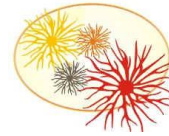




Universidade Federal do Rio Grande – FURG

Instituto de Ciências Biológicas ICB



Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas:

Fisiologia Animal Comparada – PPGCF-FAC

**Caracterização do padrão de expressão de isoformas da família p53 em
mexilhões *Mytilus edulis* expostos ao chumbo**

Amanda da Silveira Guerreiro

Dissertação a ser defendida no âmbito do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas – Fisiologia Animal Comparada da Universidade Federal do Rio Grande – FURG, como parte dos Requisitos para o título de mestre.

Orientadora: Dra. Juliana Zomer Sandrini

Co-orientadora: Dra. Daniela Volcan Almeida

Rio Grande - RS

2015

Agradecimentos

Inicialmente gostaria de agradecer aos meus pais, Maria Luisa e Gilmar, que são tudo o que eu sempre precisei. Muito obrigada pela paciência, pelos mimos, pelo carinho e pelo amor. Vocês são a base da minha vida e fico muito feliz de poder estar todos os dias com vocês. Espero que saibam que vocês me inspiram a continuar sempre avançando, sempre buscando conhecimento e crescendo como pessoa e profissional. Muito obrigada por tudo, amo vocês!

Ao meu irmão, Nelo, que mesmo morando longe está sempre presente na minha vida, me apoiando em praticamente tudo que faço.

Gostaria de agradecer imensamente a minha orientadora Juliana Zomer Sandrini que aceitou me guiar nessa etapa da minha vida. Foi uma honra poder ter trabalhado e aprendido tanto contigo. Tu és um exemplo de pessoa e profissional para mim e espero que um dia eu seja parecida, pelo menos um pouquinho, contigo. Fico muito feliz em poder ter concluído esta etapa da minha vida sob tua orientação e espero que este seja o primeiro de muitos trabalhos que estão por vir.

Gostaria de agradecer a minha co-orientadora Daniela Volcan Almeida por ter aceitado fazer parte dessa caminhada. Obrigada pelos ensinamentos, pelas dicas, por tudo. Te admiro muito.

Aos professores que aceitaram o convite para ser minha banca, muito obrigada desde já. Suas considerações e sugestões para o aprimoramento deste trabalho serão muito bem vindas.

Aos meus amigos e colegas de trabalho, Fábio, Robson e Filipe, por toda ajuda laboratorial. Mas mais do que isso, pelos risos, pela companhia nos cafezinhos de meio de manhã, pelas agitadas coletas, pelas parcerias, pela amizade!

Às minhas lindas, Regina, Fernanda e Priscila, por terem feito esse finalzinho de dissertação bem mais tranquilo. Agradeço muito a amizade de vocês e podem ter certeza que mais saídas nos esperam!

À Regina mais uma vez, que além da amizade me ensinou muita coisa sobre esses mexilhões lindos e sobre técnicas laboratoriais. Além disso, obrigada pela ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

Ao pessoal que estava na coleta no dia que achamos uma maior quantidade de *Mytilus*, muito obrigada. Era um dia nublado e, mesmo assim, todos foram e ficaram extremamente felizes quando encontraram os animais que, até aquela data, estavam meio sumidos.

A minha querida amiga, Letícia, por toda essa vida de amizade. Obrigada por ser essa pessoa sempre presente, que me conhece tão bem e que me traz tanta alegria. Queria te agradecer também por aqueles momentos que tu me tiraste dos estudos para me distrair, pelo menos um pouquinho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas – Fisiologia Animal Comparada por ter permitido que eu desenvolvesse essa etapa tão importante na minha vida, com professores capacitados que nos inspiram todos os dias.

Aos técnicos e funcionários da Fisiologia por ter mantido tudo sempre em ordem, seja nos laboratórios ou nos corredores, e por ter sempre se disponibilizado a retirar dúvidas.

E finalmente, queria agradecer a Universidade Federal do Rio Grande – FURG e o Instituto de Ciências Biológicas – ICB por ter me permitido crescer como profissional e ter me acolhido por todo esse tempo. Praticamente minha segunda casa, a universidade vai estar sempre no meu coração.

Sumário

Resumo.....	5
1. Introdução	6
2. Objetivo.....	14
2.1. Objetivos específicos.....	14
3. ARTIGO.....	15
Abstract	17
Introduction	18
Methods.....	20
Results	22
Discussion	23
Conclusion.....	28
Acknowledgements	28
References	28
4. Discussão geral.....	41
5. Bibliografia	46

Resumo

As proteínas da família p53 atuam principalmente na resposta contra danos ao DNA. Apesar de bastante informação estar disponível a respeito desta família de proteínas para vertebrados, principalmente mamíferos, o conhecimento para invertebrados ainda é incipiente. Com o objetivo de analisar se o chumbo tem a capacidade de alterar os níveis de mRNA das isoformas *p53*, *TAp63/73* e $\Delta Np63/73$ em bivalves, mexilhões *Mytilus edulis* foram expostos ao chumbo (0,01 e 0,1mg Pb/L) durante 1, 3 e 7 dias. Considerando a distribuição tecidual destas isoformas, a *p53* foi detectada em todos os tecidos analisados (brânquias, músculo e glândula digestiva), enquanto que as isoformas *TAp63/73* e $\Delta Np63/73$ apenas foram encontradas nas brânquias e no músculo. Após 3 dias de exposição, a concentração de 0,1 mg/L foi capaz de aumentar significativamente a transcrição da *p53* na glândula digestiva dos animais, no entanto, não foram observadas diferenças na expressão desta isoforma nas brânquias e músculo. Para a isoforma *TAp63/73*, uma diminuição na transcrição do mRNA foi observada nas brânquias após 1 e 7 dias de exposição para a concentração de 0,1mg/L, já no músculo, não houve alteração significativa desta isoforma. Em relação à $\Delta Np63/73$, a diminuição significativa dos níveis de mRNA foi observada após 1, 3 e 7 dias nas brânquias e após 1 dia de exposição no músculo, sendo ambas as concentrações suficientes para influenciar os níveis de mRNA neste tecido. Por mais que poucas informações sejam encontradas na literatura sobre esse assunto em invertebrados, acredita-se que a família da p53 atue de modo similar ao encontrado para os vertebrados, onde um balanço entre a expressão das isoformas é observado, assim como uma expressão tecido-específica.

Palavras-chave: isoformas p53, bivalves, chumbo, expressão gênica

Introdução

Ecossistemas marinhos e estuarinos são ambientes vulneráveis à poluição. Devido aos avanços no desenvolvimento econômico e urbano, diversos resíduos são produzidos e têm como destino final os rios, lagos e mares. Atualmente, altos níveis de metais encontrados nos ambientes aquáticos não ocorrem somente através de ação natural, mas são intensificados pela ação antrópica (Belabed et al., 2013).

Em consequência do aumento das atividades antrópicas, como a produção em larga escala das indústrias, a mineração e a implantação de uma agricultura moderna, muitos resíduos são gerados e liberados no ambiente causando toxicidade na fauna local, inclusive mortalidade (Auffret et al., 2006; Belabed et al., 2013). Dentre esses resíduos, o chumbo, que é um metal pesado, tem sido encontrado em concentrações elevadas em alguns ambientes, devido ao seu emprego em diversas áreas industriais (Nordberg et al., 2007).

Nesse sentido, os organismos que habitam estes locais devem sobreviver em ambientes críticos para a manutenção da sua homeostase, sendo a toxicidade e a persistência do chumbo um agravante. Em alguns trabalhos, já foi observado que esse metal tem a capacidade de causar dano direto e indireto ao DNA, estresse oxidativo e mudanças no padrão de expressão de genes (Monteiro et al., 2011; Xu et al., 2008; Zhang et al., 2014). Em caso de dano de DNA, por exemplo, quebras simples nas ligações entre os nucleotídeos podem surgir. Caso não haja o reparo destes danos, durante a replicação do DNA, a informação poderia ser passada às células-filha erroneamente, resultando em mutações. Além da indução do processo de câncer, essas mutações podem alterar proteínas, induzir morte celular e ainda bloquear a transcrição

de diversos genes (Hoeijmakers, 2001). Logo, um complexo sistema de reparo que é responsável por eliminar danos causados à molécula de DNA se torna importante.

Dentre os diferentes sistemas de reparo já descritos, a proteína p53 pode ser considerada uma peça fundamental frente ao dano de DNA. Nesse contexto, a proteína p53 (DeLeo et al., 1979; Lane & Crawford, 1979; Linzer & Levine, 1979) é de extrema importância para os organismos. Descoberta por acaso em 1979, a proteína é, até hoje, considerada uma das “guardiãs do genoma”, já que pode impedir que uma célula com o genoma danificado se replique (Lane, 1992). Inicialmente indicada como supressora de tumor (Baker et al., 1989), possui como funções principais a sinalização para a parada do ciclo celular e a apoptose. Em ambos os casos, a p53 exerce sua função indiretamente, através de sua ação como fator de transcrição, promovendo a regulação de genes envolvidos em tais processos (Kastan et al., 1991; Ko & Prives, 1996; Yonish-Rouach et al., 1991).

Apesar de estar presente tanto em vertebrados quanto em invertebrados, o conhecimento sobre sua estrutura e modo de ação ainda estão mais concentrados em vertebrados, principalmente mamíferos (Ko & Prives, 1996; Rutkowski et al., 2010; Vousden & Lu, 2002). No entanto, acredita-se que o gene ancestral da p53 em anêmonas-do-mar já possuía a função de defesa contra o dano de DNA de células germinativas e que essa função se manteve ao longo do tempo e se distribuiu por diversos grupos animais (Belyi et al., 2010).

A proteína p53 é bem conservada ao longo da evolução, apresentando quatro domínios principais (Fig. 1) (Millau et al., 2009). A região N-terminal contém o domínio de transativação, sendo crucial para a regulação da atividade da p53 através de alterações pós-traducionais, principalmente por fosforilação, e também é o local de interação com outras importantes proteínas reguladoras, como a MDM2 (Murine double

minute 2) (Momand et al., 1992). A região que segue o domínio de transativação é o domínio de ligação ao DNA que é onde ocorre a interação da proteína com sequências específicas no DNA através de um motivo do tipo “*zinc finger*” (Pavletich et al., 1993). Já a região C-terminal pode ser dividida em outros dois domínios: o de oligomerização, responsável pela interação entre moléculas de p53 formando dímeros e tetrâmeros, e o básico, que apresenta dois sinais de localização nuclear que acabam regulando sua translocação para o núcleo e conseqüentemente sua atividade como fator de transcrição (Nicholls et al., 2002).

