https://books.google.com.br/books?id=VIIXKtrqp5kC> >.

CAROLI, S.; SERGIO, C.; PAOLO, C.; DAVID, W. H. W. Environmental chemistry in Antarctica: The quest for accuracy. In: (Ed.). **Environmental Contamination in Antarctica**. Amsterdam: Elsevier Science, 2001b. p.1-32. ISBN 978-0-08-043199-4.

CHANDRAN, R.; SIVAKUMAR, A. A.; MOHANDASS, S.; ARUCHAMI, M. Effect of cadmium and zinc on antioxidant enzyme activity in the gastropod, *Achatina fulica*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 140, n. 3-4, p. 422-426, 2005/4// 2005.

CHERKASOV, A. S.; BISWAS, P. K.; RIDINGS, D. M.; RINGWOOD, A. H.; SOKOLOVA, I. M. Effects of acclimation temperature and cadmium exposure on cellular energy budgets in the marine mollusk *Crassostrea virginica*: linking cellular and mitochondrial responses. **J Exp Biol**, v. 209, n. Pt 7, p. 1274-84, Apr 2006.

CHOI, H. J.; JI, J.; CHUNG, K.-H.; AHN, I.-Y. Cadmium bioaccumulation and detoxification in the gill and digestive gland of the Antarctic bivalve *Laternula elliptica*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 145, n. 2, p. 227-235, 2007.

CHURCHILL, T. A.; STOREY, K. B. Metabolic responses to freezing and anoxia by the periwinkle *Littorina littorea*. **Journal of Thermal Biology**, v. 21, n. 1, p. 57-63, 1996.

CICIK, B.; ENGIN, K. The effects of cadmium on levels of glucose in serum and glycogen reserves in the liver and muscle tissues of *Cyprinus carpio* (L. 1758). **Turkish Journal Veterinary Animal Science**, v. 29, p. 113-117, 2005.

CLAESSENS, M.; SARIS, W. H.; BOUWMAN, F. G.; EVELO, C. T.; HUL, G. B.; BLAAK, E. E.; MARIMAN, E. C. Differential valine metabolism in adipose tissue of low and high fat-oxidizing obese subjects. **Proteomics Clin Appl**, v. 1, n. 10, p. 1306-15, Oct 2007.

CLARK, K. A.; MCELHINNY, A. S.; BECKERLE, M. C.; GREGORIO, C. C. Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 18, p. 637-706, 2002.

CLARK, M. S.; HUSMANN, G.; THORNE, M. A.; BURNS, G.; TRUEBANO, M.; PECK, L. S.; ABELE, D.; PHILIPP, E. E. Hypoxia impacts large adults first: consequences in a warming world. **Glob Chang Biol**, v. 19, n. 7, p. 2251-63, Jul 2013a.

CLARK, M. S.; HUSMANN, G.; THORNE, M. A. S.; BURNS, G.; TRUEBANO, M.; PECK, L. S.; ABELE, D.; PHILIPP, E. E. R. Hypoxia impacts large adults first: consequences in a warming world. **Global Change Biology**, p. n/a-n/a, 2013b.

CLASON, B.; LANGSTON, W. J.; ZAUKE, G. P. Bioaccumulation of trace metals in the amphipod *Chaetogammarus marinus* (Leach, 1815) from the Avon and Tamar estuaries (UK): comparison of two-compartment and hyperbolic toxicokinetic models. **Marine Environmental Research**, v. 57, n. 3, p. 171-195, 2004.

CLAYTON, M. E.; STEINMANN, R.; FENT, K. Different expression patterns of heat shock proteins hsp 60 and hsp 70 in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) exposed to copper and tributyltin. **Aquatic Toxicology**, v. 47, n. 3, p. 213-226, 2000.

COLE, W. C.; WELSH, D. G. Role of myosin light chain kinase and myosin light chain phosphatase in the resistance arterial myogenic response to intravascular pressure. **Arch Biochem Biophys**, v. 510, n. 2, p. 160-73, Jun 15 2011.

COMISO, J. C. Large Decadal Decline of the Arctic Multiyear Ice Cover. **Journal of Climate**, v. 25, n. 4, p. 1176-1193, 2013/06/06 2012.

CONVEY, P.; BINDSCHADLER, R.; DI PRISCO, G.; FAHRBACH, E.; GUTT, J.; HODGSON, D. A.; MAYEWSKI, P. A.; SUMMERHAYES, C. P.; TURNER, J. Antarctic climate change and the environment. **Antarctic Science**, v. 21, n. 06, p. 541-563, 2009.

COSTLOW, J. D. Effect of carbonic anhydrase inhibitors on shell development and growth of *Balanus improvisus* Darwin. **Physiological Zoology**, p. 177-184, 1959.

COX, D.; CHANG, P.; ZHANG, Q.; REDDY, P. G.; BOKOCH, G. M.; GREENBERG, S. Requirements for both Rac1 and Cdc42 in membrane ruffling and phagocytosis in leukocytes. **J Exp Med**, v. 186, n. 9, p. 1487-94, Nov 3 1997.

COYNE, V. E. The importance of ATP in the immune system of molluscs. **Isj-Invertebrate Survival Journal**, v. 8, n. 1, p. 48-55, 2011 2011.

CRAVATT, B. F.; SIMON, G. M.; YATES III, J. R. The biological impact of mass-spectrometry-based proteomics. **Nature**, v. 450, n. 7172, p. 991-1000, 2007.

CROCKETT, A.; WHITE, G. Mapping Sediment Contamination and Toxicity in Winter Quarters Bay, McMurdo Station, Antarctica. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 85, n. 3, p. 257-275, 2003.

CRUZ-RODRÍGUEZ, L. A.; CHU, F.-L. E. Heat-shock protein (HSP70) response in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, exposed to PAHs sorbed to suspended artificial clay particles and to suspended field contaminated sediments. **Aquatic Toxicology**, v. 60, n. 3, p. 157-168, 2002.

CRUZ-RODRÍGUEZ, L. A.; CHU, F.-L. E. Heat-shock protein (HSP70) response in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, exposed to PAHs sorbed to suspended artificial clay particles and to suspended field contaminated sediments. **Aquatic Toxicology**, v. 60, n. 3-4, p. 157-168, 10/30/ 2002.

CSALA, M.; MARGITTAI, E.; BANHEGYI, G. Redox control of endoplasmic reticulum function. **Antioxid Redox Signal**, v. 13, n. 1, p. 77-108, Jul 1 2010.

DAHE, Q.; MAYEWSKI, P. A.; LYONS, W. B.; JUNYING, S.; SHUGUI, H. Lead pollution in Antarctic surface snow revealed along the route of the International Trans-Antarctic Expedition. **Annals of Glaciology**, v. 29, n. 1, p. 94-98, 1999.

DAHLHOFF, E. P. Biochemical indicators of stress and metabolism: applications for marine ecological studies. **Annu Rev Physiol**, v. 66, p. 183-207, 2004.

DAUER, W.; PRZEDBORSKI, S. Parkinson's disease: mechanisms and models. **Neuron**, v. 39, n. 6, p. 889-909, 2003.

DE POMERAI, D. Heat-shock proteins as biomarkers of pollution. **Hum Exp Toxicol**, v. 15, n. 4, p. 279-85, Apr 1996.

DILLY, G. F.; YOUNG, C. R.; LANE, W. S.; PANGILINAN, J.; GIRGUIS, P. R. Exploring the limit of metazoan thermal tolerance via comparative proteomics: thermally induced changes in protein abundance by two hydrothermal vent polychaetes. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 279, p. 3347-3356, 2012.

DOS SANTOS, I. R.; SILVA-FILHO, E. V.; SCHAEFER, C.; MARIA SELLA, S.; SILVA, C. A.; GOMES, V.; PASSOS, M. J. D. A. C. R.; VAN NGAN, P. Baseline mercury and zinc concentrations in terrestrial and coastal organisms of Admiralty Bay, Antarctica. **Environmental Pollution**, v. 140, n. 2, p. 304-311, 2006.

DOWLING, V. A.; SHEEHAN, D. Proteomics as a route to identification of toxicity targets in environmental toxicology. **PROTEOMICS**, v. 6, n. 20, p. 5597-5604, 2006.

DUINKER, J.; NOLTING, R.; MICHEL, D. Effects of salinity, pH and redox conditions on the behaviour of Cd, Zn, Ni and Mn in the Scheldt estuary. **Thalassia Jugosl**, v. 18, n. 1-4, p. 191-202, 1982.

DUQUESNE, S.; RIDDLE, M.; SCHULZ, R.; LIESS, M. Effects of contaminants in the Antarctic environment -- potential of the gammarid amphipod crustacean *Paramorea walkeri* as a biological indicator for Antarctic ecosystems based on toxicity and bioaccumulation of copper and cadmium. **Aquatic Toxicology**, v. 49, n. 1-2, p. 131-143, 2000a.

_____. Effects of contaminants in the Antarctic environment - potential of the gammarid amphipod crustacean *Paramorea walkeri* as a biological indicator for Antarctic ecosystems based on toxicity and bioaccumulation of copper and cadmium. **Aquat Toxicol.**, v. 49(1-2), p. 131-143, 2000b.

EKINCI, D.; BEYDEMIR, S.; KUFREVIOGLU, O. I. In vitro inhibitory effects of some heavy metals on human erythrocyte carbonic anhydrases. **J Enzyme Inhib Med Chem**, v. 22, n. 6, p. 745-50, Dec 2007.

ELLIS, R. J.; VAN DER VIES, S. M. Molecular chaperones. **Annual review of biochemistry**, v. 60, n. 1, p. 321-347, 1991.

FEDER, M. E.; HOFMANN, G. E. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. **Annu Rev Physiol**, v. 61, p. 243-82, 1999.

FEDER, M. E.; WALSER, J. C. The biological limitations of transcriptomics in elucidating stress and stress responses. **J Evol Biol**. 2005 Jul;18(4):901-10., 2005.

FIELDS, P. A.; EURICH, C.; GAO, W. L.; CELA, B. Changes in protein expression in the salt marsh mussel *Geukensia demissa*: evidence for a shift from anaerobic to aerobic metabolism during prolonged aerial exposure. **J Exp Biol**, v. 217, n. Pt 9, p. 1601-12, May 1 2014.

FIELDS, P. A.; ZUZOW, M. J.; TOMANEK, L. Comparative proteomics of blue mussel (*Mytilus*) congeners to temperature acclimation. **The Journal of Experimental Biology**, v. 215, p. 1106-1116, 2012.

FINGERMAN, M.; JACKSON, N.; NAGABHUSHANAM, R. Hormonally-regulated functions in crustaceans as biomarkers of environmental pollution. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology**, v. 120, n. 3, p. 343-350, 1998.

FINK, A. L. Chaperone-mediated protein folding. **Physiological reviews**, v. 79, n. 2, p. 425-449, 1999.

FISCHER, E. H. Cellular regulation by protein phosphorylation. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 430, n. 2, p. 865-7, Jan 11 2013.

FITZWATER, S. E.; JOHNSON, K. S.; GORDON, R. M.; COALE, K. H.; SMITH JR, W. O. Trace metal concentrations in the Ross Sea and their relationship with nutrients and phytoplankton growth. **Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography**, v. 47, n. 15, p. 3159-3179, 2000.

GARLAND, M. A.; STILLMAN, J. H.; TOMANEK, L. The proteomic response of cheliped myofibril tissue in the eurythermal porcelain crab, *Petrolisthes cinctipes*, to heat shock following acclimation to daily temperature fluctuations. **Journal of Experimental Biology**, v. 218, p. 388-403, 2015.

GILLIKIN, D. P.; DEHAIRS, F.; BAEYENS, W.; NAVEZ, J.; LORRAIN, A.; ANDRÉ, L. Inter- and intra-annual variations of Pb/Ca ratios in clam shells (*Mercenaria mercenaria*): a record of anthropogenic lead pollution? **Marine Pollution Bulletin**, v. 50, n. 12, p. 1530-1540, 2005.

