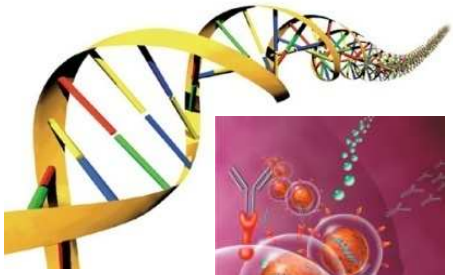
Biomarcadores moleculares de contaminação aquática

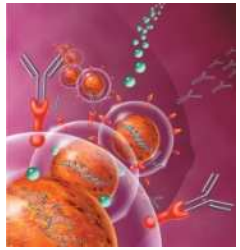
Prof.Dr.Afonso C.D. Bainy

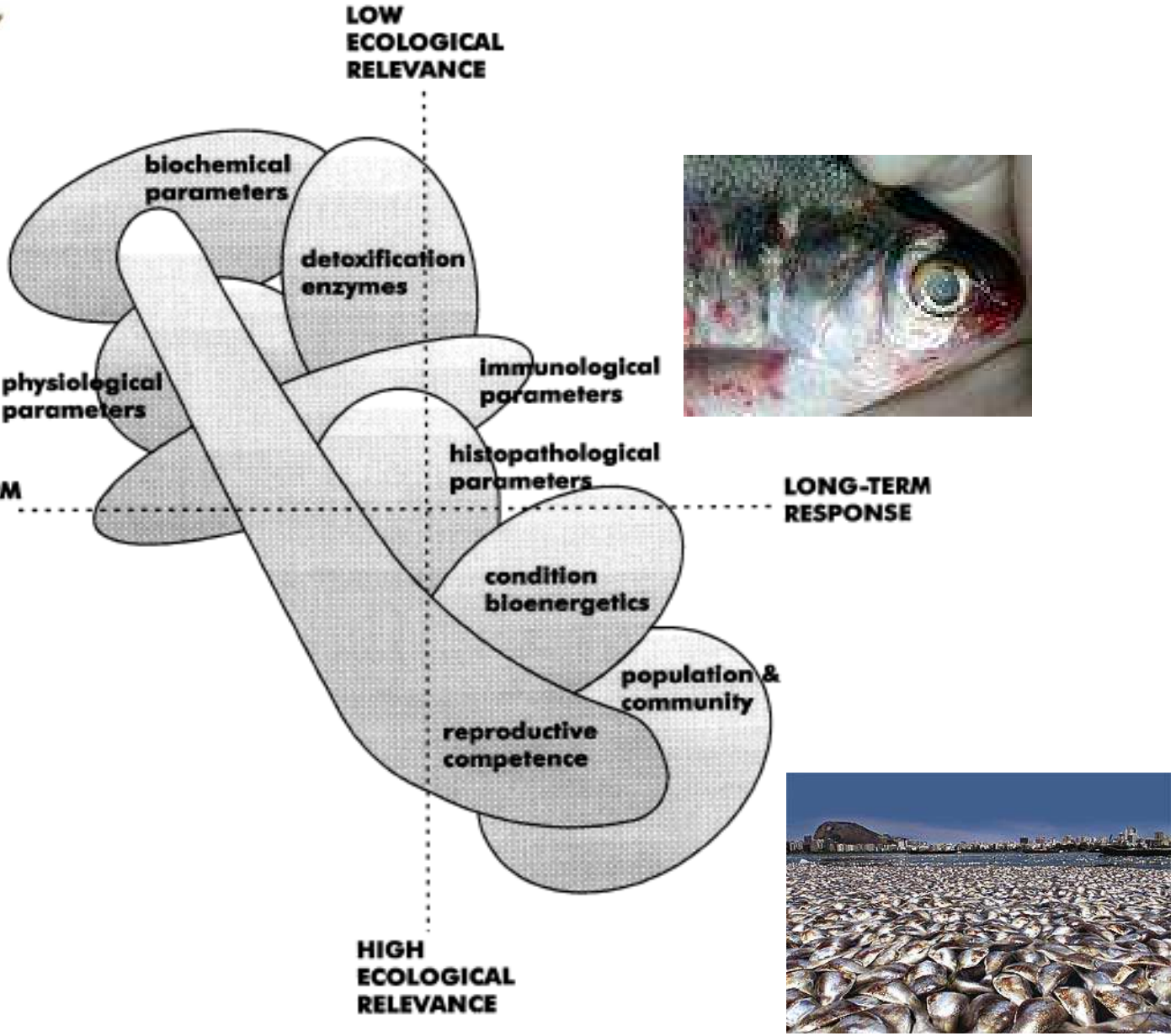
Lab. de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica
Núcleo de Estudos em Patologia Aquícola
Departamento de Bioquímica/Aquicultura
Universidade Federal de Santa Catarina
Email: bainy@mbox1.ufsc.br

Estima-se que são utilizados anualmente mais de 100.000 substâncias químicas no ambiente em todo o mundo. A maioria destes são compostos orgânicos utilizados na indústria (75%), agricultura e uso doméstico (25%).