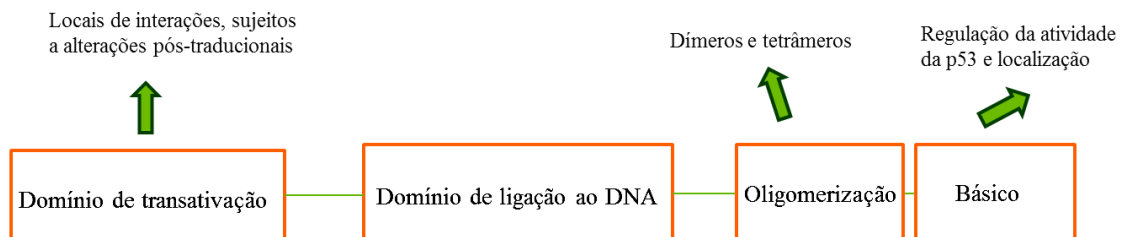


Figura 1 – Esquema da estrutura da proteína p53, com destaque para os seus quatro domínios. O domínio de transativação é o principal local de interação com outras proteínas bem como alterações pós-traducionais. O domínio de ligação ao DNA é extremamente conservado e é o local de interação com o DNA. Em seguida, o domínio de oligomerização e o básico são responsáveis pela formação dos dímeros e tetrâmeros e pela alteração da localização intracelular da p53, respectivamente. Adaptado de Millau et al., 2009.

É interessante ressaltar que mutações pontuais podem ser encontradas ao longo dos domínios da p53, impedindo a sua atuação como supressora de tumores. Na revisão de Saha e colaboradores (2015) foi possível observar que em alguns casos, a perda de função da p53 em vertebrados ocorre devido à substituição de um aminoácido por outro, o que faz com que a estabilidade, a conformação e o transporte da p53 fiquem comprometidos. Com relação aos invertebrados, alguns trabalhos já tentaram demonstrar que a proteína p53 de moluscos bivalves, por exemplo, quando comparada

com as de humanos, são estruturalmente semelhantes possuindo regiões conservadas como o local de ligação para o MDM2, o sítio de fosforilação, o domínio rico em prolinas e outros (Kelley et al., 2001). Dessa forma, alterações pontuais seriam suficientes para provocar um mau funcionamento da mesma.

Em condições normais, a concentração de p53 é mantida em níveis basais, sendo degradada em seguida de sua produção (Jones et al., 1995). Isso acontece devido à formação de um complexo entre a proteína p53 e a sua principal proteína reguladora MDM2, a qual sinaliza a p53 para a ubiquitinação e posterior degradação (Kubbutat et al., 1997). Quando a célula é exposta a um agente genotóxico, algumas vias de sinalização intracelular podem ser ativadas resultando na ativação de quinases específicas que interagem com o domínio de transativação da proteína p53 e fosforilam resíduos de aminoácidos chave nesta região. Esta fosforilação da p53 provoca o desligamento da proteína MDM2, resultando na diminuição de sua degradação e consequente acúmulo desta proteína na célula (Fig. 2) (Kubbutat et al., 1997).

Um modelo de ativação que pode ser citado é aquele provocado pela radiação ultravioleta. No trabalho de Kastan e colaboradores (1991) pôde ser observado que havia um aumento na concentração de p53 quando células de mamíferos eram expostas a esse agente se comparadas àquelas que não haviam sido expostas. Resposta semelhante pôde ser observada quando expuseram essas células à actinomicina-D, um outro potencial agente genotóxico. O dano provocado pelo UV, percebido mais tarde por Jimenez e colaboradores (1999), desencadeava uma resposta de interação das quinases específicas ATM (“*Ataxia telangiectasia Mutated*”), ATR (“*Ataxia telangiectasia and Rad3-related*”) e Chk1 (“*Checkpoint kinase 1*”) com o domínio de transativação da proteína.

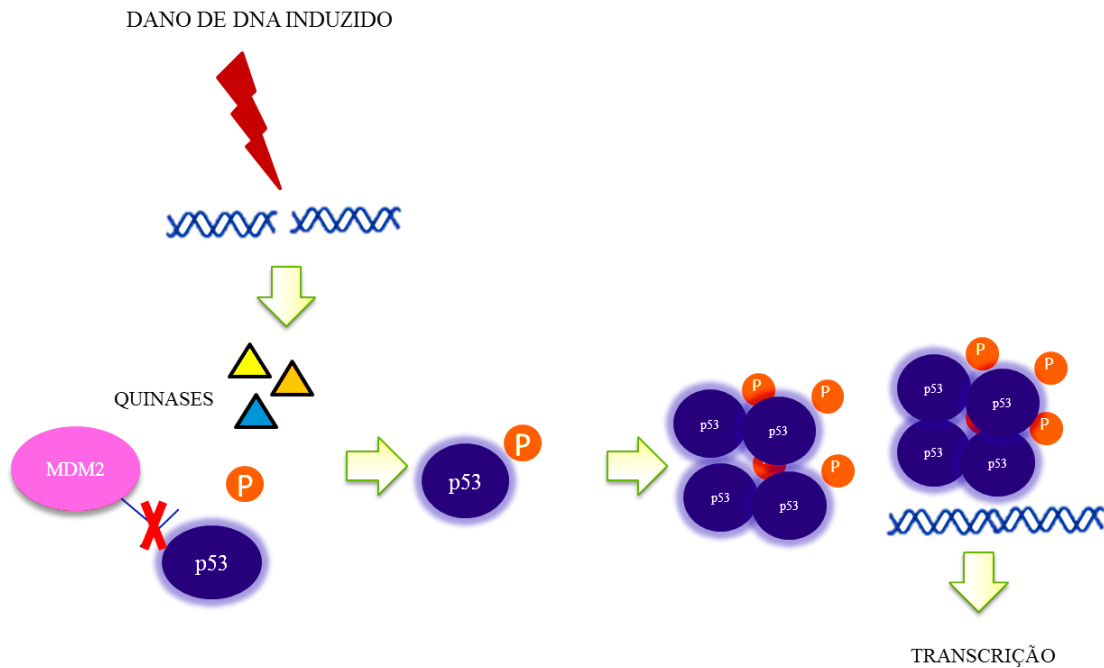


Figura 2 – Ativação da p53 através de um dano de DNA. Quando ocorre um dano no genoma do organismo, quinases intracelulares específicas são recrutadas para o local do dano e ativadas, provocando a ativação de uma cascata de sinalização. Em consequência desta ativação, a proteína p53 é fosforilada e o resultado é o desligamento do complexo mantido pela proteína MDM2 que sinaliza a p53 para ubiquitinação e posterior degradação. Uma vez desligada deste complexo, a p53 começa a se acumular na células, resultando na regulação da transcrição de genes-alvo. Adaptado de Alberts et al., 2010.

Desta forma, a proteína p53 ao ser ativada forma tetrâmeros e migra para o núcleo celular, onde ocorre a interação com o DNA e conseqüentemente, a regulação da transcrição de genes importantes na resposta ao dano de DNA, tais como os genes envolvidos com a parada do ciclo celular e apoptose (Millau et al., 2009). Neste sentido, a principal função da p53 é induzir genes a alterarem seu padrão de expressão em decorrência de danos ao genoma tanto em vertebrados quanto em invertebrados. Diversos trabalhos vêm demonstrando que, além da radiação UV, a hipóxia, as drogas citotóxicas e contaminantes ambientais também podem ter efeito sobre este importante mecanismo envolvendo a p53 (Banni et al., 2009; Graeber et al., 1994; Miguel et al., 2007).

Em vertebrados, diversos estudos tem sido publicados tentando relacionar o processo de câncer com a proteína p53, já que em cerca de 50% dos casos de câncer em humanos este gene se encontra mutado e produzindo uma proteína incapaz de gerar sua resposta clássica de supressora de tumor. No entanto, em invertebrados, o modelo de ação descrito anteriormente para a p53, inclusive sua participação em processos semelhantes ao câncer ainda não é totalmente entendido. Sendo assim, alguns estudos investigam a relação da p53 com uma doença chamada de neoplasia hemocítica. Nos trabalhos de Muttray e colaboradores (2008) e Ruiz e colaboradores (2013), com os bivalves *Mytilus trossulus* e *Cerastoderma edule*, um aumento na expressão do gene da p53 em hemócitos de animais neoplásicos foi observado. Estes resultados indicam uma possível relação da p53 com o desenvolvimento de neoplasias também em invertebrados.

Além disto, parece que a participação desta proteína na resposta a danos induzidos por poluentes ambientais também ocorre em invertebrados. No estudo de Di e colaboradores (2011) e Ruiz e colaboradores (2012) com mexilhões *Mytilus edulis* expostos ao benzo[a]pireno e ao óleo diesel, respectivamente, foi visto que a expressão da p53 foi aumentada em função da exposição aos poluentes.

Já foi observado em vertebrados que a família da p53 ainda conta com duas outras proteínas, denominadas p63 (Yang et al., 1998) e p73 (Yang et al., 2000). Estruturalmente semelhantes à p53, ambas apresentam um domínio de transativação, um domínio de ligação ao DNA extremamente conservado e um domínio de oligomerização. Em seguida, apresentam uma região responsável por interações proteína-proteína, chamada de SAM (“sterile alpha motif”) e uma região responsável por suprimir a atividade de transcrição, chamada de PSAM (post-“sterile alpha motif”),

ambos não sendo encontrados na proteína p53. Ainda, os genes *p63* e *p73* de mamíferos apresentam dois promotores cada um, os quais acabam regulando a produção de duas classes distintas de proteínas: um primeiro grupo chamado de TAp63 e TAp73, o qual possuem isoformas com o domínio de transativação, e outro de $\Delta Np63$ e $\Delta Np73$, que possuem isoformas com uma região N-terminal truncada. Embora pouco se saiba ainda sobre estes dois grupos de isoformas, alguns estudos revelaram que, pelo menos algumas delas (principalmente as truncadas) poderiam agir como reguladoras negativas da atividade da proteína p53 (Yang et al., 2002).

Em invertebrados, a estrutura da família bem como o modelo de ação da p53 parece ser mais simples que em vertebrados. Entretanto ainda existem poucas informações disponíveis para este grupo animal. Até o presente momento, sabe-se que a família p53 em moluscos bivalves é codificada por apenas um gene, denominado de *p63/73*, e que este, através de mecanismos de splicing alternativo pode dar origem a três isoformas diferentes (Fig. 3). As isoformas *p53*, *TAp63/73* e $\Delta Np63/73$ são diferentes estruturalmente e parecem também estar relacionadas com respostas ao estresse celular (Belyi et al., 2010; Muttray et al., 2007).

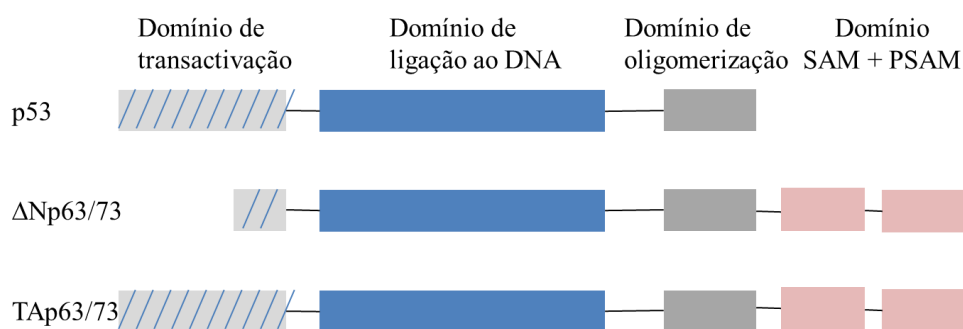


Figura 3 – Esquema possível das estruturas das proteínas p53, $\Delta Np63/73$ e TAp63/73 em invertebrados. Adaptado de Muttray et al., 2008.