GO, Y. M.; ORR, M.; JONES, D. P. Actin cytoskeleton redox proteome oxidation by cadmium. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 305, n. 11, p. L831-43, Dec 2013.

GOERING, P. L. Stress Proteins: Molecular biomarkers of chemical exposure and toxicity. **ENVIRONMENTAL SCIENCE RESEARCH**, v. 50, p. 217-228, 1995.

GONZALEZ-RIOPEDRE, M.; NOVAS, A.; DOBANO, E.; RAMOS-MARTINEZ, J. I.; BARCIA, R. Effect of thermal stress on protein expression in the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol**, v. 147, n. 3, p. 531-40, Jul 2007.

GOTZE, S.; MATOO, O. B.; BENIASH, E.; SABOROWSKI, R.; SOKOLOVA, I. M. Interactive effects of CO₂ and trace metals on the proteasome activity and cellular stress response of marine bivalves *Crassostrea virginica* and *Mercenaria mercenaria*. **Aquat Toxicol**, v. 149, p. 65-82, Apr 2014.

GRACEY, A. Y.; COSSINS, A. R. Application of microarray technology in environmental and comparative physiology. **Annu Rev Physiol**. 2003;65:231-59. **Epub 2002 May 1.**, 2003.

GRIFFITHS, J. R. A fresh look at glycogenolysis in skeletal muscle. **Bioscience Reports**, v. 1, p. 595-610, 1981.

GROTTI, M.; SOGGIA, F.; IANNI, C.; FRACHE, R. Trace metals distributions in coastal sea ice of Terra Nova Bay, Ross Sea, Antarctica. **Antarctic Science**, v. 17, n. 02, p. 289-300, 2005.

GUNNING, P.; O'NEILL, G.; HARDEMAN, E. Tropomyosin-based regulation of the actin cytoskeleton in time and space. **Physiol Rev**, v. 88, n. 1, p. 1-35, Jan 2008.

HARIHARAN, G.; PURVAJA, R.; RAMESH, R. Toxic effects of lead on biochemical and histological alterations in green mussel (*Perna viridis*) induced by environmentally relevant concentrations. **J Toxicol Environ Health A**, v. 77, n. 5, p. 246-60, 2014.

HAWES, T. C.; WORLAND, M. R.; BALE, J. S. Freezing in the Antarctic limpet, *Nacella concinna*. **Cryobiology**, v. 61, n. 1, p. 128-132, 2010.

HAWKINS, A. J. S. Protein Turnover: A Functional Appraisal. In: (Ed.). **Functional Ecology**: British Ecological Society v.5, 1991. p.222-233.

HE, S.; PENG, K.; HONG, Y.; WANG, J.; SHENG, J.; GU, Q. Molecular properties and immune defense of two ferritin subunits from freshwater pearl mussel, *Hyriopsis schlegelii*. **Fish Shellfish Immunol**, v. 34, n. 3, p. 865-74, Mar 2013.

HEBEL, D.; JONES, M.; MOATE, R.; DEPLEDGE, M. Differing sensitivities of respiratory and osmoregulatory gill tissue of *Carcinus maenas* (Crustacea: Decapoda) to water-borne copper. **Marine Biology**, v. 133, n. 4, p. 675-681, 1999.

HENDRY, K. R.; RICKABY, R. E. M.; DE HOOG, J. C. M.; WESTON, K.; REHKAMPER, M. Cadmium and phosphate in coastal Antarctic seawater : implications for Southern Ocean nutrient cycling. **Marine Chemistry** v. 112, p. 149-157, 2008.

HENRY, R. P. Multiple functions of carbonic anhydrase in the crustacean gill. **Journal of Experimental Zoology**, v. 248, n. 1, p. 19-24, 1988.

HENRY, R. P.; KORMANIK, G. A. Carbonic anhydrase activity and calcium deposition during the molt cycle of the blue crab *Callinectes sapidus*. **Journal of crustacean biology**, v. 5, n. 2, p. 234-241, 1985.

HILL, N. A.; KING, C. K.; PERRETT, L. A.; JOHNSTON, E. L. CONTAMINATED SUSPENDED SEDIMENTS TOXIC TO AN ANTARCTIC FILTER FEEDER: AQUEOUS- AND PARTICULATE-PHASE EFFECTS. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 28, n. 2, p. 409-417, Feb 2009a.

HILL, N. A.; KING, C. K.; PERRETT, L. A.; JOHNSTON, E. L. Contaminated suspended sediments toxic to an Antarctic filter feeder: aqueous- and particulate-phase effects. **Environ Toxicol Chem**, v. 28, n. 2, p. 409-17, Feb 2009b.

HINDELL, M. A.; BROTHERS, N.; GALES, R. Mercury and cadmium concentrations in the tissues of three species of southern albatrosses. **Polar Biology**, v. 22, n. 2, p. 102-108, 1999.

HOCHACHKA, P. W.; SOMERO, G. N. **Biochemical adaptation: Mechanism and process in physiological evolution** 1 edition. New York: Oxford University Press, 2002. 480 ISBN 978-0195117035.

HOFFMANN, L. J.; BREITBARTH, E.; BOYD, P. W.; HUNTER, K. A. Influence of ocean warming and acidification on trace metal biogeochemistry. **Marine Ecology Progress Series**, v. 470, p. 191-205, December 06, 2012 2012.

HOLEMANN, J. A.; SCHIRMACHER, M.; KASSENS, H.; PRANGE, A. Geochemistry of Surficial and Ice-rafted Sediments from the Laptev Sea (Siberia). **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 49, n. 1, p. 45-59, 1999.

HOOPER, S. L.; HOBBS, K. H.; THUMA, J. B. Invertebrate muscles: thin and thick filament structure; molecular basis of contraction and its regulation, catch and asynchronous muscle. **Prog Neurobiol**, v. 86, n. 2, p. 72-127, Oct 2008.

HOPPE, A. D.; SWANSON, J. A. Cdc42, Rac1, and Rac2 display distinct patterns of activation during phagocytosis. **Mol Biol Cell**, v. 15, n. 8, p. 3509-19, Aug 2004.

HUMBERT, A. Cryospheric science: Vulnerable ice in the Weddell Sea. **Nature Geosci**, v. 5, n. 6, p. 370-371, 2012.

HURD, T. R.; COLLINS, Y.; ABAKUMOVA, I.; CHOUCANI, E. T.; BARANOWSKI, B.; FEARNLEY, I. M.; PRIME, T. A.; MURPHY, M. P.; JAMES, A. M. Inactivation of Pyruvate Dehydrogenase Kinase 2 by Mitochondrial Reactive Oxygen Species. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 42, p. 35153-35160, October 12, 2012 2012.

HURD, T. R.; PRIME, T. A.; HARBOUR, M. E.; LILLEY, K. S.; MURPHY, M. P. Detection of Reactive Oxygen Species-sensitive Thiol Proteins by Redox Difference Gel Electrophoresis: IMPLICATIONS FOR MITOCHONDRIAL REDOX SIGNALING.

Journal of Biological Chemistry, v. 282, n. 30, p. 22040-22051, July 27, 2007 2007.

HUSMANN, G.; ABELE, D.; MONIEN, D.; MONIEN, P.; KRIEWS, M.; PHILIPP, E. E. R. The influence of sedimentation on metal accumulation and cellular oxidative stress markers in the Antarctic bivalve *Laternula elliptica*. **Estuarine Coastal and Shelf Science**, v. 111, p. 48-59, Oct 2012.

IMLAY, J. A. PATHWAYS OF OXIDATIVE DAMAGE. **Annual Review of Microbiology**, v. 57, n. 1, p. 395-418, 2003.

ISANI, G.; CATTANI, O.; CARPENÄ©, E.; TACCONI, S.; CORTESI, P. Energy metabolism during anaerobiosis and recovery in the posterior adductor muscle of the bivalve *Scapharca inaequalvis* (Bruguiere). **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 93, n. 1, p. 193-200, 1989.

IVANINA, A. V.; SOKOLOVA, I. M. Effects of cadmium exposure on expression and activity of P-glycoprotein in eastern oysters, *Crassostrea virginica* Gmelin. **Aquat Toxicol**, v. 88, n. 1, p. 19-28, Jun 2 2008.

IVANINA, A. V.; TAYLOR, C.; SOKOLOVA, I. M. Effects of elevated temperature and cadmium exposure on stress protein response in eastern oysters *Crassostrea virginica* (Gmelin). **Aquat Toxicol**, v. 91, n. 3, p. 245-54, Feb 19 2009.

JARVIS, R. M.; HUGHES, S. M.; LEDGERWOOD, E. C. Peroxiredoxin 1 functions as a signal peroxidase to receive, transduce, and transmit peroxide signals in mammalian cells. **Free Radic Biol Med**, v. 53, n. 7, p. 1522-30, Oct 1 2012.

JEONG, W.-G.; CHO, S.-M. Long-term effect of polycyclic aromatic hydrocarbon on physiological metabolisms of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. **Aquaculture**, v. 265, n. 1-4, p. 343-350, 2007.

JICKELLS, T. D.; AN, Z. S.; ANDERSEN, K. K.; BAKER, A. R.; BERGAMETTI, G.; BROOKS, N.; CAO, J. J.; BOYD, P. W.; DUCE, R. A.; HUNTER, K. A.; KAWAHATA, H.; KUBILAY, N.; LAROCHE, J.; LISS, P. S.; MAHOWALD, N.; PROSPERO, J. M.; RIDGWELL, A. J.; TEGEN, I.; TORRES, R. Global Iron Connections Between Desert Dust, Ocean Biogeochemistry, and Climate. **Science**, v. 308, n. 5718, p. 67-71, April 1, 2005 2005.

JIN, Q.-X.; YIN, S.-J.; WANG, W.; WANG, Z.-J.; YANG, J.-M.; QIAN, G.-Y.; SI, Y.-X.; PARK, Y.-D. The effect of Zn²⁺ on *Euphausia superba* arginine kinase: Unfolding and aggregation studies. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 5, p. 821-829, 5// 2014.

JOEST, C.; ZAUKE, G. P. Trace metal concentrations in Antarctic sea spiders (Pycnogonida, Pantopoda). **Marine Pollution Bulletin**, v. 56, n. 8, p. 1396-1399, August 2008.

JOO, W. A.; KANG, M. J.; SON, W. K.; LEE, H. J.; LEE, D. Y.; LEE, E.; KIM, C. W. Monitoring protein expression by proteomics: human plasma exposed to benzene. **PROTEOMICS**, v. 3, n. 12, p. 2402-2411, 2003.

KAKKAR, P.; SINGH, B. K. Mitochondria: a hub of redox activities and cellular distress control. **Mol Cell Biochem**, v. 305, n. 1-2, p. 235-53, Nov 2007.

KAMMENGA, J.; ARTS, M.; OUDE-BREUIL, W. HSP60 as a potential biomarker of toxic stress in the nematode *Plectus acuminatus*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 34, n. 3, p. 253-258, 1998.

KARAGOUNIS, L. G.; HAWLEY, J. A. The 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase: regulating the ebb and flow of cellular energetics. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 41, n. 12, p. 2360-3, Dec 2009.

KASPERCZYK, A.; DOBRAKOWSKI, M.; OSTALOWSKA, A.; ZALEJSKA-FIOLKA, J.; BIRKNER, E. The metabolism of carbohydrates and lipid peroxidation in lead-exposed workers. **Toxicol Ind Health**, Jul 5 2013.

KASSAHN, K. S.; CROZIER, R. H.; PÖRTNER, H. O.; CALEY, M. J. Animal performance and stress: responses and tolerance limits at different levels of biological organisation. **Biological Reviews**, v. 84, n. 2, p. 277-292, 2009.

KIM, J.-W.; TCHERNYSHYOV, I.; SEMENZA, G. L.; DANG, C. V. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: A metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. **Cell Metabolism**, v. 3, n. 3, p. 177-185, 3// 2006.