Até agora, as isoformas *p53*, *TAp63/73* e $\Delta Np63/73$ foram descritas para algumas espécies de moluscos bivalves, dentre elas *Mya arenaria* e *Mytilus edulis* (Kelley et al., 2001; Muttray et al., 2007). Por mais que a maioria dos trabalhos tente relacionar a expressão das mesmas com o processo de câncer, acredita-se que estas três isoformas atuem de forma coordenada como um sistema de resposta a estressores do organismo.

Como poucas informações são encontradas sobre as isoformas em invertebrados, principalmente em moluscos bivalves, acredita-se que mais estudos deveriam ser realizados, visando preencher lacunas que nos ajudem a compreender melhor a ação dessa família na resposta ao dano em invertebrados.

1. Objetivo

Considerando o exposto anteriormente, o presente trabalho teve como objetivo investigar o padrão de expressão do mRNA das três isoformas da família p53 (*p53*, *TAp63/63* e *Δp63/73*) no bivalve marinho *Mytilus edulis* exposto ao chumbo.

1.1. Objetivos específicos

- Avaliar a expressão gênica das três isoformas (*p53*, *TAp63/63* e *Δp63/73*) nos diferentes tecidos de *M. edulis* (brânquias, músculo e glândula digestiva) a fim de observar um padrão de expressão tecido-específico;
- Avaliar a expressão gênica das três isoformas (*p53*, *TAp63/63* e *Δp63/73*) nos diferentes tecidos de *M. edulis* após exposição às concentrações de chumbo de 0,01mg/L e 0,1mg/L Pb.

2. ARTIGO

Tissue-specific mRNA expression of p53 family in *Mytilus edulis* exposed to lead

Manuscrito a ser submetido para a revista Aquatic Toxicology

Fator de impacto: 3,513

Tissue-specific mRNA expression of p53 family in *Mytilus edulis* exposed to lead

Amanda da Silveira Guerreiro^a, Regina Coimbra Rola^a, Daniela Volcan Almeida^b,
Juliana Zomer Sandrini^{a,*}.

^a Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas – Fisiologia Animal
Comparada, ICB. Universidade Federal do Rio Grande - FURG, Av. Itália km 8, 96203-
900, Rio Grande, RS, Brazil.

^b Instituto de Oceanografia. Universidade Federal do Rio Grande - FURG, Av. Itália km
8, 96203-900, Rio Grande, RS, Brazil.

E-mail address:

amandahg@gmail.com (Amanda da Silveira Guerreiro);

reh.coimbra@yahoo.com.br (Regina Coimbra Rola);

danivolcan@pq.cnpq.br (Daniela Volcan Almeida);

juzomer@pq.cnpq.br (Juliana Zomer Sandrini)

* Corresponding author:

juzomer@pq.cnpq.br

+55 (53) 32935162

Av. Itália Km 8 - Campus Carreiros

CEP 96203-900

Rio Grande/RS – Brazil

Abstract

Lead is a persistent environmental pollutant that can induce DNA damage and changes in expression pattern of many genes. Among them, genes related to *p53* family are central in cellular responses induced by DNA damage. So, this study was carried out with the aim of analyze the effects of lead on the expression pattern of *p53*, *TAp63/73* and $\Delta Np63/73$ isoforms in different tissues of the mussel *Mytilus edulis*. Animals were exposed to lead (0, 0.01 and 0.1 mg/L Pb) and the tissue-specific expression was evaluated at 1, 3 and 7 days of exposure. Considering the tissue distribution of these isoforms, *p53* was detected in all tissues analyzed (gills, digestive gland and muscle), while *TAp63/73* and $\Delta Np63/73$ isoforms were detected only in gills and muscle. After 3 days of exposure to 0.1 mg Pb/L, an up-regulation ($p < 0.05$) in mRNA levels of *p53* in the digestive gland was observed when compared to control mussels. No differences were observed for mRNA levels of this isoform in gills or muscle. Conversely, mRNA levels of *TAp63/73* isoform were down-regulated only in gills of animals exposed for 1 and 7 days to lead (0.1 mg/L). $\Delta Np63/73$ isoform was also down-regulated by lead exposure in gills (after 1, 3 and 7 days) and muscle (after 1 day of exposure). Accordingly with the results found in this study, the expression is tissue-specific and the balance between the isoforms may be crucial against stressful conditions. Moreover, this family of proteins may have similar features with vertebrates.

Keywords: heavy metal, p53 isoforms, mRNA levels, mussels

Introduction

Marine ecosystems are highly vulnerable to pollution, principally those near the coastal areas (Adams, 2005; Belabed et al., 2013). Anthropogenic activities are the main releaser of these pollutants which can impair the health of the biota and generate toxicity in aquatic animals (Adams, 2005; Auffret et al., 2006).

Lead, among pollutants, is a heavy metal that has a widespread usage, being used, for example, in paints and industrial batteries (Nordberg et al., 2007). Besides, it is toxic and persistent in the environment, being capable of induce DNA damage, oxidative stress and changes in expression pattern of many genes both in vertebrates (Xu et al., 2008; Monteiro et al., 2011) and invertebrates (Lee et al., 2006; Ha & Choi, 2008; Pan et al., 2011; Liu et al., 2014).

Due to the toxicity of this metal, DNA damage is a process that is usually observed in lead toxicity. In this context, p53 is an important protein in cellular response to DNA damage. The p53 protein (DeLeo et al., 1979; Lane & Crawford, 1979; Linzer & Levine, 1979) is an important tumor suppressor (Baker et al., 1989) that is modulated in response to a wide range of stressors (Kastan et al., 1991; Graeber et al., 1994; Miguel et al., 2007; Di et al., 2011). Considering the importance of p53 in cancer development, the mechanisms involved in its regulation are largely investigated in vertebrates, mainly mammals. Usually, p53 is maintained at low levels in cells through its binding to MDM2 (Murine double minute 2) protein (Kubbutat et al., 1997). The main signal for p53 activation is DNA damage. In this sense, when a genotoxic damage occurred, p53 is phosphorylated at specific aminoacids residues by kinases like ATM (*Ataxia telangiectasia Mutated*) and ATR (*Ataxia telangiectasia* and Rad3-related),

which result in MDM2 release from p53 and its consequent activation and accumulation in cells (Kubbutat et al., 1997; Jimenez et al., 1999). In consequence of its activation, p53 protein could interact with DNA and regulate the expression of genes involved in cell cycle control and apoptosis. In addition, several studies have indicated that the activated p53 protein could, in turns, regulate the expression of *p53* gene (Benoit et al., 2000). Moreover, several studies have demonstrated that pollutants, such as metals and polycyclic aromatic hydrocarbons, can trigger the activation of this gene in vertebrates, causing accumulation of p53 protein and consequent altered gene expression (Luzio et al., 2013; Williams & Hubberstey, 2014).

In vertebrates, the p53 protein family consists of p53, p63 (Yang et al., 1998) and p73 (Yang et al., 2000). Considering that p63 and p73 proteins share important structural and functional homologies with p53, they also have a role on cell cycle arrest and apoptosis, being important in the maintenance of genetic stability (Kastan et al., 1991; Yang et al., 1998; Flores et al., 2002). In vertebrates, this family retained the functions of the ancestral hybrid gene *p63/73* and took on additional attributes in order to protect the organism (Belyi et al., 2010).

Considering the knowledge regarding p53 family for invertebrates, a single *p63/73* hybrid gene can be observed. For these organisms, the alternative splicing of the transcripts of this gene resulted in different isoforms, like *p53* and *TAp63/73* isoforms (Belyi et al., 2010). In fact, for some bivalves like *Mytilus edulis*, a third splicing variant, called $\Delta Np63/p73$, have been described (Muttray et al., 2007). This last isoform possesses a truncated N-terminal region.

Although the process of activation and function of p53 family members are understood principally for mammals, some studies with other animal groups have

indicated that functions presented by this family are maintained (Belyi et al., 2010). In fact, several components of p53 pathway known in humans are also found in molluscan genome, highlighting the similarities in functions of p53 among these organisms (Walker et al., 2011). Nevertheless, the roles of *TAp63/73* and *ΔNp63/73* isoforms are still unknown in these organisms. Considering the important functions presented by members of p53 family and the capability of lead in promoting DNA damage, the aim of this study was to evaluate the expression pattern of p53 family members (*p53*, *TAp63/73*, and *ΔNp63/73* isoforms) in the mussel *Mytilus edulis* exposed to lead.

Methods

Animals

Blue mussels *Mytilus edulis* were collected at Cassino's beach in southern littoral of Rio Grande do Sul (Brazil) (-32.29°18'68"S, -52.26°03'67"W). The animals were immediately transported to the laboratory where they were maintained in aerated tanks, with seawater at salinity 35 and temperature of 20°C. Animals were feeding every two days with phytoplankton *Thalassiosira weissfloggi* and then water was 100% renewed. The animals were kept at these conditions for 14 days before the beginning of the experiments.

Exposure to lead

For exposure, animals were transferred to 2L glass aquaria at a final density of 2.5 animals/L and the experiment was conducted in triplicates (three glass aquaria per treatment) at the same conditions described above. Mussels were exposed to three concentrations of lead (as $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$), corresponding to 0 (control), 0.01 and 0.1 mg Pb/L, for up to 7 days. These concentrations were chosen based in previously work done by the group. At days 1, 3 and 7 after the beginning of the exposure, five mussels

of each group were dissected and different tissues (gills, muscle and digestive gland) were separated and stored at -80°C for the isolation of total RNA.

Quantitative Real-time PCR

Total RNA extraction was carried out using Trizol Reagent (Invitrogen) following manufacturer's instructions. The quantification was performed using a spectrophotometer (Thermo Electron Corp.) and RNA integrity was evaluated through electrophoresis on 1% agarose gel stained with ethidium bromide. The cDNA was synthesized using High Capacity Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems).

Gene expression was analyzed by Real-time PCR using a 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). PCR reactions were carried out using GoTaq® qPCR Master Mix (Promega) and diluted cDNA (1:10). The obtained cDNA was used as a template for amplification of *p53*, *TAp63/73* and *ΔNp63/73* isoforms using primers described in Table 1. The elongation factor 1 alpha (*ef1α*) and ribosomal RNA 28S were used as housekeeping genes to normalize data (mean of Cts values from these two genes). The gene expression was calculated by the $2^{-\Delta C_t}$ method as instructed in Schmittgen & Livak (2008). Quantitative real-time PCR with cDNA serial dilutions were performed for all primers to test reaction efficiency. Melting curves were analyzed after amplification reactions and single amplification products were present in all of the reactions.