KIRKEGAARD, T.; ROTH, A. G.; PETERSEN, N. H.; MAHALKA, A. K.; OLSEN, O. D.; MOILANEN, I.; ZYLICZ, A.; KNUDSEN, J.; SANDHOFF, K.; ARENZ, C.; KINNUNEN, P. K.; NYLANDSTED, J.; JAATTELA, M. Hsp70 stabilizes lysosomes and reverts Niemann-Pick disease-associated lysosomal pathology. **Nature**, v. 463, n. 7280, p. 549-53, Jan 28 2010.

KNOWLES, J. R. Enzyme catalysis: not different, just better. 1991.

KOZMA, R.; AHMED, S.; BEST, A.; LIM, L. The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts. **Molecular and cellular biology**, v. 15, n. 4, p. 1942-1952, 1995.

KULTZ, D. Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response. In: (Ed.). **Annual Review of Physiology**. Palo Alto: Annual Reviews, v.67, 2005. p.225-257. (Annual Review of Physiology). ISBN 0066-4278 978-0-8243-0367-9.

KUROCHKIN, I. O.; IVANINA, A. V.; EILERS, S.; DOWNS, C. A.; MAY, L. A.; SOKOLOVA, I. M. Cadmium affects metabolic responses to prolonged anoxia and reoxygenation in eastern oysters (*Crassostrea virginica*). **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 297, n. 5, p. R1262-72, Nov 2009.

LAËS, A.; BLAIN, S.; LAAN, P.; USSHER, S.; ACHTERBERG, E.; TREGUER, P.; DE BAAR, H. J. W. Sources and transport of dissolved iron and manganese along the continental margin of the Bay of Biscay. **Biogeosciences**, v. 4, p. 181-194, 2007.

LANNIG, G.; CHERKASOV, A. S.; SOKOLOVA, I. M. Temperature-dependent effects of cadmium on mitochondrial and whole-organism bioenergetics of oysters (*Crassostrea virginica*). **Mar Environ Res**, v. 62 Suppl, p. S79-82, Jul 2006a.

LANNIG, G.; FLORES, J. F.; SOKOLOVA, I. M. Temperature-dependent stress response in oysters, *Crassostrea virginica*: pollution reduces temperature tolerance in oysters. **Aquat Toxicol**, v. 79, n. 3, p. 278-87, Sep 12 2006b.

LANNUZEL, D.; BOWIE, A. R.; VAN DER MERWE, P. C.; TOWNSEND, A. T.; SCHOEMANN, V. R. Distribution of dissolved and particulate metals in Antarctic sea ice. **Marine Chemistry**, v. 124, n. 1-4, p. 134-146, 2011.

LEE, S. H.; DOMINGUEZ, R. Regulation of actin cytoskeleton dynamics in cells. **Mol Cells**, Mar 9 2010.

LEFCORT, H.; FREEDMAN, Z.; HOUSE, S.; PENDLETON, M. Hormetic effects of heavy metals in aquatic snails: is a little bit of pollution good? **Ecohealth**, v. 5, n. 1, p. 10-7, Mar 2008.

LEMOS, M. F.; SOARES, A. M.; CORREIA, A. C.; ESTEVES, A. C. Proteins in ecotoxicology - how, why and why not? **PROTEOMICS**, v. 10, n. 4, p. 873-87, Feb 2009.

LI, C.; LI, Z.; LI, Y.; ZHOU, J.; ZHANG, C.; SU, X.; LI, T. A ferritin from *Dendrorhynchus zhejiangensis* with heavy metals detoxification activity. **PLoS One**, v. 7, n. 12, p. e51428, 2012.

LILIOM, K.; WÁGNER, G.; PÁCZ, A.; CASCANTE, M.; KOVÁCS, J.; OVÁDI, J. Organization-dependent effects of toxic bivalent ions. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 15, p. 4731-4739, 2000.

LIN, H.; RAUSCHENBERG, S.; HEXEL, C. R.; SHAW, T. J.; TWINING, B. S. Free-drifting icebergs as sources of iron to the Weddell Sea. **Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography**, v. 58, n. 11-12, p. 1392-1406, 2011.

LIN, S.-J.; FORD, E.; HAIGIS, M.; LISZT, G.; GUARENTE, L. Calorie restriction extends yeast life span by lowering the level of NADH. **Genes & Development**, v. 18, n. 1, p. 12-16, January 1, 2004 2004.

LINDQUIST, S.; CRAIG, E. The heat-shock proteins. **Annual review of genetics**, v. 22, n. 1, p. 631-677, 1988.

LIONETTO, M. G.; CARICATO, R.; GIORDANO, M. E.; SCHETTINO, E. E. A. T. **Carbonic Anhydrase and Heavy Metals, Biochemistry**. InTech, 2012. ISBN 978-953-51-0076-8. Disponível em: <

<http://www.intechopen.com/books/biochemistry/carbonic-anhydrase-and-heavy-metals> >.

LIONETTO, M. G.; GIORDANO, M. E.; VILELLA, S.; SCHETTINO, T. Inhibition of eel enzymatic activities by cadmium. **Aquat Toxicol**, v. 48, n. 4, p. 561-571, Apr 1 2000.

LIU, F.; WANG, W. X. Proteome pattern in oysters as a diagnostic tool for metal pollution. **J Hazard Mater**, v. 239-240, p. 241-8, Nov 15 2012.

LIU, H.; BOWES, R. C., 3RD; VAN DE WATER, B.; SILLENCE, C.; NAGELKERKE, J. F.; STEVENS, J. L. Endoplasmic reticulum chaperones GRP78 and calreticulin prevent oxidative stress, Ca²⁺ disturbances, and cell death in renal epithelial cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 35, p. 21751-9, Aug 29 1997.

LIU, W. F.; HAN, F.; ZHANG, X. B. Ran GTPase Regulates Hemocytic Phagocytosis of Shrimp by Interaction with Myosin. **Journal of Proteome Research**, v. 8, n. 3, p. 1198-1206, Mar 2009.

LOPEZ, M. F. Better approaches to finding the needle in a haystack: optimizing proteome analysis through automation. **Electrophoresis**, v. 21, n. 6, p. 1082-93, Apr 2000.

LUO, L. Z.; KE, C. H.; GUO, X. Y.; SHI, B.; HUANG, M. Q. Metal accumulation and differentially expressed proteins in gill of oyster (*Crassostrea hongkongensis*) exposed to long-term heavy metal-contaminated estuary. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 38, n. 2, p. 318-329, Jun 2014.

LUQUE-GARCIA, J. L.; CABEZAS-SANCHEZ, P.; CAMARA, C. Proteomics as a tool for examining the toxicity of heavy metals. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, n. 5, p. 703-716, 2011.

MACKENZIE, E. L.; IWASAKI, K.; TSUJI, Y. Intracellular iron transport and storage: from molecular mechanisms to health implications. **Antioxid Redox Signal**, v. 10, n. 6, p. 997-1030, Jun 2008.

MAILLOUX, R. J.; MCBRIDE, S. L.; HARPER, M. E. Unearthing the secrets of mitochondrial ROS and glutathione in bioenergetics. **Trends Biochem Sci**, v. 38, n. 12, p. 592-602, Dec 2013.

MAJER, A. P.; PETTI, M. A. V.; CORBISIER, T. N.; RIBEIRO, A. P.; THEOPHILO, C. Y. S.; FERREIRA, P. A. D.; FIGUEIRA, R. C. L. Bioaccumulation of potentially toxic trace elements in benthic organisms of Admiralty Bay (King George Island, Antarctica). **Marine Pollution Bulletin**, v. 79, n. 1-2, p. 321-325, Feb 2014.

MALANGA, G.; ESTEVEZ, M. S.; CALVO, J.; ABELE, D.; PUNTARULO, S. Oxidative stress in gills of limpets from the Beagle Channel: comparison with limpets from the Antarctic. **Scientia Marina**, v. 69, p. 297-304, Dec 2005.

MALANGA, G.; ESTEVEZ, M. S.; CALVO, J.; ABELE, D.; PUNTARULO, S. The effect of seasonality on oxidative metabolism in *Nacella* (*Patinigera*) *magellanica*. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 146, n. 4, p. 551-558, 2007.

MANDUZIO, H.; COSETTE, P.; GRICOURT, L.; JOUENNE, T.; LENZ, C.; ANDERSEN, O.-K.; LÉBOULENGER, F.; ROCHER, B. Proteome modifications of blue mussel (*Mytilus edulis* L.) gills as an effect of water pollution. **PROTEOMICS**, v. 5, n. 18, p. 4958-4963, 2005.

MANN, M.; HENDRICKSON, R. C.; PANDEY, A. Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. **Annu Rev Biochem.** 2001;**70:437-73.**, 2001.

MARKS, F.; KLINGMÜLLER, U.; MÜLLER-DECKER, K. **Cellular signal processing: An introduction to the molecular mechanisms of signal transduction.** New York: Garland Science, Taylor and Francis Group 2009. 634

MARRQUEZ, M.; VODOPIVEZ, C.; CASAUX, R.; CURTOSI, A. Metal (Fe, Zn, Mn and Cu) levels in the Antarctic fish *Notothenia coriiceps*. **Polar Biology**, v. 20, n. 6, p. 404-408, 1998.

MARSLAND, S. J.; CHURCH, J. A.; BINDOFF, N. L.; WILLIAMS, G. D. Antarctic coastal polynya response to climate change. **Journal of Geophysical Research: Oceans**, v. 112, n. C7, p. C07009, 2007.

MARTIN, S. A. M.; VILHELMSSON, O.; MÉDALE, F.; WATT, P.; KAUSHIK, S.; HOULIHAN, D. F. Proteomic sensitivity to dietary manipulations in rainbow trout. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics**, v. 1651, n. 1-2, p. 17-29, 2003.

MCCARTHY, J. F.; SHUGART, L. R. **Biomarkers of environmental contamination.** 1990. Medium: X; Size: Pages: (457 p)

MCDONAGH, B.; TYTHER, R.; SHEEHAN, D. Carbonylation and glutathionylation of proteins in the blue mussel *Mytilus edulis* detected by proteomic analysis and Western blotting: Actin as a target for oxidative stress. **Aquatic Toxicology**, v. 73, n. 3, p. 315-326, 7/1/ 2005.

MCDONAGH, B.; TYTHER, R.; SHEEHAN, D. Redox proteomics in the mussel, *Mytilus edulis*. **Mar Environ Res**, v. 62 Suppl, p. S101-4, Jul 2006.

MEASURES, C. I. The role of entrained sediments in sea ice in the distribution of aluminium and iron in the surface waters of the Arctic Ocean. **Marine Chemistry**, v. 68, n. 1-2, p. 59-70, 1999.

MEDLER, S.; LILLEY, T.; MYKLES, D. L. Fiber polymorphism in skeletal muscles of the American lobster, *Homarus americanus*: continuum between slow-twitch (S1) and slow-tonic (S2) fibers. **J Exp Biol**, v. 207, n. Pt 16, p. 2755-67, Jul 2004.

METCHEVA, R.; YURUKOVA, L.; BEZRUKOV, V.; BELTCHEVA, M.; YANKOV, Y.; DIMITROV, K. Trace and toxic elements accumulation in food chain representatives at Livingston Island (Antarctica). **International Journal of Biology**, v. 2, n. 1, p. 155-160, January 2010.

MEYERHOF, O.; BECK, L. V. Triose phosphate isomerase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 156, n. 1, p. 109-120, 1944.

MICHAL, G.; SCHOMBURG, D. **Biochemical pathways: an atlas of biochemistry and molecular biology**. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2012. 398

MINARIK, P.; TOMASKOVA, N.; KOLLAROVA, M.; ANTALIK, M. Malate dehydrogenases--structure and function. **Gen Physiol Biophys**, v. 21, n. 3, p. 257-65, Sep 2002.