Statistical analysis

All statistical analysis were carried out in Statistic7 program. Data are expressed as the mean \pm standard error and were analyzed by ANOVA followed by Newman Keuls multiple range test. Significance level was set at $p < 0.05$ and the analysis assumptions (normality and variance homogeneity) were previously verified. For Non-

parametrical data, it was applied the Kruskal-Wallis test ($p < 0.05$) instead of one-way ANOVA followed by the post-hoc of multiple comparisons of mean ranks for all groups. For muscle samples, considering that it was only two experimental group, it was applied a Student t-test ($p < 0.05$).

Results

Under normal conditions, *p53* mRNA was detected in all tissues analyzed (Fig. 1A). On the other hand, mRNA of *TAp63/73* and $\Delta Np63/73$ isoforms was detected only in gills and muscle but not in digestive gland. For these two isoforms, the highest mRNA levels were observed in gills when compared to muscle (Fig. 1B and C).

In order to evaluate the effects of lead on the expression of these isoforms in *M. edulis*, the mRNA levels of gills, muscle and digestive gland were analyzed at 1, 3 and 7 days after lead exposure. Even though the expression of *p53* isoform was seen in gills, there were no significant differences at any time among control and lead-treated samples (Fig. 2A). In muscle samples, the same result was observed (Fig. 2B). However, in the digestive gland, a significant increase in the expression of this isoform was observed after 3 days of exposure to 0.1 mg Pb /L (Fig. 2C).

After 1 and 7 days of exposure, there was a significant decrease in mRNA levels of *TAp63/73* isoform in gills in the highest concentration of lead (0.01 mg/L) compared to the control (Fig. 3A). Considering muscle samples, lead didn't change mRNA levels of this isoform in any experimental time (Fig. 3B). As pointed out before, the expression of this isoform in digestive gland of *M. edulis* was undetectable.

Considering the mRNA levels of $\Delta Np63/73$ isoform, a down-regulation was observed in gills after lead exposure. After 1 and 7 days of exposure, the highest concentration of lead was able to decrease the $\Delta Np63/73$ mRNA levels in comparison to

control. After 3 days of exposure, both lead concentrations tested (0.01 and 0.1 mg Pb/L) induced a down-regulation of this isoform (Fig. 4A). In muscle samples, a decrease in $\Delta Np63/73$ mRNA levels was also observed. After 1 day of exposure to the highest lead concentration, it was observed a decrease in the $\Delta Np63/73$ mRNA levels (Fig. 4B).

Discussion

As previously commented, the major role of p53 is related to the maintenance of genetic stability, protecting the organisms from a wide range of stressors. In this context, p53 influences damaged cells to undergo apoptosis or cell cycle arrest, through regulation of the expression of different genes. However, the understanding about p53 is mainly for vertebrate species. In this sense, the knowledge regarding the regulation and functions of p53 family for invertebrate species are limited, mainly for others isoforms like *TAp63/73* and $\Delta Np63/73$.

Considering mollusk bivalves, some studies demonstrated that p53 isoform is distributed among different tissues. In the study of Kelley and colleagues (2001), it was demonstrated that p53 protein expression was observed normally in gills, digestive gland, mantle and gonads of the mussel *Mya arenaria*. Similarly, Di and colleagues (2011) detected *p53* mRNA in gills, adductor muscle, digestive gland and mantle of *M. edulis*. According to these authors (Di et al., 2011), the highest mRNA levels for this isoform can be observed in gills and digestive gland. Considering that these organs play important physiological and toxicological roles, they are the main targets for chemicals present in aquatic environment. Hence, cells in those tissues are more likely to be exposed to contaminants and respond to different stressors (Ciacci et al., 2012).

In the present study, *p53* isoform was also expressed in all tissues analyzed (gills, digestive gland and muscle). However, no significant differences were observed among these tissues. Considering the tissue distribution of *p53*, similar responses were found in vertebrates, where *p53* is widely distributed among tissues, including liver (Xu et al., 2008; Ruiz et al., 2012) and gills (Luzio et al., 2013).

Considering the others members of *p53* family, *TAp63/73* and $\Delta Np63/73$ isoforms were not ubiquitously expressed in all organs analyzed in the present study. Both isoforms had higher expression levels in gills, followed by muscle. Despite the capacity of digestive gland to respond to many chemicals, the expression of both isoforms was not detected in this organ. It is important to notice that no other study was found in the literature comparing mRNA levels of *TAp63/73* and $\Delta Np63/73$ isoforms among different organs/tissues of marine bivalves. Only a few studies were found concerning detection of *TAp63/73* and $\Delta Np63/73$ mRNA levels in bivalves, especially in haemocytes (Muttray et al., 2008).

This fact demonstrates that little information about these isoforms is known for invertebrate species. In vertebrates, the genes of *p53* family did not seem to have a ubiquitously expression (Yang et al., 1998; Dellavalle et al., 2001). For example, in humans, the non-transactivating form of *p63*, $\Delta Np63$, was found predominantly in thymus, skin and placenta (Dellavalle et al., 2001), while the *TAp63* isoform principally in cerebellum, testis and kidney (Yang et al., 1998). These differences in tissue distribution of *p53* family members could be related to different functions exerted by each one, which could occur also for invertebrates.

Considering the importance of *p53* and others members of this family on maintenance of genetic stability, it is important to know the effects of different

genotoxic insults, like environmental contaminant exposure, to these proteins, both on mRNA and protein levels. In this context, many studies have shown that cells respond differently, concerning p53 mRNA or protein levels, when exposed to a variety of contaminants. In vertebrates, Chen and colleagues (2014) showed that liver cells of zebrafish (*Danio rerio*) exposed for 3h to cadmium did not change the mRNA levels of this gene. However, a down-regulation of the expression of this gene was observed after longer exposure times for the same authors (Chen et al., 2014). In another study with *D. rerio*, Luzio and colleagues (2013) observed that copper also influenced the transcript levels of *p53*, being capable of up-regulating it when the animals were exposed to this stressor for 6h. For *Scophthalmus maximus*, another fish species, it was observed that mRNA levels of *p53* was up-regulated only after 14 days of exposure to heavy fuel oil (Ruiz et al., 2012). Several others studies with vertebrate species have demonstrated similar results, indicating that up-regulation of *p53* mRNA levels was a common response of cells after exposure to different environmental contaminant.

Considering these effects on invertebrate species, again much less information is available. Banni and colleagues (2009) showed that mussels (*Mytilus* sp.) exposed for 24 h to benzo[a]pyrene did not change the mRNA levels of p53-family members neither in the gills, muscle or mantle. Nevertheless, an up-regulation in digestive gland was observed for these authors (Banni et al., 2009). However, it is important to clarify that in this study (Banni et al., 2009) primers that bind to a highly conserved central domain, unable to differentiate among isoforms, was used. It is interesting to note that similar results were also found in bivalves affect by a haemic neoplasia. In *Cerastoderma edule*, another marine bivalve, animals with this neoplasia increased the mRNA levels of *p53* in the digestive gland in comparison to non-neoplastic animals (Ruiz et al.,

2013). In the present study, similar result was observed only in digestive gland of animals after 3 days of exposure to the highest concentration of lead. On the other hand, opposite results were found by Di and colleagues (2011). In this study, mussels *M. edulis* exposed to benzo[a]pyrene for 6 and 12 days down-regulated the mRNA levels of *p53* in digestive gland. This may suggest that expression of *p53* in mussels like *M. edulis* is regulated in a tissue and time specific manner.

Even though the up-regulation of *p53* in the present study was only observed in the digestive gland after 3 days of exposure to lead, it is interesting to note that *p53* still can be post-transcriptionally regulated. This is mainly understood for vertebrates where *p53* is phosphorylated at specific serine residues and conformational changes occur, resulting in *p53* activation (Shaulsky et al., 1990). This process induces a *p53* migration to nucleus and those signals caused by protein-protein interaction and post-translational modifications trigger the regulation of expression of target genes. In the study of Williams and Hubberstey (2014) with the fish *Ameiurus nebulosus*, it was observed that the protein levels of *p53* were higher in animals fed with benzo[a]pyrene. In this sense, Choi and colleagues (2010) studied both mRNA and protein levels of *p53* in zebrafish exposed to nanoparticles of silver. According to the authors, mRNA levels of *p53* remained the same, however, at protein levels, an up-regulation was observed in the highest concentration analyzed. These studies with vertebrate species indicated that, even when there are no changes in mRNA levels, a post-transcriptional regulation of *p53* occurs and the protein levels are up-regulated after some cellular stresses. Regarding the presence of this mechanism in invertebrates, some evidences are available (Walker et al., 2011). However, even though this process may occur in invertebrates, the mechanisms underlying it are not clearly elucidated.

Concerning the regulation of other isoforms of p53 family, only a few information is available. In vertebrates, some studies described that alternative splicing of p53-family genes (*p63* and *p73*) produced many isoforms involved in regulation of complex biological processes (Petitjean et al., 2008). In keratinocytes of rats exposed to ultraviolet radiation, the protein level of $\Delta Np63\alpha$ isoform increased slightly after 6h, but a dramatic decrease occurred after 12h of exposition (Liefer et al., 2000). Liefer and colleagues (2000) also showed that when overexpressing $\Delta Np63\alpha$ isoform, the ability of p53 to induce apoptosis was compromised, indicating that it is necessary to have a balance among the members of this family in vertebrates. Petitjean and colleagues (2008) also suggests that, in vertebrates, this balance exists and it is essential for the cell survival.

The studies of other isoforms in invertebrate species are even more limited. In mollusk, the results are restricted to its relation to haemic neoplasia. In the study of Muttray and colleagues (2008), it was observed that neoplastic haemocytes showed elevated mRNA levels of *p53* and $\Delta Np63/73$ isoforms when compared to normal haemocytes. They found out that up-regulating $\Delta Np63/73$ isoform may interfere in functions of p53 and $TAp63/73$, as well as demonstrated for vertebrates in the work of Liefer and colleagues (2000). In the present study it was possible to observe a down-regulation in mRNA levels of both isoforms $TAp63/73$ and $\Delta Np63/73$ in gills and muscle when the animals were exposed to lead. In this sense, the down-regulation of $\Delta Np63/73$ isoform observed in those organs may contribute to a higher activity of p53, indicating that the cell response against lead exposure is occurring in a similar process to vertebrates.

Conclusion

In conclusion, we could demonstrate that when bivalves were exposed to lead, changes in the expression pattern of *p53* isoforms were observed. Our results suggest that a tissue-specific expression and a balance between the isoforms exist and that is a crucial step in cellular homeostasis considering exposure to environmental contaminants. In a general point of view, *p53* isoform was up-regulated in digestive gland, a tissue that was not detected mRNA of others isoforms, while *TAp63/73* and $\Delta Np63/73$ are down-regulated in gills and muscle. These results suggest some similarities with vertebrates, where the balance between isoforms may regulate apoptosis or cell cycle arrest in response to genotoxic stimuli.

Acknowledgements

This work was supported by Brazilian CNPq. Amanda S. Guerreiro and Regina C. Rola are graduate fellows from Brazilian CAPES and Daniela V. Almeida are research fellow from Brazilian CAPES/FAPERGS (DOCFIX).

References

- Adams, S.M., 2005. Assessing cause and effect of multiple stressors on marine systems. *Mar. Pollut. Bull.* 51, 649-657.
- Auffret, M., Rousseau, S., Boutet, I., Tanguy, A., Baron, J., Moraga, D., Duchemin, M. 2006. A multiparametric approach for monitoring immunotoxic responses in mussels from contaminated sites in Western Mediterranean. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 63, 393 – 405.
- Baker, S.J., Fearon, E.R., Nigro, J.M., Hamilton, S.R., Preisinger, A.C., Jessup, J.M., vanTuinen, P., Ledbetter, D.H., Barker, D.F., Nakamura, Y., White, R.,

- Vogelstein, B., 1989. Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* 244, 217-221.
- Banni, M., Negri, A., Rebelo, M., Rapallo, F., Boussetta, H., Viarengo, A., Dondero, F., 2009. Expression analysis of the molluscan p53 protein family mRNA in mussels (*Mytilus* sp.) exposed to organic contaminants. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* 149, 414-418.
- Belabed, B., Laffray X., Dhib, A., Fertouna-Belakhal, M., Turki, S., Aleya, L. 2013. Factors contributing to heavy metal accumulation in sediments and in the intertidal mussel *Perna perna* in the Gulf of Annaba (Algeria). *Mar. Pollut Bull.* 74, 477-489.
- Belyi, V., Ak, P., Markert, E., Wang, H., Hu, W., Puzio-Kuter, A., Levine, A.J., 2010. The origins and evolution of the p53 family of genes. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2:a001198
- Benoit, V., Hellin A-C, Huygen, S., Gielen, J., Bours, V., Merville, M-P., 2000. Additive effect between NF- κ B subunits and p53 protein for transcriptional activation of human p53 promoter. *Oncogene* 19, 4787-4794.
- Chen, Y.Y., Zhu, J.Y., Chan, K.M., 2014. Effects of cadmium on cell proliferation, apoptosis, and proto-oncogene expression in zebrafish liver cells. *Aquat. Toxicol.* 157, 196-206.
- Choi, J.E., Kim, S., Ahn, J.H., Youn, P., Kang, J.S., Park, K., Yi, J., Ryu, D-Y. 2010. Induction of oxidative stress and apoptosis by silver nanoparticles in the liver of adult zebrafish. *Aquat. Toxicol.* 100, 151-159.
- Ciacci C., Barmo, C., Gallo, G., Maisano, M., Cappello, T., D'Agata, A., Leonzio, C., Mauceri, A., Fasulo, S., Canesi, L., 2012. Effects of sublethal,

- environmentally relevant concentrations of hexavalent chromium in the gills of *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat Toxicol.* 120-121, 109-118.
- DeLeo, A.B., Jay, G., Appella, E., Dubois, G.C., Law, L.W., Old, L.J. 1979. Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76, 2420-2424.
- Dellavalle, R.P., Egbert, T.B., Marchbank, A., Su, L-J., Lee, L.A., Walsh, P., 2001. *CUSP/p63* expression in rat and human tissues. *J. Dermatol. Sci.* 27. 82-87.
- Di, Y., Schroeder, D.C., Highfield, A., Readman, J.W., Jha, A.N., 2011. Tissue-specific expression of p53 and ras genes in response to the environmental genotoxicant Benzo[a]pyrene in marine mussels. *Environ. Sci. Technol.* 45, 8974-8981.
- Flores, E.R., Tsai, K.Y., Crowley, D., Sengupta, S., Yang, A., McKeon, F., Jacks, T., 2002. p63 and p73 are required for p53-dependent apoptosis in response to DNA damage. *Nature* 416, 560-565.
- Graeber, T.G., Peterson, J.F., Tsai, M., Monica, K., Fornace, A.J., Giaccia, A.J., 1994. Hypoxia induces accumulation of p53 protein, but activation of a G1-phase checkpoint by low-oxygen conditions is independent of p53 status. *Mol. Cell. Biol.* 14, 6264-6277.
- Ha, M-H., Choi, J., 2008. Effects of environmental contaminants on hemoglobin of larvae of aquatic midge, *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae): A potential biomarker for ecotoxicity monitoring. *Chemosphere* 71, 1928-1936.
- Jimenez, G.S., Bryntesson, F., Torres-Arzayus, M.I., Priestley, A., Beeche, M., Saito, S., Sakaguchi, K., Appella, E., Jeggo, P.A., Taccioli, G.E., Wahl, G.M., Hubank, M., 1999. DNA-dependent protein kinase is not required for the p53-dependent response to DNA-damage. *Nature* 400, 81-83.

- Kastan, M.B., Onyekwere, O., Sidransky, D., Vogelstein, B., Craig, R.W., 1991. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res.* 51, 6304-6311.
- Kelley, M.L., Winge, P., Heaney, J.D., Stephens, R.E., Farrell, J.H., Beneden, R.J.V., Reinisch, C. L., Lesser, M.P., Walker, C.W., 2001. Expression of homologues for p53 and p73 in the softshell clam (*Mya arenaria*), a naturally-occurring model for human cancer. *Oncogene* 20, 748-758.
- Kubbutat, M.H.G., Jones, S.N., Vousden, K.H., 1997. Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* 387, 299-303.
- Lane, D.P., Crawford, L.V., 1979. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 278, 261-263.
- Lee, S-M., Lee, S-B., Park, C-H, Choi, J., 2006. Expression of heat shock protein and hemoglobin genes in *Chironomus tentans* (Diptera, chironomidae) larvae exposed to various environmental pollutants: A potential biomarker of freshwater monitoring. *Chemosphere* 65, 1074-1081.
- Liefer, K.M., Koster, M.I., Wang, X-J., Yang, A., McKeon, F., Roop, D.R., 2000. Down-regulation of p63 is required for epidermal UV-B-induced apoptosis. *Cancer Res.* 60, 4016-4020.
- Linzer, D.I.H., Levine, A.J., 1979. Characterization of a 54k Dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* 17, 43-52.
- Liu, N., Wang, L., Yan B., Li Y., Ye F., Li J., Wang, Q., 2014. Assessment of antioxidant defense system responses in the hepatopancreas of the freshwater crab *Sinopotamon henanense* exposed to lead. *Hydrobiologia* 741, 3-12.

- Luzio, A., Monteiro, S.M., Fontainhas-Fernandes, A.A., Pinto-Carnide, O., Matos, M., Coimbra, A.M., 2013. Copper induced upregulation of apoptosis related genes in zebrafish (*Danio rerio*) gill. *Aquat. Toxicol.* 128-129, 183-189.
- Miguel, N.C.O., Wajsenzou, I.J.R., Takiya, C.M., Andrade, L.R., Tortelote, G.G., Einicker-Lamas, M., Allodi, S., 2007. Catalase, Bax and p53 expression in the visual system of the crab *Ucides cordatus* following exposure to ultraviolet radiation. *Cell Tissue Res.* 329, 159-168.
- Monteiro, V., Cavalcante, D.G.S.M., Viléla, M.B.F.A., Sofia, S.H., Martinez, C.B.R. 2011. *In vivo* and *in vitro* exposures for the evaluation of the genotoxic effects of lead on the Neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Aquat. Toxicol.* 104, 291-298.
- Muttray, A.F., Cox, R.L., Reinisch, C.L., Baldwin, S.A., 2007. Identification of DeltaN isoform and polyadenylation site choice variants in molluscan *p63/p73*-like homologues. *Mar. Biotech.* 9, 217-230.
- Muttray, A.F., Schulte, P.M., Baldwin, S.A., 2008. Invertebrate p53-like mRNA isoforms are differentially expressed in mussel haemic neoplasia. *Mar. Environ. Res.* 66, 412-421.
- Nordberg, G.F., Fowler, B.A., Nordberg, M., Friberg, L. 2007. Handbook on the toxicology of metals. 3^a ed. Elsevier.
- Pan, L., Liu, N., Zhang, H., Wang, J., Miao, J., 2011. Effects of heavy metal ions (Cu^{2+} , Pb^{2+} and Cd^{2+}) on DNA damage of the gills, hemocytes and hepatopancreas of Marine Crab, *Charybdis japonica*. *J. Ocean Univ. China* 10, 177-184.
- Petitjean, A., Ruptier, C., Tribollet, V., Hautefeuille, A., Chardon, F., Cavard, C., Puisieux, A., Hainaut, P., Fromentel, C.C., 2008. Properties of six isoforms of

- p63: p53-like regulation in response to genotoxic stress and cross talk with $\Delta Np73$. *Carcinogenesis* 29, 273-281.
- Ruiz, P., Orbea, A., Rotchell, J.M., Cajaraville, M.P., 2012. Transcriptional responses of cancer-related genes in turbot *Scophthalmus maximus* and mussels *Mytilus edulis* exposed to heavy fuel n°6 and styrene. *Ecotoxicol.* 21, 820-831.
- Ruiz, P., Díaz, S., Orbea, A., Carballal, M.J., Villalba, A., Cajaraville, M.P., 2013. Biomarkers and transcriptional levels of cancer-related genes in cockles *Cerastoderma edule* from Galicia (NW Spain) with disseminated neoplasia. *Aquat. Toxicol.* 136-137, 101-111.
- Schmittgen, T.D., Livak, K.J., 2008 Analyzing real-time PCR data by the comparative Ct method. *Nat. Protoc.* 3, 1101-1108.
- Shaulsky, G., Goldfinger, N., Ben-Ze'ev, A., Rotter, V., 1990. Nuclear accumulation of p53 protein is mediated by several nuclear localization signals and plays a role in tumorigenesis. *Mol. Cell. Biol.* 10, 6565-6577.
- Xu, J., Lian, L, Wu, C., Wang, X., Fu, W., Xu, L. 2008. Lead induces oxidative stress, DNA damage and alteration of p53, Bax and Bcl-2 expressions in mice. *Food Chem. Toxicol.* 46, 1488-1494.
- Walker, C.W., Beneden, R.J.V., Muttray, A.F., Böttger, S.A., Kelley, M.L., Tucker, A.E., Thomas, W.K., 2011. p53 superfamily proteins in marine bivalve cancer and stress biology. *Adv. Mar. Biol.* 59, 1-36.
- Williams, R., Hubberstey, A.V., 2014. Benzo[a]pyrene exposure causes adaptive changes in p53 and CYP1A gene expression in Brown bullhead (*Ameiurus nebulosus*). *Aquat. Toxicol.* 156, 201-210.
- Yang, A., Kaghad, M., Wang, Y., Gillett, E., Fleming, M.D., Dötsch, V., Andrews, N.C., Caput, D., McKeon, F., 1998. p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes

multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Mol. Cell* 2, 305-316.