MIREJI, P. O.; KEATING, J.; HASSANALI, A.; IMPOINVIL, D. E.; MBOGO, C. M.; MUTURI, M. N.; NYAMBAKA, H.; KENYA, E. U.; GITHURE, J. I.; BEIER, J. C. Expression of metallothionein and alpha-tubulin in heavy metal-tolerant *Anopheles gambiae sensu stricto* (Diptera: Culicidae). **Ecotoxicol Environ Saf**, v. 73, n. 1, p. 46-50, Jan 2010.

MOLLEREAU, B.; MANIE, S.; NAPOLETANO, F. Getting the better of ER stress. **J Cell Commun Signal**, v. 8, n. 4, p. 311-21, Dec 2014.

MORIMOTO, R. I.; SELKOE, D. J.; KELLEY, J. W., Eds. **Protein Homeostasis**. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, p.349, Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. 2012.

MORLEY, S. A.; LAI, C.-H.; CLARKE, A.; TAN, K. S.; THORNE, M. A. S.; PECK, L. S. Limpet feeding rate and the consistency of physiological response to temperature. **Journal of Comparative Physiology B-Biochemical Systemic and Environmental Physiology**, v. 184, n. 5, p. 563-570, Jul 2014.

MORRIS, A. The chemistry of the Severn Estuary and the Bristol Channel. **Marine pollution bulletin**, v. 15, n. 2, p. 57-61, 1984.

MOSTAFALOU, S.; BAEERI, M.; BAHADAR, H.; SOLTANY-REZAEI-RAD, M.; GHOLAMI, M.; ABDOLLAHI, M. Molecular mechanisms involved in lead induced disruption of hepatic and pancreatic glucose metabolism. **Environ Toxicol Pharmacol**, v. 39, n. 1, p. 16-26, Jan 2015.

MURALIDHARAN, S.; THOMPSON, E.; RAFTOS, D.; BIRCH, G.; HAYNES, P. A. Quantitative proteomics of heavy metal stress responses in Sydney rock oysters. **PROTEOMICS**, v. 12, n. 6, p. 906-21, Mar 2012.

MURPHY, M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species. **Biochemical Journal**, v. 417, n. 1, p. 1-13, Jan 1 2009.

_____. Mitochondrial thiols in antioxidant protection and redox signaling: distinct roles for glutathionylation and other thiol modifications. **Antioxid Redox Signal**, v. 16, n. 6, p. 476-95, Mar 15 2012.

NAJLE, R.; ELISSONDO, M.; GENTILE, S.; GENTILE, M.; VACAREZZA, G.; SOLANA, H. Histopathology of the digestive gland of an Antarctic limpet exposed to

cadmium. **The Science of The Total Environment**, v. 247, n. 2-3, p. 263-268, 2000.

NANDI, D.; TAHILIANI, P.; KUMAR, A.; CHANDU, D. The ubiquitin-proteasome system. **Journal of biosciences**, v. 31, n. 1, p. 137-155, 2006.

NEDZAREK, A.; TORZ, A.; DROST, A. Selected elements in surface waters of Antarctica and their relations with the natural environment. **Polar Research**, v. 33, p. 10, 2014.

NESATYY, V. J.; SUTER, M. J. F. Proteomics for the Analysis of Environmental Stress Responses in Organisms. **Environmental Science & Technology**, v. 41, n. 20, p. 6891-6900, 2013/04/05 2007.

NESVIZHSKII, A. I.; VITEK, O.; AEBERSOLD, R. Analysis and validation of proteomic data generated by tandem mass spectrometry. **Nat Meth**, v. 4, n. 10, p. 787-797, 2007.

NOBES, C. D.; HALL, A. Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. **Cell**, v. 81, n. 1, p. 53-62, 1995.

NOVER, L. **Heat shock response**. CRC Press, 1991. ISBN 0849349125.

NRIAGU, J. O. A global assessment of natural sources of atmospheric trace metals. **Nature**, v. 338, n. 6210, p. 47-49, 1989.

NRIAGU, J. O.; PACYNA, J. M. Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. **Nature**, v. 333, n. 6169, p. 134-139, 1988.

NYSTRÖM, T. Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. **The EMBO Journal**, v. 24, n. 7, p. 1311-1317, 03/03 12/08/received 02/04/accepted 2005.

OBERMUELLER, B. E.; MORLEY, S. A.; CLARK, M. S.; BARNES, D. K. A.; PECK, L. S. Antarctic intertidal limpet ecophysiology: A winter-summer comparison. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 403, n. 1-2, p. 39-45, Jul 15 2011.

OEHLMANN, J.; SCHULTE-OEHLMANN, U.; B.A. MARKERT, A. M. B.; ZECHMEISTER, H. G. Chapter 17 Molluscs as bioindicators. In: (Ed.). **Trace Metals and other Contaminants in the Environment**: Elsevier, v. Volume 6, 2003. p.577-635. ISBN 1875-1121.

OLANOW, C. W. The pathogenesis of cell death in Parkinson's disease—2007. **Movement Disorders**, v. 22, n. S17, p. S335-S342, 2007.

OLGUN, N.; DUGGEN, S.; CROOT, P. L.; DELMELLE, P.; DIETZE, H.; SCHACHT, U.; ÓSKARSSON, N.; SIEBE, C.; AUER, A.; GARBE-SCHÖNBERG, D. Surface

ocean iron fertilization: The role of airborne volcanic ash from subduction zone and hot spot volcanoes and related iron fluxes into the Pacific Ocean. **Global Biogeochemical Cycles**, v. 25, n. 4, p. GB4001, 2011.

ONG, S. T.; HO, J. Z.; HO, B.; DING, J. L. Iron-withholding strategy in innate immunity. **Immunobiology**, v. 211, n. 4, p. 295-314, 2006.

PARSELL, D.; LINDQUIST, S. The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. **Annual review of genetics**, v. 27, n. 1, p. 437-496, 1993.

PEROVICH, D. K.; RICHTER-MENGE, J. A. Loss of Sea Ice in the Arctic. **Annual Review of Marine Science**, v. 1, n. 1, p. 417-441, 2009.

PETRAK, J.; IVANEK, R.; TOMAN, O.; CMEJLA, R.; CMEJLOVA, J.; VYORAL, D.; ZIVNY, J.; VULPE, C. D. Deja vu in proteomics. A hit parade of repeatedly identified differentially expressed proteins. **PROTEOMICS**, v. 8, n. 9, p. 1744-9, May 2008.

PIANO, A.; VALBONESI, P.; FABBRI, E. Expression of cytoprotective proteins, heat shock protein 70 and metallothioneins, in tissues of *Ostrea edulis* exposed to heat and heavy metals. **Cell Stress Chaperones**, v. 9, n. 2, p. 134-42, Summer 2004.

PLANCHON, F. A. M.; VAN DE VELDE, K.; ROSMAN, K. J. R.; WOLFF, E. W.; FERRARI, C. P.; BOUTRON, C. F. One hundred fifty-year record of lead isotopes in Antarctic snow from Coats Land. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 67, n. 4, p. 693-708, 2/15/ 2003.

PLANCHON, F. D. R. A. M.; BOUTRON, C. F.; BARBANTE, C.; COZZI, G.; GASPARI, V.; WOLFF, E. W.; FERRARI, C. P.; CESCONE, P. Changes in heavy metals in Antarctic snow from Coats Land since the mid-19th to the late-20th century. **Earth and Planetary Science Letters**, v. 200, n. 1-2, p. 207-222, 2002.

PLEIL, J. D.; STIEGEL, M. A.; MADDEN, M. C.; SOBUS, J. R. Heat map visualization of complex environmental and biomarker measurements. **Chemosphere**, v. 84, n. 5, p. 716-23, Jul 2011.

POLLARD, T. D.; COOPER, J. A. Actin and actin-binding proteins. A critical evaluation of mechanisms and functions. **Annu Rev Biochem**, v. 55, p. 987-1035, 1986.

QIU, G. F.; ZHENG, L.; LIU, P. Transcriptional regulation of ferritin mRNA levels by iron in the freshwater giant prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol**, v. 150, n. 3, p. 320-5, Jul 2008.

RAINBOW, P.; BLACK, W. Cadmium, zinc and the uptake of calcium by two crabs, *Carcinus maenas* and *Eriocheir sinensis*. **Aquatic toxicology**, v. 72, n. 1, p. 45-65, 2005.

RAMAN, B.; CHEUNG, A.; MARTEN, M. R. Quantitative comparison and evaluation of two commercially available, two-dimensional electrophoresis image analysis

software packages, Z3 and Melanie. **Electrophoresis**, v. 23, n. 14, p. 2194-202, Jul 2002.

RAO, P. K.; RODRIGUEZ, G. M.; SMITH, I.; LI, Q. Protein dynamics in iron-starved *Mycobacterium tuberculosis* revealed by turnover and abundance measurement using hybrid-linear ion trap-Fourier transform mass spectrometry. **Anal Chem.** 2008 Sep 15;80(18):6860-9. doi: 10.1021/ac800288t. Epub 2008 Aug 9., 2008.

RAVANELLI, M.; TUBERTINI, O.; VALCHER, S.; MARTINOTTI, W. Heavy metal distribution in sediment cores from Western Ross Sea (Antarctica). **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 99, n. 1, p. 697-704, 1997.

REGOLI, F. Total oxyradical scavenging capacity (TOSC) in polluted and translocated mussels: a predictive biomarker of oxidative stress. **Aquat Toxicol**, v. 50, n. 4, p. 351-361, Oct 1 2000.

RIBEIRO, A. P.; FIGUEIRA, R. C. L.; MARTINS, C. C.; SILVA, C. R. A.; FRANÇA, E. J.; BÍCEGO, M. C.; MAHIQUES, M. M.; MONTONE, R. C. Arsenic and trace metal contents in sediment profiles from the Admiralty Bay, King George Island, Antarctica. **Marine Pollution Bulletin**, v. 62, n. 1, p. 192-196, 2011.

RIDLEY, A. J.; PATERSON, H. F.; JOHNSTON, C. L.; DIEKMANN, D.; HALL, A. The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. **Cell**, v. 70, n. 3, p. 401-410, 1992.

ROBERTO, C.; GIULIA, L. M.; FRANCESCO, D.; ALDO, V.; TRIFONE, S. Carbonic anhydrase activity in *Mytilus galloprovincialis* digestive gland: Sensitivity to heavy metal exposure. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 152, n. 3, p. 241-247, 9// 2010.

RODRIGUEZ-ORTEGA, M. J.; GROSVIK, B. E.; RODRIGUEZ-ARIZA, A.; GOKSOYR, A.; LOPEZ-BAREA, J. Changes in protein expression profiles in bivalve molluscs (*Chamaelea gallina*) exposed to four model environmental pollutants. **PROTEOMICS**, v. 3, n. 8, p. 1535-43, Aug 2003.

RODRÍGUEZ, E. M.; MEDESANI, D. A.; FINGERMAN, M. Endocrine disruption in crustaceans due to pollutants: a review. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 146, n. 4, p. 661-671, 2007.

ROGELJ, J.; MEINSHAUSEN, M.; KNUTTI, R. Global warming under old and new scenarios using IPCC climate sensitivity range estimates. **Nature Clim. Change**, v. 2, n. 4, p. 248-253, 2012.

ROTHMAN, J. E. Polypeptide chain binding proteins: Catalysts of protein folding and related processes in cells. **Cell**, v. 59, n. 4, p. 591-601, 11/17/ 1989.

ROZENBLUM, G. T.; GIMONA, M. Calponins: adaptable modular regulators of the actin cytoskeleton. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 40, n. 10, p. 1990-5, 2008.

SABATINI, S. E.; CHAUFAN, G.; JUÁREZ, Á. B.; COALOVA, I.; BIANCHI, L.; EPPIS, M. R.; DE MOLINA, M. D. C. R. Dietary copper effects in the estuarine crab, *Neohelice (Chasmagnathus) granulata*, maintained at two different salinities. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 150, n. 4, p. 521-527, 2009.

SALWAY, J. G. **Metabolism at a Glance**. 3rd Oxford: Blackwell Publishing Ltd., 2004. 125

SANCHEZ-HERNANDEZ, J. C. Trace element contamination in Antarctic ecosystems. **Rev Environ Contam Toxicol**, v. 166, p. 83-127, 2000.