Yang, A., Walker, N., Bronson, R., Kaghad, M., Oosterwegel, M., Bonnin, J., Vagner, C., Bonnet, H., Dikkes, P., Sharpe, A., McKeon F., Caput, D., 2000. p73-deficient mice have neurological, pheromonal and inflammatory defects but lack spontaneous tumours. *Nature* 404, 99-103.

Table

Table 1: Primers sequences used for real time PCR analyses.

Accession number	Gene	Primer sequence
Z29550	<i>28S</i>	F: 5' - CTGGCCTTCACTTTCATTGTGCC – 3' R: 5'GACCCGTCTTGAAACACGGACCA – 3'
AF063420	<i>Efl-α</i>	F: 5' – CCATCGACATTGCTTTGTGGAAGTT – 3' R: 5' – TGCCTGGGGCATCAATAATGGTAA – 3'
AY579472	<i>p53</i>	F: 5' – AACGACCTCAACATCGACCA – 3' R: 5' – TCCTTGCTTTCAGGAGCAGG – 5'
DQ865150	<i>TA p63/73</i>	F: 5' - AATATGGAACTCCCGTCCAGATC – 3' R: 5' – AGCTTGTGACATTATGGGGTGA – 3'
DQ865151	<i>$\Delta Np63/73$</i>	F: 5'-AAATTTGAGAGAACTGGATTTACAACC-3' R: 5'-TGTGATTGTATCATTGTAAGGACTTGAT-3'

Figure Captions

Figure 1. Tissue expression analysis of p53 family isoforms in *Mytilus edulis*. A) Expression analysis of *p53*; B) Expression analysis of *TAp63/73* and C) expression analysis of $\Delta Np63/73$. N.D. = not detected. Equal letters indicate no significant differences ($p < 0.05$).

Figure 2. Expression analysis of *p53* in the gills (A), muscle (B) and digestive gland (C) of *Mytilus edulis* exposed to 0.01mg/L and 0.1mg/L of lead after different times of exposure. Values are relative to control group and expressed as mean \pm SE. Equal letters indicate no significant differences ($p < 0.05$). Statistical analyses were performed between each exposure time.

Figure 3. Expression analysis of the isoform *TAp63/73* in the gills (A) and muscle (B) of *M. edulis* exposed to 0.01mg/L and 0.1mg/L of lead and in different times of exposure. Values are relative to control group and expressed as mean \pm SE. Equal letters indicate no significant differences ($p < 0.05$). Statistical analyses were performed between each exposure time.

Figure 4. Expression analysis of the isoform $\Delta Np63/73$ in the gills (A) and muscle (B) of *M. edulis* exposed to 0.01mg/L and 0.1mg/L of lead after different times of exposure. Values are relative to control group and expressed as mean \pm SE. Equal letters indicate no significant differences ($p < 0.05$). Statistical analyses were performed between each exposure time.

Figure 1. Tissue expression of p53 family in *M. edulis*

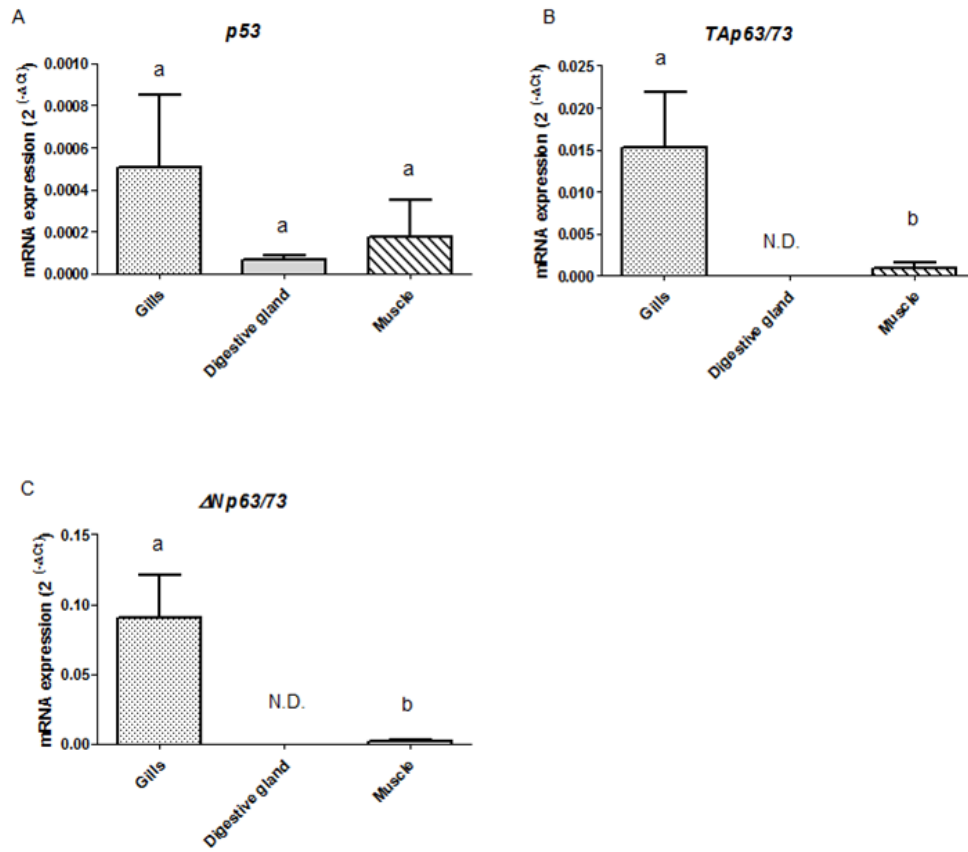


Figure 2. Expression analysis of p53 in gills, muscle and digestive gland

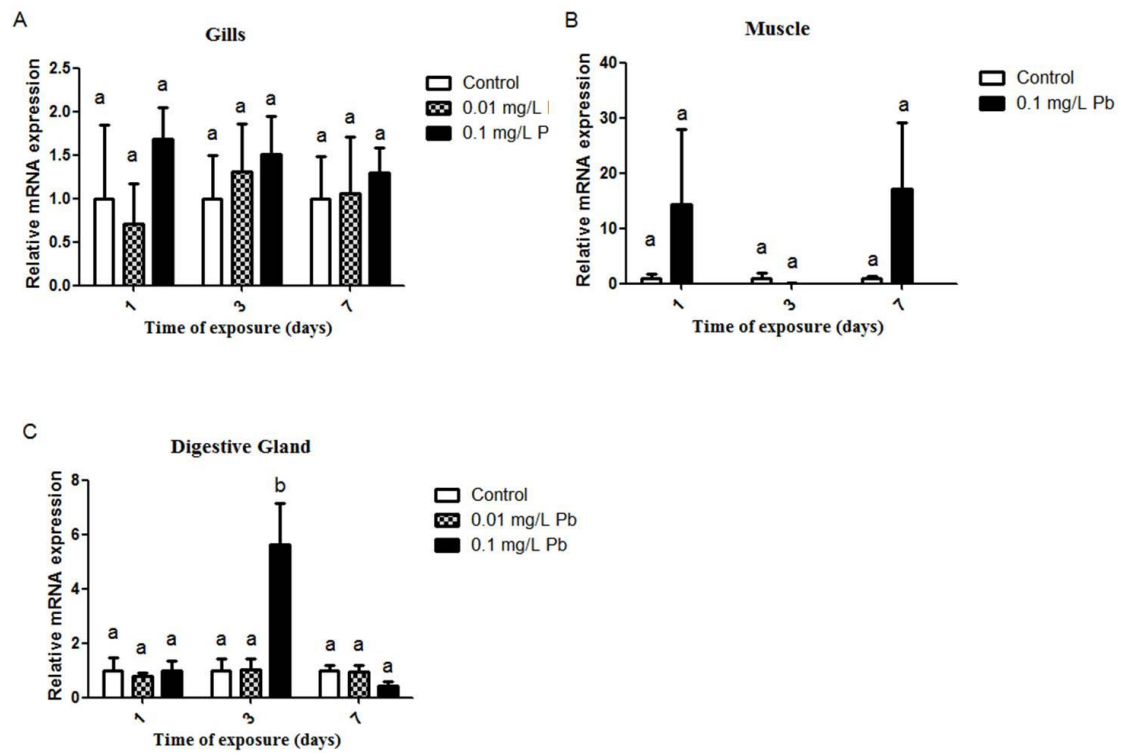


Figure 3. Expression analysis of TAp63/73 in gills and muscle

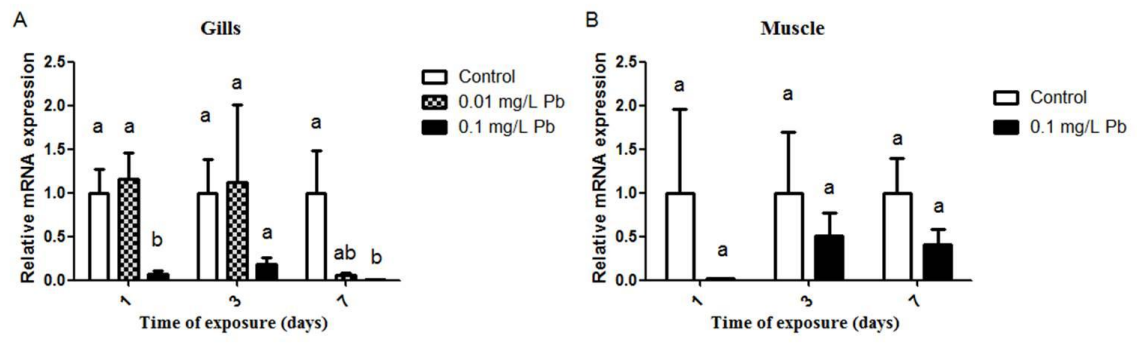
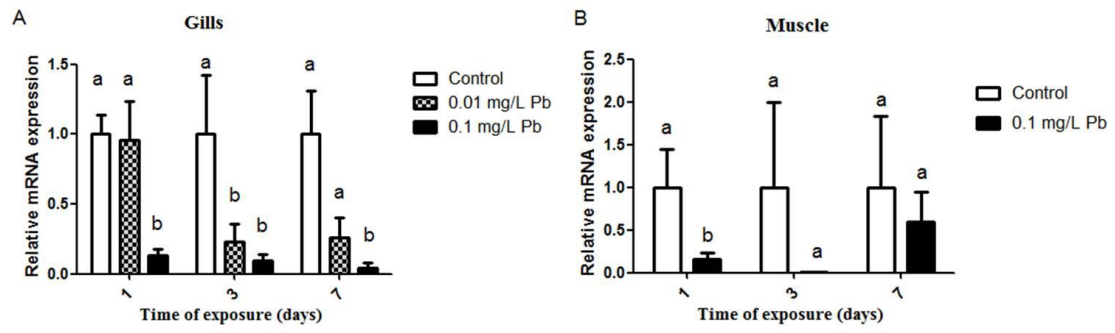


Figure 4. Expression analysis of $\Delta Np63/73$ in gills and muscle



4. Discussão geral

Como descrito nas seções anteriores, as isoformas *p53*, *TAp63/73* e $\Delta Np63/73$ parecem estar envolvidas com a proteção do organismo em função da exposição do mesmo a agentes que causam estresse genotóxico, como os contaminantes ambientais. Apesar do gene ancestral ter passado por um processo evolutivo, acredita-se que a função, uma vez encontrada em anêmonas do mar, tenha persistido em diversos grupos de animais e, em alguns, como nos vertebrados, tenha recebido atributos ainda mais importantes (Belyi et al., 2010).

Dessa maneira, sabe-se hoje que a proteína p53 tem a capacidade de modular a transcrição de diversos genes e influenciar células com o genoma danificado a entrar em apoptose ou realizar parada de ciclo celular (Kastan et al., 1991; Yonish-Rouach et al., 1991). Apesar desse conhecimento bem difundido sobre a função da p53, o que se sabe sobre sua estrutura e regulação é basicamente para vertebrados, principalmente mamíferos, com poucos estudos realizados tentando elucidar seus mecanismos regulatórios e modo de ação em invertebrados. Em humanos, três genes da família da p53 já foram identificados (*p53*, *p63* e *p73*), enquanto que em invertebrados, principalmente moluscos bivalves, sabe-se apenas da existência de um gene (*p63/73*) que, através de splicing alternativo pode codificar três isoformas distintas (*p53*, *TAp63/73* e $\Delta Np63/73$) (Belyi et al., 2010).

Com base neste panorama, o presente trabalho visou preencher uma lacuna de informações sobre essas isoformas em um grupo de invertebrados, os moluscos bivalves. Neste sentido, foi demonstrado que a isoforma *p53* não teve sua expressão aumentada significativamente em termos de níveis de mRNA, na maioria dos tecidos e tratamentos com o chumbo, muito embora tenha havido uma tendência a esse aumento.

Na glândula digestiva, no entanto, após 3 dias de exposição ao chumbo, a modulação dos níveis de mRNA desta isoforma foram observadas, se encontrando elevados. Para as demais isoformas (*TAp63/73* e $\Delta Np63/73$), essa modulação foi mais evidente, tendo sido observada uma diminuição nos níveis de mRNA de ambas isoformas em brânquias e músculo após exposição ao chumbo.

No geral, estudos mostram respostas variáveis quanto à expressão dos membros desta família em função da exposição a contaminantes ambientais. Em vertebrados, Ruiz e colaboradores (2012) puderam demonstrar que, em peixes *Scophthalmus maximus*, os níveis de transcrição da p53 foram aumentados após 14 dias de exposição ao óleo diesel. Luzio e colaboradores (2013) também observaram um aumento na expressão da p53 em brânquias quando peixes *Danio rerio* foram expostos ao cobre por 6h. Em mamíferos, respostas semelhantes a essas foram encontradas, como no estudo de Xu e colaboradores (2008), no qual os pesquisadores puderam demonstrar que ratos expostos a diferentes concentrações de chumbo também aumentavam a expressão da p53 no fígado. Apesar deste aparente padrão de resposta em vertebrados, a bibliografia disponível também relata respostas contrárias a estas. Chen e colaboradores (2014), por exemplo, ao trabalhar com células de fígado de *D. rerio* encontraram respostas de diminuição dos níveis de mRNA da p53 quando as mesmas eram expostas por 6h, 12h e 24h ao cádmio.

Em invertebrados, principalmente em moluscos bivalves, os níveis de transcrição da isoforma p53 em função da exposição a contaminantes ambientais são ainda mais variados. Di e colaboradores (2011), por exemplo, ao expor os mexilhões *M. edulis* ao benzo[a]pireno puderam perceber que após 6h, os níveis de mRNA desta isoforma se encontravam aumentados no músculo, mas diminuído nas brânquias, na glândula digestiva e no manto. Já Ruiz e colaboradores (2012) e Banni e colaboradores

(2009) puderam demonstrar que em mexilhões *M. edulis* e *M. galloprovincialis* expostos ao óleo diesel e ao B[a]P, respectivamente, aumentaram a expressão da *p53* na glândula digestiva. É importante ressaltar que, no trabalho de Banni e colaboradores (2009), foi utilizado um par de iniciadores na técnica de PCR que reconhece uma região altamente conservada do gene, a qual todas as três isoformas possuem. Portanto, no referido trabalho os autores detectam a expressão das três isoformas ao mesmo tempo, sem diferenciá-las.

Ao comparar o presente trabalho com respostas obtidas por outros estudos, como o de Banni e colaboradores (2009) e o de Ruiz e colaboradores (2012) citados anteriormente, pode-se pensar que a resposta de expressão da isoforma *p53* é tecido-específica. Além disso, como só ocorreu após 3 dias de exposição, é possível que a resposta, ainda, seja dependente do tempo de exposição ao contaminante.

Em animais aquáticos, as brânquias são importantes vias de entrada de substâncias químicas presentes no ambiente, se tornando alvo primário dos mesmos (Akcha et al., 2004; Ciacci et al., 2012). Desse modo, esperava-se que a expressão da isoforma *p53* acabasse sendo modulada pela exposição ao chumbo nesse tecido. Então, por mais que, sob algum estresse, a resposta clássica de aumento na transcrição do gene não ocorra, os níveis proteicos da *p53* podem mesmo assim estar elevados. Kelley e colaboradores (2001) e Williams & Hubberstey (2014) demonstraram que, com diferentes estressores, tanto o bivalve marinho *M. arenaria* quanto o peixe *Ameiurus nebulosus* elevaram os níveis da proteína *p53*. Devido à capacidade da *p53* de sofrer alterações pós-traducionais, é possível que mesmo sem afetar o nível de transcrito, o chumbo possa ter influenciado a mesma em níveis protéicos. Por mais que esta análise não tenha sido realizada no presente estudo, seria interessante estudá-la futuramente já que pode ser com que a *p53* tenha aumentado seus níveis proteicos.

Além destes indícios que tentam evidenciar que a p53 é afetada de diversas formas por contaminantes ambientais, seja em nível de gene ou de proteína, outros estudos tentam relacionar a p53 com uma doença semelhante ao processo de câncer em invertebrados. Em moluscos bivalves, essa doença caracterizada como neoplasia hemocítica, afeta os hemócitos e parece estar relacionada de alguma maneira à poluição ambiental (St-Jean et al., 2005). De maneira geral, os trabalhos com bivalves já observaram que essa neoplasia parece estar relacionada com aumentos na transcrição da isoforma *p53* (Kelley et al., 2001; Muttray et al., 2008; Siah et al., 2008; St-Jean et al., 2005).

Ao focar nas demais isoformas, *TAp63* e $\Delta Np73$, podemos perceber que poucos estudos têm sido publicados até então, principalmente no que se refere a invertebrados, sendo a maioria deles focado no processo de câncer. Em vertebrados, Dellavalle e colaboradores (2001) puderam demonstrar que essas isoformas são encontradas em diversos tecidos de mamíferos, dentre eles, o cérebro, os rins e a placenta. Liefer e colaboradores (2000) sugerem haver um balanço entre a expressão das diferentes isoformas. Ao expor queratinócitos de ratos à radiação ultravioleta, uma isoforma específica, a $\Delta Np63$, apresentava uma expressão mais elevada que a *TAp63*. No entanto, ao superexpressar essa mesma isoforma ($\Delta Np63$), foi percebido que a proteína p53 perdia sua função pró-apoptótica, permitindo que células defeituosas continuassem se replicando. Em função destes resultados, chega-se a conclusão que em mamíferos, o balanço entre as isoformas parece ser crucial para o correto funcionamento de um sistema de resposta ao dano de DNA.

Corroborando com esta ideia, o presente trabalho demonstra justamente a existência desse balanço entre isoformas tecido-específica, no qual é percebido o aumento dos níveis de mRNA da *p53* na glândula digestiva, justamente o tecido que não

apresentou expressão detectável das demais isoformas, e diminuição na transcrição das demais isoformas em brânquias e músculo, dois tecidos que não apresentaram alterações na expressão da isoforma p53. Em um trabalho realizado com *M. trossulus*, Muttray e colaboradores (2008) também indicaram a existência desse balanço entre isoformas. Nesse trabalho, animais que apresentavam a neoplasia hemocítica aumentavam a expressão da p53 e da $\Delta Np63/73$, enquanto que diminuía a da isoforma $TAp63/73$. Esse aumento encontrado para a isoforma $\Delta Np63/73$ pode estar provocando uma ruptura do balanço e impedindo que a p53 atue como esperado contra condições estressantes. Em condições normais, quando não há estresse, as isoformas da família da p53 são expressas em baixos níveis e um balanço entre elas pode ser observado (Muttray et al., 2008). Dessa forma, esse processo de câncer estaria alterando este balanço entre as isoformas e impedindo a ação das mesmas. Logo, no presente estudo, acredita-se que esse balanço não se perdeu como ocorre em neoplasias, sendo possível gerar a resposta tradicional contra o dano.

Neste sentido, os resultados obtidos no presente estudo podem indicar que o chumbo estaria levando a um aumento na função da p53 tanto através do aumento da transcrição desta isoforma, no caso da glândula digestiva, quanto através da diminuição da transcrição de um provável regulador negativo de sua função (isoforma $\Delta Np63/73$), no caso das brânquias e músculo. Em conclusão, o presente trabalho pôde demonstrar que moluscos bivalves *M. edulis* expostos ao chumbo alteram os níveis de mRNA da família p53 em diferentes tecidos, sendo capaz de aumentar os níveis de mRNA da isoforma p53 em alguns tecidos e diminuir os níveis de mRNA das isoformas $TAp63/73$ e $\Delta Np63/73$ em outros tecidos. Além disto, os resultados parecem demonstrar que a regulação e as funções da família da p53 em invertebrados apresentem semelhanças com vertebrados.

Perspectivas

De acordo com o exposto acima, parecem existir semelhanças entre o modo de ação e função da p53 entre vertebrados e invertebrados. No entanto, a informação que tange aos invertebrados ainda é insipiente. Dessa forma, mais trabalhos são necessários para compreender o padrão de expressão da p53 em moluscos bivalves. Sendo assim, uma das perspectivas do presente estudo é dar continuidade ao trabalho realizado, no sentido de avaliar a expressão proteica da p53 e das demais isoformas em *M. edulis*. Além disto, é um dos objetivos futuros retomar os estudos com a outra espécie de mexilhão, o *Perna perna*. Com essa espécie, a informação é ainda mais enxuta, sendo necessária inclusive, uma identificação do gene e do padrão de expressão do mesmo. Análises que envolvam a relação entre a geração de dano de DNA e a expressão das diferentes isoformas também estão previstas, assim como a análise de outros genes que podem estar relacionados com a função p53, como os pró e anti-apoptóticos e os de parada de ciclo celular.