SANDER, S. G.; KOSCHINSKY, A. Metal flux from hydrothermal vents increased by organic complexation. **Nature Geosci**, v. 4, n. 3, p. 145-150, 2011.

SANDERS, B. M. Stress proteins in aquatic organisms: an environmental perspective. **Crit Rev Toxicol**, v. 23, n. 1, p. 49-75, 1993.

SANDERS, B. M.; DYER, S. D. Cellular stress response. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 13, n. 8, p. 1209-1210, 1994.

SANDERS, B. M.; MARTIN, L. S.; NELSON, W. G.; PHELPS, D. K.; WELCH, W. Relationships between accumulation of a 60 kDa stress protein and scope-for-growth in *Mytilus edulis* exposed to a range of copper concentrations. **Marine Environmental Research**, v. 31, n. 2, p. 81-97, 1991.

SAÑUDO-WILHELMY, S. A.; OLSEN, K. A.; SCELFO, J. M.; FOSTER, T. D.; FLEGAL, A. R. Trace metal distributions off the Antarctic Peninsula in the Weddell Sea. **Marine Chemistry**, v. 77, p. 157-170, 2002a.

_____. Trace metal distributions off the Antarctic Peninsula in the Weddell Sea. **Marine Chemistry**, v. 77, n. 2-3, p. 157-170, 2002b.

SCHAREK, R.; VAN LEEUWE, M. A.; DE BAAR, H. J. W. Responses of Southern Ocean phytoplankton to the addition of trace metals. **Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography**, v. 44, n. 1-2, p. 209-227, 1997.

SCHMIDT-NIELSEN, K. **Animal Physiology: Adaptation and Environment**. Cambridge University Press, 1997. ISBN 9780521570985. Disponível em: < <https://books.google.com.br/books?id=Af7lwQWJoCMC> >.

SEDWICK, P. N.; SHOLKOVITZ, E. R.; CHURCH, T. M. Impact of anthropogenic combustion emissions on the fractional solubility of aerosol iron: Evidence from the Sargasso Sea. **Geochemistry, Geophysics, Geosystems**, v. 8, n. 10, p. Q10Q06, 2007.

SERAFINI, L.; HANN, J. B.; KÄLTZ, D.; TOMANEK, L. The proteomic response of sea squirts (genus *Ciona*) to acute heat stress: A global perspective on the thermal stability of proteins. **Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics**, v. 6, n. 3, p. 322-334, 2010.

SERAFINI, L.; HANN, J. B.; KÜLTZ, D.; TOMANEK, L. The proteomic response of sea squirts (genus *Ciona*) to acute heat stress: A global perspective on the thermal stability of proteins. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part D**, v. 6, p. 322-334, 2011.

SHEEHAN, D.; POWER, A. Effects of seasonality on xenobiotic and antioxidant defence mechanisms of bivalve molluscs. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology**, v. 123, n. 3, p. 193-199, 1999.

SHEIKH, M. S.; FORNACE, A. J. Regulation of translation initiation following stress. **Oncogene**, v. 18, n. 45, p. 6121-6128, 1999/11// 1999.

SHI, X.; WANG, L.; ZHOU, Z.; YANG, C.; GAO, Y.; WANG, L.; SONG, L. The arginine kinase in Zhikong scallop *Chlamys farreri* is involved in immunomodulation. **Dev Comp Immunol**, v. 37, n. 2, p. 270-8, Jun 2012.

SHOLKOVITZ, E. R.; SEDWICK, P. N.; CHURCH, T. M. Influence of anthropogenic combustion emissions on the deposition of soluble aerosol iron to the ocean: Empirical estimates for island sites in the North Atlantic. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 73, n. 14, p. 3981-4003, 2009.

SI, Y.-X.; SONG, J.-J.; FANG, N.-Y.; WANG, W.; WANG, Z.-J.; YANG, J.-M.; QIAN, G.-Y.; YIN, S.-J.; PARK, Y.-D. Purification, characterization, and unfolding studies of arginine kinase from Antarctic krill. **International Journal of Biological Macromolecules**, n. 0, 2014.

SKAGGS, H. S.; HENRY, R. P. Inhibition of carbonic anhydrase in the gills of two euryhaline crabs, *Callinectes sapidus* and *Carcinus maenas*, by heavy metals. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 133, n. 4, p. 605-612, 2002a.

SKAGGS, H. S.; HENRY, R. P. Inhibition of carbonic anhydrase in the gills of two euryhaline crabs, *Callinectes sapidus* and *Carcinus maenas*, by heavy metals. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, v. 133, n. 4, p. 605-12, Dec 2002b.

SMITAL, T.; KURELEC, B. The chemosensitizers of multixenobiotic resistance mechanism in aquatic invertebrates: a new class of pollutants. **Mutat Res**, v. 399, n. 1, p. 43-53, Mar 13 1998.

SMITH, M. A.; HOFFMAN, L. M.; BECKERLE, M. C. LIM proteins in actin cytoskeleton mechanoreponse. **Trends Cell Biol**, v. 24, n. 10, p. 575-83, Oct 2014.

SOKOLOVA, I. M.; BOCK, C.; PORTNER, H. O. Resistance to freshwater exposure in White Sea *Littorina* spp. I: Anaerobic metabolism and energetics. **J Comp Physiol B**, v. 170, n. 2, p. 91-103, Mar 2000.

SOKOLOVA, I. M.; FREDERICH, M.; BAGWE, R.; LANNIG, G.; SUKHOTIN, A. A. Energy homeostasis as an integrative tool for assessing limits of environmental

stress tolerance in aquatic invertebrates. **Mar Environ Res**, v. 79, p. 1-15, Aug 2012.

SOKOLOVA, I. M.; LANNIG, G. Interactive effects of metal pollution and temperature on metabolism in aquatic ectotherms: implications of global climate change. **Climate Research**, v. 37, n. 2-3, p. 181-201, October 16, 2008 2008.

SON, J.; LEE, S. E.; PARK, B. S.; JUNG, J.; PARK, H. S.; BANG, J. Y.; KANG, G. Y.; CHO, K. Biomarker discovery and proteomic evaluation of cadmium toxicity on a collembolan species, *Paronychiurus kimi* (Lee). **PROTEOMICS**, v. 11, n. 11, p. 2294-307, Jun 2011.

SOTI, C.; CSERMELY, P. Molecular chaperones and the aging process. **Biogerontology**, v. 1, n. 3, p. 225-33, 2000.

SOUHELNYTSKYI, S. Bridging proteomics and systems biology: what are the roads to be traveled? **Proteomics**. 2005 Nov;5(16):4123-37., 2005.

SQUIRE, J. M. Muscle myosin filaments: cores, crowns and couplings. **Biophysical Reviews**, v. 1, p. 149-160, 2009.

SRIVASTAVA, D. Comparative effects of copper, cadmium and mercury on tissue glycogen of the catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch). **Toxicology letters**, v. 11, n. 1, p. 135-139, 1982.

STARK, J. S.; JOHNSTONE, G. J.; PALMER, A. S.; SNAPE, I.; LARNER, B. L.; RIDDLE, M. J. Monitoring the remediation of a near shore waste disposal site in Antarctica using the amphipod *Paramoera walkeri* and diffusive gradients in thin films (DGTs). **Mar Pollut Bull**, v. 52, n. 12, p. 1595-610, Dec 2006.

STARKOV, A. A.; FISKUM, G.; CHINOPOULOS, C.; LORENZO, B. J.; BROWNE, S. E.; PATEL, M. S.; BEAL, M. F. Mitochondrial alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex generates reactive oxygen species. **J Neurosci**, v. 24, n. 36, p. 7779-88, Sep 8 2004.

STERNLICHT, H.; FARR, G. W.; STERNLICHT, M. L.; DRISCOLL, J. K.; WILLISON, K.; YAFFE, M. B. The t-complex polypeptide 1 complex is a chaperonin for tubulin and actin in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 20, p. 9422-6, Oct 15 1993.

STOREY, K. B.; CHURCHILL, T. A. Metabolic responses to anoxia and freezing by the freeze tolerant marine mussel *Geukensia demissus*. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 188, n. 1, p. 99-114, 1995.

STULL, J. T.; KAMM, K. E.; VANDENBOOM, R. Myosin light chain kinase and the role of myosin light chain phosphorylation in skeletal muscle. **Arch Biochem Biophys**, v. 510, n. 2, p. 120-8, Jun 15 2011.

SUN, L.; XIE, Z. Changes in lead concentration in Antarctic penguin droppings during the past 3,000 years. **Environmental Geology**, v. 40, n. 10, p. 1205-1208, 2001.

SUTTIE, E. D.; WOLFF, E. W. Seasonal input of heavy metals to Antarctic snow. **Tellus B**, v. 44, n. 4, p. 351-357, 1992.

TABATABAIE, T.; POTTS, J. D.; FLOYD, R. A. Reactive Oxygen Species-Mediated Inactivation of Pyruvate Dehydrogenase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 336, n. 2, p. 290-296, 12/15/ 1996.

TAHARA, E. B.; BARROS, M. H.; OLIVEIRA, G. A.; NETTO, L. E.; KOWALTOWSKI, A. J. Dihydrolipoyl dehydrogenase as a source of reactive oxygen species inhibited by caloric restriction and involved in *Saccharomyces cerevisiae* aging. **FASEB J**, v. 21, n. 1, p. 274-83, Jan 2007.

TAMÁS, M.; SHARMA, S.; IBSTEDT, S.; JACOBSON, T.; CHRISTEN, P. Heavy Metals and Metalloids As a Cause for Protein Misfolding and Aggregation. **Biomolecules**, v. 4, n. 1, p. 252-267, 2014.

TAYLOR, D. A.; THOMPSON, E. L.; NAIR, S. V.; RAFTOS, D. A. Differential effects of metal contamination on the transcript expression of immune- and stress-response genes in the Sydney Rock oyster, *Saccostrea glomerata*. **Environ Pollut**, v. 178, p. 65-71, Jul 2013.

TEDENGREN, M.; OLSSON, B.; BRADLEY, B.; ZHOU, L. Z. Heavy metal uptake, physiological response and survival of the blue mussel (*Mytilus edulis*) from marine and brackish waters in relation to the induction of heat-shock protein 70. **Hydrobiologia**, v. 393, p. 261-269, 1999 1999.

THOMPSON, E. L.; TAYLOR, D. A.; NAIR, S. V.; BIRCH, G.; HAYNES, P. A.; RAFTOS, D. A. Proteomic discovery of biomarkers of metal contamination in Sydney Rock oysters (*Saccostrea glomerata*). **Aquat Toxicol**, v. 109, p. 202-12, Mar 2012.

TOMANEK, L. Environmental Proteomics: Changes in the Proteome of Marine Organisms in Response to Environmental Stress, Pollutants, Infection, Symbiosis, and Development. **Annual Review of Marine Science**, v. 3, n. 1, p. 373-399, 2010.

_____. Environmental Proteomics: Changes in the Proteome of Marine Organisms in Response to Environmental Stress, Pollutants, Infection, Symbiosis, and Development. **Annual Review of Marine Science**, v. 3, n. 1, p. 373-399, 2011.

TOMANEK, L. Environmental proteomics of the mussel *Mytilus*: implications for tolerance to stress and change in limits of biogeographic ranges in response to climate change. **Integrative and Comparative Biology**, v. 52, p. 648-664, 2012a.

_____. Environmental proteomics of the mussel *Mytilus*: implications for tolerance to stress and change in limits of biogeographic ranges in response to climate change. **Integr Comp Biol**, v. 52, n. 5, p. 648-64, Nov 2012b.

_____. Proteomics to study adaptations in marine organisms to environmental stress. **J Proteomics**, v. 105, p. 92-106, Jun 13 2014.

_____. Proteomic responses to environmentally induced oxidative stress. **Journal of Experimental Biology**, 2015.

TOMANEK, L.; SOMERO, G. N. Time course and magnitude of synthesis of heat-shock proteins in congeneric marine snails (Genus *tegula*) from different tidal heights. **Physiol Biochem Zool**, v. 73, n. 2, p. 249-56, Mar-Apr 2000.

TOMANEK, L.; ZUZOW, M. J. The proteomic response of the mussel congeners *Mytilus galloprovincialis* and *M. trossulus* to acute heat stress: implications for thermal tolerance and metabolic costs of thermal stress. **Journal of Experimental Biology**, v. 213, p. 3559-3574, 2010a.

_____. The proteomic response of the mussel congeners *Mytilus galloprovincialis* and *M. trossulus* to acute heat stress: implications for thermal tolerance limits and metabolic costs of thermal stress. **J Exp Biol**, v. 213, n. Pt 20, p. 3559-74, Oct 15 2010b.

TOMANEK, L.; ZUZOW, M. J.; HITT, L. R.; SERAFINI, L.; VALENZUELA, J. J. Proteomics of hyposaline stress in blue mussel congeners (genus *Mytilus*): implications for biogeographic range limits in response to climate change. **Journal of Experimental Biology**, v. 215, p. 3905-3916, 2012.

TOMANEK, L.; ZUZOW, M. J.; IVANINA, A. V.; BENIASH, E.; SOKOLOVA, I. M. Proteomic response to elevated P_{CO2} level in eastern oyster, *Crassostrea virginica*: evidence for oxidative stress. **Journal of Experimental Biology**, v. 214, p. 1836-1844, 2011.

TORO, B.; NAVARRO, J. M.; PALMA-FLEMING, H. Relationship between bioenergetics responses and organic pollutants in the giant mussel, *Choromytilus chorus* (Mollusca: Mytilidae). **Aquat Toxicol**, v. 63, n. 3, p. 257-69, May 8 2003.

TRETTER, L.; ADAM-VIZI, V. Generation of Reactive Oxygen Species in the Reaction Catalyzed by α -Ketoglutarate Dehydrogenase. **The Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 36, p. 7771-7778, September 8, 2004 2004.

TRUEBANO, M.; BURNS, G.; THORNE, M. A. S.; HILLYARD, G.; PECK, L. S.; SKIBINSKI, D. O. F.; CLARK, M. S. Transcriptional response to heat stress in the Antarctic bivalve *Laternula elliptica*. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 391, n. 1-2, p. 65-72, 2010.

TRUEBANO, M.; DIZ, A. P.; THORNE, M. A. S.; CLARK, M. S.; SKIBINSKI, D. O. F. Proteome response to heat stress in the Antarctic clam *Laternula elliptica*. **Journal of Integrated OMICS**, n. 3 (1), p. 34-43, 2013.

TSAI, J.-R.; LIN, H.-C. V-type H⁺-ATPase and Na⁺, K⁺-ATPase in the gills of 13 euryhaline crabs during salinity acclimation. **Journal of Experimental Biology**, v. 210, n. 4, p. 620-627, 2007.

TURRENS, J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **The Journal of Physiology**, v. 552, n. 2, p. 335-344, October 15, 2003 2003.

TYERS, M.; MANN, M. From genomics to proteomics. **Nature**, v. 422, n. 6928, p. 193-197, 2003.

USSHER, S. J.; WORSFOLD, P. J.; ACHTERBERG, E. P.; LAËS, A.; BLAIN, S.; LAAN, P.; DE BAAR, H. J. W. Distribution and redox speciation of dissolved iron on the European continental margin. **Journal Limnology and Oceanography**, v. 52, n. 6, p. 2530-2539, 2007.

VALKO, M.; MORRIS, H.; CRONIN, M. T. Metals, toxicity and oxidative stress. **Curr Med Chem**, v. 12, n. 10, p. 1161-208, 2005.

VALLELONGA, P.; VELDE, K. V. D.; CANDELONE, J. P.; MORGAN, V. I.; BOUTRON, C. F.; ROSMAN, K. J. R. The lead pollution history of Law Dome, Antarctica, from isotopic measurements on ice cores: 1500 AD to 1989 AD. **Earth and Planetary Science Letters**, v. 204, n. 1, p. 291-306, 2002.

VALLENIUS, T. Actin stress fibre subtypes in mesenchymal-migrating cells. **Open Biol**, v. 3, n. 6, p. 130001, Jun 2013.

VAN DE VELDE, K.; VALLELONGA, P.; P., C. J.; ROSMAN, K. J. R.; GASPARI, V.; COZZI, G.; BARBANTE, C.; UDISTI, R.; CESCO, P.; BOUTRON, C. F. Pb isotope record over one century in snow from Victoria Land. **Earth and Planetary Science Letters**, v. 232, n. 1-2, p. 95-108, 2005.

VAN DER FLIER, A.; SONNENBERG, A. Structural and functional aspects of filamins. **Biochim Biophys Acta**, v. 1538, n. 2-3, p. 99-117, Apr 23 2001.

VAN DER MERWE, P.; LANNUZEL, D.; BOWIE, A. R.; MEINERS, K. M. High temporal resolution observations of spring fast ice melt and seawater iron enrichment in East Antarctica. **Journal of Geophysical Research: Biogeosciences**, v. 116, n. G3, p. G03017, 2011.

VAUGHAN, D. G.; MARSHALL, G. J.; CONNOLLEY, W. M.; PARKINSON, C.; MULVANEY, R.; HODGSON, D. A.; KING, J. C.; PUDSEY, C. J.; TURNER, J. Recent Rapid Regional Climate Warming on the Antarctic Peninsula. **Climatic Change**, v. 60, n. 3, p. 243-274, 2003.

VITALE, A.; MONSERRAT, J.; CASTILHO, P.; RODRIGUEZ, E. Inhibitory effects of cadmium on carbonic anhydrase activity and ionic regulation of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Grapsidae). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology**, v. 122, n. 1, p. 121-129, 1999.

WANDERS, R. J.; DURAN, M.; LOUPATTY, F. J. Enzymology of the branched-chain amino acid oxidation disorders: the valine pathway. **J Inherit Metab Dis**, v. 35, n. 1, p. 5-12, Jan 2012.

WANG, S.; HONG, H.; WANG, X. Bioenergetic responses in green lipped mussels (*Perna viridis*) as indicators of pollution stress in Xiamen coastal waters, China. **Mar Pollut Bull**, v. 51, n. 8-12, p. 738-43, 2005.

WEBB, J.; MANN, S.; BANNISTER, J. V.; WILLIAMS, R. J. P. Biomineralization of iron: isolation of ferritin from the hemolymph of the limpet *Patella vulgata*. **Inorganica Chimica Acta**, v. 124, p. 37-40, 1986.

WEBSTER, J.; WEBSTER, K.; NELSON, P.; WATERHOUSE, E. The behaviour of residual contaminants at a former station site, Antarctica. **Environ Pollut**, v. 123, n. 2, p. 163-79, 2003.

WEIHE, E.; ABELE, D. Differences in the physiological response of inter- and subtidal Antarctic limpets *Nacella concinna* to aerial exposure. **Aquatic Biology**, v. 4, n. 2, p. 155-166, 2008 2008.

WEIHE, E.; KRIEWS, M.; ABELE, D. Differences in heavy metal concentrations and in the response of the antioxidant system to hypoxia and air exposure in the Antarctic limpet *Nacella concinna*. **Marine Environmental Research**, v. 69, n. 3, p. 127-135,

_____. Differences in heavy metal concentrations and in the response of the antioxidant system to hypoxia and air exposure in the Antarctic limpet *Nacella concinna*. **Marine Environmental Research**, v. 69, n. 3, p. 127-135, 2010.

WELLS, R. M. G.; WONG, P. P. S. Respiratory functions of the blood in the limpet *Siphonaria zelandica* (Gastropoda: Pulmonata). **New Zealand Journal of Zoology**, v. 5, n. 2, p. 417-420, 1978/06/01 1978.

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.

WHEELOCK, C.; WOLFE, M.; OLSEN, H.; TJEERDEMA, R.; SOWBY, M. Hsp60-induced tolerance in the rotifer *Brachionus plicatilis* exposed to multiple environmental contaminants. **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 36, n. 3, p. 281-287, 1999.

WIDDOWS, J.; JOHNSON, D. Physiological energetics of *Mytilus edulis*: Scope for Growth. **Marine Ecology-progress Series**, v. 46, p. 113-121, 1988.

WILLMER, P.; STONE, G.; JOHNSTON, I. **Environmental Physiology of Animals**. Wiley, 2009. ISBN 9781444309225. Disponível em: <
<http://books.google.com/books?id=r9gvbjRFyRgC>>.

WINSTON, G. W.; DI GIULIO, R. T. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. **Aquatic Toxicology**, v. 19, n. 2, p. 137-161, 1991.

WOLFF, E. W.; CACHIER, H. Concentrations and seasonal cycle of black carbon in aerosol at a coastal Antarctic station. **Journal of Geophysical Research: Atmospheres**, v. 103, n. D9, p. 11033-11041, 1998.

WOLFF, E. W.; SUTTIE, E. D. Antarctic snow record of southern hemisphere lead pollution. **Geophysical Research Letters**, v. 21, n. 9, p. 781-784, 1994.

WOLFF, E. W.; SUTTIE, E. D.; PEEL, D. A. Antarctic snow record of cadmium, copper, and zinc content during the twentieth century. **Atmospheric Environment**, v. 33, n. 10, p. 1535-1541, 1999.

WU, J.-P.; CHEN, H.-C. Metallothionein induction and heavy metal accumulation in white shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to cadmium and zinc. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 140, n. 3, p. 383-394, 2005.

WU, K. C.; JIN, J. P. Calponin in non-muscle cells. **Cell Biochem Biophys**, v. 52, n. 3, p. 139-48, 2008.

YAMADA, T.; BORK, P. Evolution of biomolecular networks [mdash] lessons from metabolic and protein interactions. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 10, n. 11, p. 791-803, 2009.

ZALUPS, R. K.; KOROPATNICK, D. J. **Cellular and Molecular Biology of Metals**. Taylor & Francis, 2010. ISBN 9781420059984. Disponível em: < <http://books.google.com.br/books?id=nE8f4N4kb50C> >.

ZAUKE, G. P.; SCHMALENBACH, I. Heavy metals in zooplankton and decapod crustaceans from the Barents Sea. **Science of The Total Environment**, v. 359, n. 1-3, p. 283-294, 2006.

ZHANG, X.; YANG, F.; SHIM, J. Y.; KIRK, K. L.; ANDERSON, D. E.; CHEN, X. Identification of arsenic-binding proteins in human breast cancer cells. **Cancer Lett**, v. 255, n. 1, p. 95-106, Sep 18 2007.

ZHENG, W. J.; HU, Y. H.; SUN, L. Identification and analysis of a *Scophthalmus maximus* ferritin that is regulated at transcription level by oxidative stress and bacterial infection. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol**, v. 156, n. 3, p. 222-8, Jul 2010.

ZHU, B.; LIN, Q.; KE, C. H.; HUANG, H. Q. Single subunit type of ferritin from visceral mass of *Saccostrea cucullata*: cloning, expression and cisplatin-subunit analysis. **Fish Shellfish Immunol**, v. 31, n. 3, p. 453-61, Sep 2011.

ZVELEBIL, M. J.; BAUM, J. O. **Understanding bioinformatics**. Garland Science/Taylor & Francis Group, 2008. ISBN 9780815340249. Disponível em: < http://books.google.com/books?id=dGayL_tdnBMC >.