5. Bibliografia

- Akcha, F., Tanguy A., Leday, G., Pelluhet, L., Budzinski, H., Chiffoleau, J-F., 2004. Measurement of DNA single-strand breaks in gill and hemolymph cells of mussels, *Mytilus* sp., collected on the French Atlantic Coast. Mar. Environ. Res. 58, 753-756.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., 2010. Biologia molecular da célula. 5ª edição. Editora Artmed.
- Auffret, M., Rousseau, S., Boutet, I., Tanguy, A., Baron, J., Moraga, D., Duchemin, M. 2006. A multiparametric approach for monitoring immunotoxic responses in

mussels from contaminated sites in Western Mediterranean. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 63, 393 – 405.

Baker, S.J., Fearon, E.R., Nigro, J.M., Hamilton, S.R., Preisinger, A.C., Jessup, J.M., vanTuinen, P., Ledbetter, D.H., Barker, D.F., Nakamura, Y., White, R., Vogelstein, B., 1989. Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* 244, 217-221.

Banni, M., Negri, A., Rebelo, M., Rapallo, F., Boussetta, H., Viarengo, A., Dondero, F., 2009. Expression analysis of the molluscan p53 protein family mRNA in mussels (*Mytilus* sp.) exposed to organic contaminants. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* 149, 414-418.

Belabed, B., Laffray X., Dhib, A., Fertouna-Belakhal, M., Turki, S., Aleya, L. 2013. Factors contributing to heavy metal accumulation in sediments and in the intertidal mussel *Perna perna* in the Gulf of Annaba (Algeria). *Mar. Pollut Bull.* 74, 477-489.

Belyi, V., Ak, P., Markert, E., Wang, H., Hu, W., Puzio-Kuter, A., Levine, A.J., 2010. The origins and evolution of the p53 family of genes. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2:a001198

Chen, Y.Y., Zhu, J.Y., Chan, K.M., 2014. Effects of cadmium on cell proliferation, apoptosis, and proto-oncogene expression in zebrafish liver cells. *Aquat. Toxicol.* 157, 196-206.

Ciacci C., Barmo, C., Gallo, G., Maisano, M., Cappello, T., D'Agata, A., Leonzio, C., Mauceri, A., Fasulo, S., Canesi, L., 2012. Effects of sublethal, environmentally relevant concentrations of hexavalent chromium in the gills of *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat Toxicol.* 120-121, 109-118.

Di, Y., Schroeder, D.C., Highfield, A., Readman, J.W., Jha, A.N., 2011. Tissue-specific expression of p53 and ras genes in response to the environmental genotoxicant Benzo[a]pyrene in marine mussels. *Environ. Sci. Technol.* 45, 8974-8981.

- DeLeo, A.B., Jay, G., Appella, E., Dubois, G.C., Law, L.W., Old, L.J. 1979. Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76, 2420-2424.
- Dellavalle, R.P., Egbert, T.B., Marchbank, A., Su, L-J., Lee, L.A., Walsh, P., 2001. *CUSP/p63* expression in rat and human tissues. *J. Dermatol. Sci.* 27. 82-87.
- Graeber, T.G., Peterson, J.F., Tsai, M., Monica, K., Fornace, A.J., Giaccia, A.J., 1994. Hypoxia induces accumulation of p53 protein, but activation of a G1-phase checkpoint by low-oxygen conditions is independent of p53 status. *Mol. Cell. Biol.* 14, 6264-6277.
- Hoeijmakers, J.H.J., 2001. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411, 366-374.
- Jimenez, G.S., Bryntesson, F., Torres-Arzayus, M.I., Priestley, A., Beeche, M., Saito, S., Sakaguchi, K., Appella, E., Jeggo, P.A., Taccioli, G.E., Wahl, G.M., Hubank, M., 1999. DNA-dependent protein kinase is not required for the p53-dependent response to DNA-damage. *Nature* 400, 81-83.
- Jones, S.N., Roe, A.E., Donehower, L.A., Bradley, A. 1995. Rescue of embryonic lethality in Mdm2-deficient mice by absence of p53. *Nature* 378, 206-208.
- Kastan, M.B., Onyekwere, O., Sidransky, D., Vogelstein, B., Craig, R.W., 1991. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res.* 51, 6304-6311.
- Kelley, M.L., Winge, P., Heaney, J.D., Stephens, R.E., Farrell, J.H., Beneden, R.J.V., Reinisch, C. L., Lesser, M.P., Walker, C.W., 2001. Expression of homologues for p53 and p73 in the softshell clam (*Mya arenaria*), a naturally-occurring model for human cancer. *Oncogene* 20, 748-758.
- Ko, L.J., Prives, C., 1996. p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev.* 10, 1054-1072.
- Kubbutat, M.H.G., Jones, S.N., Vousden, K.H., 1997. Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* 387, 299-303.

- Lane, D.P., Crawford, L.V., 1979. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 278, 261-263.
- Lane, D. P., 1992. p53, guardian of the genome. *Nature* 358, 15-16.
- Liefer, K.M., Koster, M.I., Wang, X-J., Yang, A., McKeon, F., Roop, D.R., 2000. Down-regulation of p63 is required for epidermal UV-B-induced apoptosis. *Cancer Res.* 60, 4016-4020.
- Linzer, D.I.H., Levine, A.J., 1979. Characterization of a 54k Dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* 17, 43-52.
- Luzio, A., Monteiro, S.M., Fontainhas-Fernandes, A.A., Pinto-Carnide, O., Matos, M., Coimbra, A.M., 2013. Copper induced upregulation of apoptosis related genes in zebrafish (*Danio rerio*) gill. *Aquat. Toxicol.* 128-129, 183-189.
- Miguel, N.C.O., Wajsenzón, I.J.R., Takiya, C.M., Andrade, L.R., Tortelote, G.G., Einicker-Lamas, M., Allodi, S., 2007. Catalase, Bax and p53 expression in the visual system of the crab *Ucides cordatus* following exposure to ultraviolet radiation. *Cell Tissue Res.* 329, 159-168.
- Millau, J-F., Bastien, N., Drouin, R., 2009. P53 transcriptional activities: a general overview and some thoughts. *Mutat. Res.* 681, 118-133.
- Mills, A.A., Zheng, B., Wang, X., Vogel, H., Roop, D.R., Bradley, A., 1999. p63 is a p53 homolog required for limb and epidermal morphogenesis. *Nature* 398, 708-713.
- Momand, J., Zambetti, G.P., Olson, D.C., George, D., Levine, A.J., 1992. The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* 69, 1237-1245.

- Monteiro, V., Cavalcante, D.G.S.M., Viléla, M.B.F.A., Sofia, S.H., Martinez, C.B.R. 2011. In vivo and in vitro exposures for the evaluation of the genotoxic effects of lead on the Neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Aquat. Toxicol.* 104, 291-298.
- Muttray, A.F., Cox, R.L., Reinisch, C.L., Baldwin, S.A., 2007. Identification of DeltaN isoform and polyadenylation site choice variants in molluscan *p63/p73*-like homologues. *Mar. Biotech.* 9, 217-230.
- Muttray, A.F., Schulte, P.M., Baldwin, S.A., 2008. Invertebrate p53-like mRNA isoforms are differentially expressed in mussel haemic neoplasia. *Mar. Environ. Res.* 66, 412-421.
- Nicholls, C.D., McLure, K.G., Shields, M.A., Lee, P.W.K., 2002. Biogenesis of p53 involves cotranslational dimerization of monomers and posttranslational dimerization of dimers (Implications on the dominant negative effect). *J. Biol. Chem.* 277, 12937-12945.
- Nordberg, G.F., Fowler, B.A., Nordberg, M., Friberg, L. 2007. Handbook on the toxicology of metals. 3^a ed. Elsevier.
- Pavletich, N.K., Chambers, K.A., Pabo, C.O., 1993. The DNA-binding domain of p53 contains the four conserved regions and the major mutant hot spots. *Genes Dev.* 7, 2556-2564.
- Ruiz, P., Orbea, A., Rotchell, J.M., Cajaraville, M.P., 2012. Transcriptional responses of cancer-related genes in turbot *Scophthalmus maximus* and mussels *Mytilus edulis* exposed to heavy fuel n°6 and styrene. *Ecotoxicol.* 21, 820-831.
- Ruiz, P., Díaz, S., Orbea, A., Carballal, M.J., Villalba, A., Cajaraville, M.P., 2013. Biomarkers and transcriptional levels of cancer-related genes in cockles *Cerastoderma edule* from Galicia (NW Spain) with disseminated neoplasia. *Aquat. Toxicol.* 136-137, 101-111.

- Rutkowski, R., Hofmann, K., Gartner, A., 2010. Phylogeny and Function of the Invertebrate p53 Superfamily. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2:a001131.
- Saha, T., Kar, R.K., Sa, G., 2015. Structural and sequential context of p53: a review of experimental and theoretical evidence. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 1-14.
- Siah, A., Delaporte, M., Pariseau, J., McKenna, P., Berthe, F.C.J., 2008. Patterns of p53, p73 and mortalin gene expression associated with haemocyte polyploidy in the soft-shell clam, *Mya arenaria*. *J. Invertebr. Pathol.* 98, 148-152.
- St-Jean, S.D., Stephens, R.E., Courtenay, S.C., Reinisch, C.L., 2005. Detecting p53 family proteins in haemocytic leukemia cells of *Mytilus edulis* from Pictou Harbor, Nova Scotia, Canada. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 62, 2055-2066.
- Vousden, K.H., Lu, X., 2002. Live or let die: the cell's response to p53. *Nature* 2, 594-604.
- Xu, J., Lian, L, Wu, C., Wang, X., Fu, W., Xu, L. 2008. Lead induces oxidative stress, DNA damage and alteration of p53, Bax and Bcl-2 expressions in mice. *Food Chem. Toxicol.* 46, 1488-1494.
- Zhang, H., Weia, K., Zhang, M., Liu, R., Chen, Y. 2014. Assessing the mechanism of DNA damage induced by lead through direct and indirect interactions. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 136, 46-53.
- Yang, A., Kaghad, M., Wang, Y., Gillett, E., Fleming, M.D., Dötsch, V., Andrews, N.C., Caput, D., McKeon, F., 1998. p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Mol. Cell* 2, 305-316.
- Yang, A., Walker, N., Bronson, R., Kaghad, M., Oosterwegel, M., Bonnin, J., Vagner, C., Bonnet, H., Dikkes, P., Sharpe, A., McKeon F., Caput, D., 2000. p73-

deficient mice have neurological, pheromonal and inflammatory defects but lack spontaneous tumours. *Nature* 404, 99-103.

Yang, A., Kaghad, M., Caput, D., McKeon F., 2002. On the shoulders of giants: p63, p73 and the rise of p53. *Trends Genet.* 18, 90-95.

Yonish-Rouach, E., Resnitzky, D., Lotem, J., Sachs, L., Kimchi, A., Oren, M., 1991. Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature* 352, 345-346.

Williams, R., Hubberstey, A.V., 2014. Benzo[a]pyrene exposure causes adaptative changes in p53 and CYP1A gene expression in Brown bullhead (*Ameiurus nebulosus*). *Aquat. Toxicol.* 156, 201-210.