MATERIAL SUPPLEMENTAR

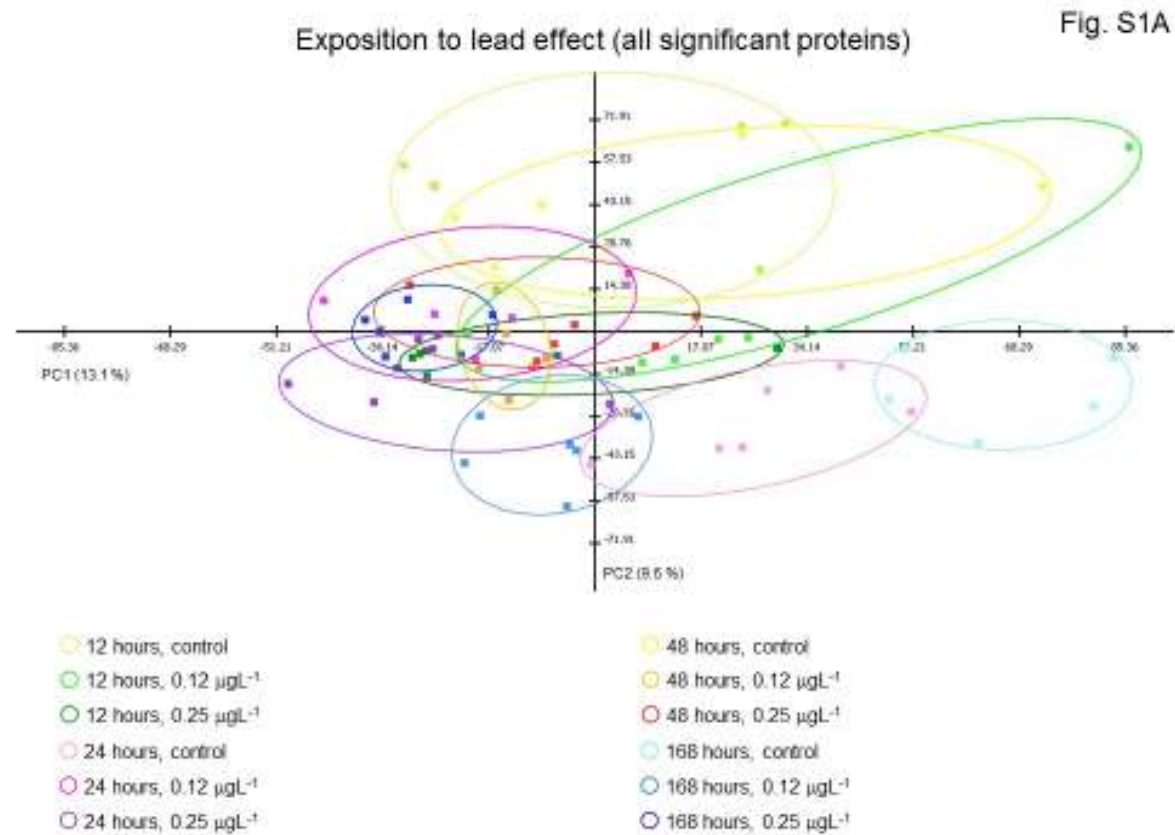


Figure S1: Principal component analysis (PCA) based on proteins that were identified and showed a significant change in abundance with lead over time. Each color represents a treatment group of *Nacella concinna* of a different combination of exposure time and lead concentration – for the 12 h time point: light green: control (0.0 μgL^{-1}); green: 0.12 μgL^{-1} ; dark green: 0.25 μgL^{-1} . For the 24 h time point: light pink: control; pink: 0.12 μgL^{-1} ; purple: 0.25 μgL^{-1} . For 48 h: yellow: control; orange: 0.12 μgL^{-1} ; red: 0.25 μgL^{-1} . For 168 h: light blue: control; blue: 0.12 μgL^{-1} ; dark blue: 0.25 μgL^{-1} . Principal components 1 and 2 (PC1 and PC2) and the percentage of the total variation of the selected (significant proteins) data set they explain are shown.

Table S1: Protein identification with estimated and predicted molecular mass (kDa), isoelectric point (pI), GenBank identifier, MASCOT score, number of peptides matched, sequence coverage, and putative functional category.													
Spot ID	Protein ID	T	C	I	Estimated MW	Estimated pI	Predicted MW	Predicted pI	GenBank ID	Mascot	Peptide Matches	Sequence Coverage	Functional Category
7	Actin			✓	41,81	5,30	100,00	5,64	gi265141569	78	4	14%	Cytoskeletal
9	Myosin heavy chain		✓		19,72	5,44	100,00	5,72	gi6682319	108	2	15%	Cytoskeletal
10	Actin	✓			41,75	5,29	96,00	6,06	gi385145402	113	4	9%	Cytoskeletal
14	Pyruvate dehydrogenase E1			✓	39,05	6,02	45,00	5,67	gi405962672	153	3	14%	Energy metabolism
20	78 kDa glucose-regulated protein			✓	34,95	5,48	85,00	4,89	gi78190529	137	3	9%	Protein Homeostasis
22	Tropomyosin		✓		32,88	4,57	54,00	4,66	gi219806586	360	8	25%	Cytoskeletal
36	Actin			✓	35,24	5,26	73,00	4,75	gi120564812	221	5	13%	Cytoskeletal
42	T-complex protein β			✓	46,10	6,63	72,00	6,19	gi505804188	100	3	9%	Protein Homeostasis
43	Calreticulin		✓		42,64	4,72	71,00	4,55	gi405957714	101	2	3%	Protein Homeostasis
46	β tubulin		✓		49,77	4,80	68,00	5,03	gi51860821	151	3	13%	Cytoskeletal
50	Protein Disulfide isomerase			✓	55,24	4,56	69,00	4,79	gi126697420	128	3	8%	Protein Homeostasis
52	Actin			✓	41,90	5,23	68,00	5,75	gi405974541	108	3	9%	Cytoskeletal
56	Alpha-enolase			✓	47,29	5,38	67,00	6,29	gi198421078	242	3	16%	Energy metabolism
62	Actin			✓	23,67	5,28	66,00	5,27	gi402576872	181	5	14%	Cytoskeletal
63	Myosin heavy chain	✓	✓		22,21	5,49	63,00	5,33	gi189007782	92	2	7%	Cytoskeletal
64	Actin	✓	✓		41,74	5,30	63,00	5,42	gi18565104	124	4	17%	Cytoskeletal
65	Actin	✓			41,74	5,30	59,00	5,61	gi18565104	250	6	21%	Cytoskeletal
66	Ferritin (heavy)			✓	20,42	5,25	30,00	4,49	gi405978589	59	4	9%	Antioxidant proteins
70	Actin			✓	41,74	5,30	60,00	5,51	gi18565104	388	6	21%	Cytoskeletal
71	Isocitrate dehydrogenase NAD+		✓		46,34	6,24	58,00	6,68	gi225711968	118	2	11%	Energy metabolism
76	Actin			✓	41,72	5,30	59,00	5,40	gi18565104	289	6	19%	Cytoskeletal
79	Actin		✓		41,72	5,30	59,00	5,30	gi18565104	289	6	19%	Cytoskeletal
87	Actin			✓	41,74	5,30	60,00	5,51	gi18565104	388	6	21%	Cytoskeletal
94	Tropomyosin			✓	32,86	4,57	54,00	4,66	gi219806586	158	7	22%	Cytoskeletal
95	Actin			✓	41,74	5,30	56,00	5,35	gi18565104	246	6	21%	Cytoskeletal
96	Actin			✓	41,74	5,30	53,00	5,46	gi18565104	56	2	6%	Cytoskeletal
103	Actin			✓	41,75	5,29	51,00	5,79	gi385145402	171	4	19%	Cytoskeletal
104	Actin			✓	46,04	4,89	51,00	5,01	gi385145402	377	7	31%	Cytoskeletal
109	Calreticulin			✓	39,12	4,74	46,00	4,99	gi405957713	166	3	10%	Protein Homeostasis
110	Pyruvate dehydrogenase E1			✓	39,05	6,02	48,00	5,78	gi405962672	168	3	14%	Energy metabolism
112	Actin			✓	41,74	5,30	45,00	4,87	gi18565104	414	6	21%	Cytoskeletal
113	Tropomyosin			✓	26,67	4,46	45,00	4,75	gi332672682	243	5	13%	Cytoskeletal
114	Actin			✓	41,74	5,30	44,00	5,05	gi18565104	313	6	21%	Cytoskeletal
115	Actin			✓	35,24	5,26	46,00	4,83	gi120564812	414	6	19%	Cytoskeletal
116	Actin			✓	16,04	5,27	46,00	4,91	gi322422107	73	3	7%	Cytoskeletal
119	Myosin II regulatory light chain		✓		18,84	4,52	43,00	5,18	gi499141151	299	8	31%	Cytoskeletal
122	Actin			✓	30,51	5,06	42,00	5,00	gi429489724	278	5	17%	Cytoskeletal
123	Serine/threonine phosphatase 2 A		✓		35,41	5,51	43,00	5,39	gi91089631	111	4	24%	Cytoskeletal
125	Tropomyosin			✓	26,67	4,46	45,00	4,75	gi332672682	243	5	13%	Cytoskeletal
132	Pyruvate dehydrogenase E1			✓	39,05	6,02	41,00	4,77	gi405962672	293	5	20%	Energy metabolism
135	Proteasome α			✓	26,41	4,74	39,00	4,59	gi45387823	286	5	26%	Protein Homeostasis
137	Actin			✓	41,78	5,29	38,00	5,95	gi385145402	275	4	24%	Cytoskeletal
139	Actin			✓	41,88	5,30	37,00	5,41	gi341579620	164	3	14%	Cytoskeletal
143	Actin			✓	41,74	5,30	38,00	4,60	gi18565104	210	5	15%	Cytoskeletal
145	Proteasome α			✓	26,41	4,74	35,00	4,92	gi45387823	110	3	15%	Protein Homeostasis
150	Ca-dependent protein kinase 2		✓		28,03	7,89	31,00	5,23	gi53801337	54	2	3%	Cytoskeletal
156	Calponin			✓	27,82	8,68	27,00	6,76	gi157114443	54	2	5%	Cytoskeletal
160	Mn Superoxide dismutase			✓	21,60	5,88	24,00	6,64	gi171466143	97	2	6%	Antioxidant proteins
162	Ferritin		✓	✓	19,83	5,04	22,00	5,13	gi388571224	134	4	16%	Antioxidant proteins
165	β Tubulin		✓	✓	43,19	5,76	18,00	6,62	gi78190577	468	9	32%	Cytoskeletal
169	RNA-binding protein			✓	15,17	6,16	15,00	6,66	gi13605469	50	2	7%	Energy metabolism
177	Triosephosphate isomerase			✓	26,88	6,91	123,00	5,23	gi296317286	157	2	8%	Energy metabolism
179	Myosin heavy chain			✓	22,21	5,49	98,00	5,41	gi189007782	123	2	15%	Cytoskeletal
181	Paramyosin			✓	99,52	5,36	98,00	5,01	gi318609972	65	2	12%	Cytoskeletal
184	Myosin catalytic light chain			✓	18,50	4,49	20,00	4,43	gi405952901	61	3	10%	Cytoskeletal
185	Myosin regulatory light chain			✓	19,49	4,54	19,00	4,53	gi124783553	85	3	18%	Cytoskeletal
186	Myosin catalytic light chain			✓	18,50	4,49	18,00	4,43	gi405952901	56	3	10%	Cytoskeletal
188	Ferritin (heavy)			✓	20,42	5,25	30,00	4,49	gi405978589	59	3	9%	Antioxidant proteins

Table S1 continued											
189	Myosin regulatory light chain	✓	19,49	4,54	22,00	4,54	gij124783553	85	3	18%	Cytoskeletal
191	Actin	✓	92,54	4,91	59,00	6,70	gij552061	74	3	7%	Cytoskeletal
192	Phosphoglycerate kinase	✓	43,03	7,59	60,00	6,62	gij405963233	188	2	11%	Energy metabolism
195	Carbonic anhydrase	✓	36,53	8,70	46,00	6,68	gij405966618	57	2	5%	Energy metabolism
197	Carbonic anhydrase	✓	36,51	8,70	49,00	6,58	gi405966618	65	2	10%	Energy metabolism
198	Pyruvate dehydrogenase E1	✓	40,79	6,80	43,00	6,57	gij405966230	95	3	4%	Energy metabolism
204	Carbonic anhydrase	✓	36,53	8,70	37,00	6,60	gij405966618	61	2	10%	Energy metabolism
205	Cdc42	✓	21,23	6,16	76,00	5,40	gij241253290	96	2	14%	Cytoskeletal
210	Eukaryotic initiation factor 3	✓	36,16	6,01	47,00	6,22	gij405973899	132	2	9%	Protein Homeostasis
211	Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase	✓	57,24	6,48	69,00	6,63	gij395503909	72	2	4%	Energy metabolism
218	Actin	✓	29,34	4,99	17,00	5,50	gij312106932	154	4	19%	Cytoskeletal
224	Triosephosphate isomerase	✓	27,22	7,57	35,00	6,70	gij333449422	74	3	5%	Energy metabolism
233	Filamin-C	✓	323,54	5,54	90,00	6,50	gij405962873	87	3	16%	Cytoskeletal
234	Phosphorylase kinase a β	✓	150,11	6,99	87,00	6,71	gi405951264	44	2	7%	Energy metabolism
237	Arginine kinase	✓	39,10	7,12	86,00	6,50	gij3183057	73	2	11%	Energy metabolism
241	Myosin heavy chain	✓	22,21	5,49	98,00	5,41	gij189007782	123	2	15%	Cytoskeletal
242	Aldehyde dehydrogenase family 7	✓	18,52	7,93	78,00	6,77	gij146332277	65	2	7%	Antioxidant proteins
244	Dihydropyridol dehydrogenase	✓	54,65	7,60	66,00	6,89	gij115752588	98	2	5%	Energy metabolism
245	Isocitrate dehydrogenase NADP	✓	50,52	6,80	58,00	6,96	gij385268543	144	4	16%	Energy metabolism
247	Thioredoxin peroxidase 1/2	✓	22,26	6,73	39,00	6,82	gij126697356	181	3	13%	Energy metabolism
248	O-Glycosyl hydrolase	✓	58,47	4,65	37,00	6,97	gij254443274	52	2	4%	Energy metabolism
249	Triosephosphate isomerase	✓	27,20	7,57	36,00	6,84	gij333449422	116	3	8%	Energy metabolism
254	Dihydropyridol dehydrogenase	✓	54,65	7,60	74,00	6,85	gij115752588	81	2	5%	Energy metabolism
264	Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase	✓	54,13	6,58	66,00	6,67	gi2494070	59	2	2%	Energy metabolism
270	ADP Ribosylation factor	✓ ✓	20,40	5,91	21,00	6,85	gij41054067	80	3	26%	Cytoskeletal
272	Mitochondrial Malate dehydrogenase	✓	25,79	8,91	46,00	6,81	gi126697476	73	2	9%	Energy metabolism
274	Arginine kinase	✓	38,52	5,90	51,00	6,94	gij13647113	150	3	15%	Energy metabolism
283	Cdc42	✓	21,25	6,16	20,00	5,84	gij241253290	177	2	14%	Cytoskeletal
285	Actin	✓	41,74	5,30	18,00	6,12	gij18565104	280	4	11%	Cytoskeletal
287	Actin	✓	29,34	4,99	12,00	5,62	gij312106932	158	3	12%	Cytoskeletal
292	G protein β	✓	37,33	5,62	46,00	5,73	gij375073754	165	3	12%	Cytoskeletal
297	Actin	✓	41,78	5,29	36,00	6,01	gij385145402	288	4	24%	Cytoskeletal
305	Proteasome β	✓	23,43	5,09	25,00	5,35	gij405951012	138	3	14%	Protein Homeostasis
316	Ferritin	✓	19,96	5,05	26,00	6,26	gij84619356	239	4	16%	Antioxidant proteins

Table S2: Positive and negative loadings for principal component 1 and 2 of proteins significant for all exposition times to lead (compare with Supplement Fig. S1).

Component Loading Rank	Principle Component 1		Principle Component 2	
	Protein (Spot ID)	Loading Value	Protein (Spot ID)	Loading Value
Positive Loadings for all times				
1	(a) Tropomyosin (125)	2,16896	(c) Tropomyosin (125)	1,93365
2	Calreticulin (109)	1,99670	Paramyosin (181)	1,85551
3	Triosephosphate isomerase (177)	1,89483	Phosphorylase kinase α (234)	1,67589
4	Actin (116)	1,86725	Actin (103)	1,67060
5	Actin (104)	1,84663	Actin (122)	1,66394
6	Actin (95)	1,80797	Actin (297)	1,60877
7	Actin (112)	1,75000	Pyruvate dehydrogenase E1 (132)	1,56203
8	Tropomyosin (22)	1,59013	Myosin regulatory light chain (185)	1,52493
9	Methylmalonate-semialdehyde dehydro (211)	1,50100	Myosin regulatory light chain (189)	1,42155
10	G protein β (292)	1,47463	Myosin heavy chain (179)	1,33281
Negative Loadings for all times				
1	(b) Pyruvate dehydrogenase E1 (14)	-1,96090	(d) Actin (7)	-1,63832
2	α -enolase (56)	-1,89820	Actin (96)	-1,49180
3	Triosephosphate isomerase (224)	-1,67620	β Tubulin (169)	-1,45340
4	Arginine kinase (274)	-1,60313	Actin (70)	-1,43581
5	Tropomyosin (94)	-1,45469	Ferritin (316)	-1,34549
6	Myosin regulatory light chain (198)	-1,30307	Carbonic anhydrase (195)	-1,33182
7	Myosin heavy chain (63)	-1,28652	β Tubulin (165)	-1,32417
8	Dihydrolipoyl dehydrogenase (254)	-1,25556	Cdc42 (205)	-1,28486
9	Myosin regulatory light chain (185)	-1,10167	Myosin heavy chain (63)	-1,27558
10	O-Glycosyl hydrolase (248)	-1,08020	Actin (79)	-1,27474

Tabela S3: Identificação de proteínas com massa molecular estimada e prevista (kDa), ponto isoelétrico (PI), identificador no GenBank, pontuação mascote, número de pepídeos cobertos, cobertura sequência e categoria funcional suposta.

Spot ID Cu	Protein ID	MW (kDa) Estimated	pI Estimated	MW (kDa) Predicted	pI Predicted	GenBank ID	Mascot Score	Peptide Matches	Sequence Coverage	Functional Category
2	Actin	23,67	5,28	101,00	5,82	gi402576872	99	4	10%	Cytoskeletal
23	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I	36,16	6,01	47,00	6,22	gi405973899	132	2	9%	Protein Homeostasis
29	Tropomyosin	26,67	4,46	45,00	4,75	gi332672682	243	5	13%	Cytoskeletal
43	Proteasome subunit alpha type-5	26,41	4,74	39,00	4,59	gi45387823	286	5	26%	Protein Homeostasis
45	Actin	41,78	5,29	38,00	5,95	gi385145402	275	4	24%	Cytoskeletal
46	Paramyosin	99,45	5,36	39,00	5,64	gi318609972	85	2	12%	Cytoskeletal
51	Actin	41,88	5,30	37,00	5,41	gi341579620	164	3	14%	Cytoskeletal
53	Actin	41,74	5,30	38,00	4,60	gi18565104	210	5	15%	Cytoskeletal
55	Actin	41,78	5,29	36,00	6,01	gi385145402	288	4	24%	Cytoskeletal
58	Paramyosin	99,52	5,36	37,00	5,96	gi318609972	243	3	19%	Cytoskeletal
66	Myosin catalytic light chain LC-1	18,51	4,49	31,00	4,49	gi405952901	53	4	14%	Cytoskeletal
69	Ferritin	20,42	5,25	30,00	4,49	gi405978589	59	2	9%	Oxidative stress
73	Cdc42 protein	21,25	6,16	26,00	4,83	gi241253290	191	2	14%	Signaling proteins
77	Cdc42 protein	21,25	6,16	25,00	5,32	gi241253290	194	2	14%	Signaling proteins
78	Myosin regulatory light chain	19,49	4,54	22,00	4,54	gi124783553	85	3	18%	Cytoskeletal
81	Ferritin	19,83	5,04	22,00	5,13	gi388571224	134	4	16%	Oxidative stress
82	Myosin catalytic light chain LC-1	18,50	4,49	20,00	4,43	gi405952901	61	3	10%	Cytoskeletal
88	Actin	41,74	5,30	18,00	6,12	gi18565104	280	4	11%	Cytoskeletal
94	Myosin regulatory light chain	19,49	4,54	19,00	4,53	gi124783553	85	3	18%	Cytoskeletal
102	Actin	30,51	5,06	42,00	5,00	gi429489724	278	5	17%	Cytoskeletal
103	Actin	41,74	5,30	40,00	4,97	gi18565104	231	6	21%	Cytoskeletal
128	Arginine kinase	39,10	7,12	86,00	6,50	gi3183057	73	2	11%	Energy metabolism
141	Dihydropyridin dehydrogenase, mitochondrial-like	54,65	7,60	74,00	6,85	gi115752588	81	2	5%	Energy metabolism
142	T-complex protein 1 subunit beta	57,49	6,03	74,00	6,51	gi405972882	86	2	8%	Protein Homeostasis
165	Isocitrate dehydrogenase	50,52	6,80	58,00	6,96	gi385268543	144	4	16%	Energy metabolism
177	Carbonic anhydrase 2	36,51	8,70	49,00	6,58	gi405966618	65	2	10%	Energy metabolism
181	Malate dehydrogenase precursor	25,79	8,91	46,00	6,81	gi126697476	73	2	9%	Energy metabolism
184	Carbonic anhydrase 2	36,53	8,70	46,00	6,68	gi405966618	57	2	5%	Energy metabolism
188	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form	40,79	6,80	43,00	6,57	gi405966230	95	2	4%	Energy metabolism
195	O-Glycosyl hydrolase family 30	58,47	4,65	37,00	6,97	gi254443274	52	2	4%	Energy metabolism
223	Carbonic anhydrase 2	36,53	8,70	37,00	6,60	gi405966618	61	2	10%	Energy metabolism
228	Calponin/transgelin	27,82	8,68	27,00	6,76	gi157114443	54	2	5%	Cytoskeletal
233	RNA-binding protein	15,17	6,16	15,00	6,66	gi13605469	50	2	7%	Signaling proteins
235	Triosephosphate isomerase	27,22	7,57	35,00	6,70	gi333449422	74	2	5%	Energy metabolism
238	Actin	41,75	5,29	51,00	5,79	gi385145402	171	4	19%	Cytoskeletal
241	Heat shock-related 70 kDa protein	69,49	5,43	98,00	5,44	gi11177910	59	3	6%	Protein Homeostasis
245	Myosin heavy chain	22,21	5,49	98,00	5,41	gi189007782	123	2	15%	Cytoskeletal
254	Heat shock protein 60 kDa protein	60,89	5,41	79,00	5,39	gi218683627	86	2	6%	Protein Homeostasis
264	Actin	41,74	5,30	63,00	5,42	gi18565104	124	4	17%	Cytoskeletal
267	Actin	27,17	6,01	64,00	4,96	gi124783834	93	2	10%	Cytoskeletal
270	Actin	41,72	5,30	59,00	5,40	gi18565104	289	6	19%	Cytoskeletal
272	Actin	41,74	5,30	59,00	2,87	gi18565104	302	6	21%	Cytoskeletal
282	Mitochondrial ATP synthase beta subunit	46,04	4,89	90,00	4,76	gi374534593	270	5	30%	Energy metabolism
290	Tropomyosin	32,86	4,57	54,00	4,66	gi219806586	158	7	22%	Cytoskeletal
301	Myosin heavy chain	22,21	5,49	63,00	5,33	gi189007782	92	2	7%	Cytoskeletal
310	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial	39,05	6,02	45,00	5,67	gi405962672	153	3	14%	Energy metabolism
317	Actin	41,81	5,30	100,00	5,64	gi265141569	78	4	14%	Cytoskeletal