O efeito dos contaminantes







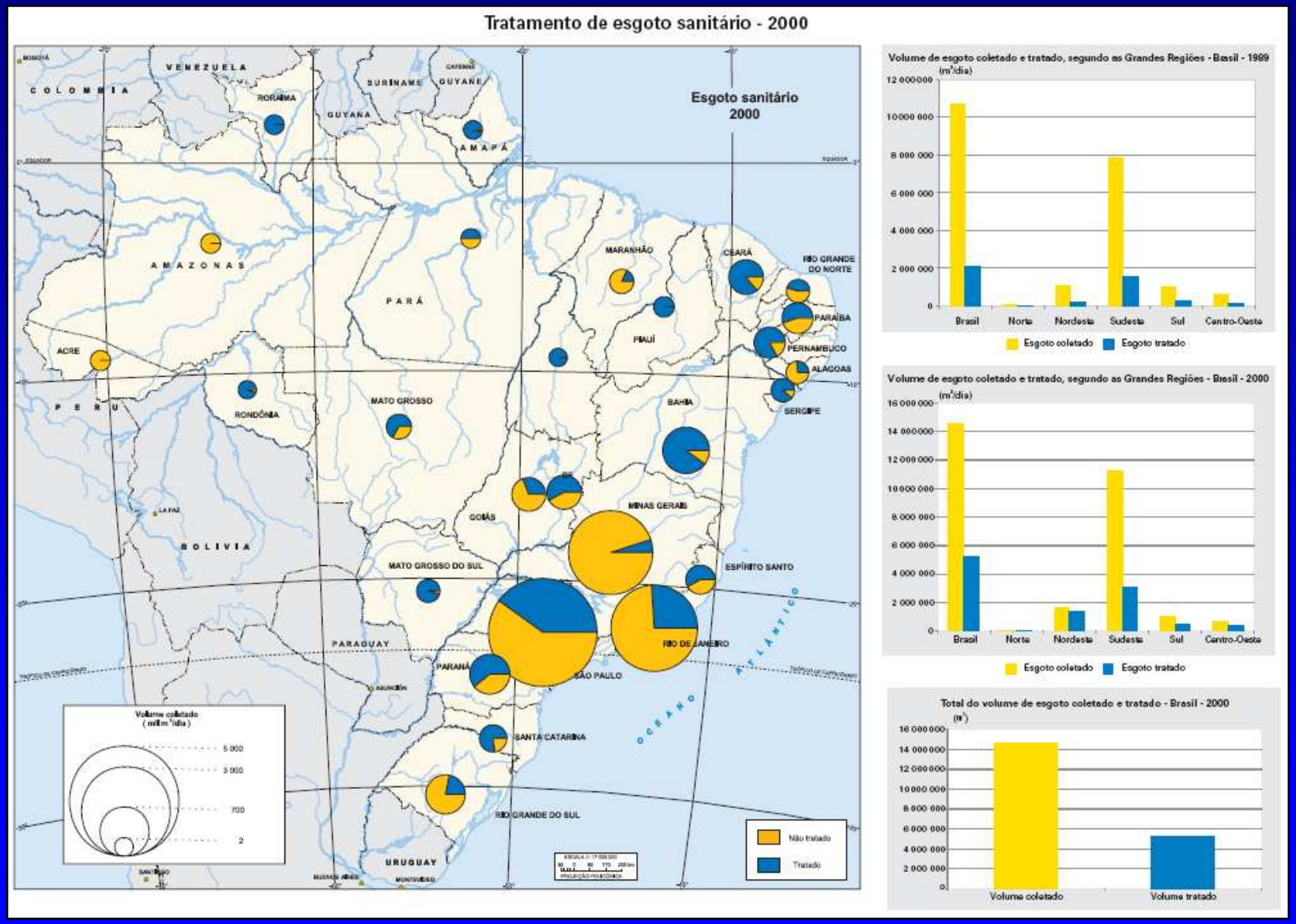
(ADAMS et al., 1989)

Esgoto Doméstico

Composição do esgoto doméstico

- Nutrientes (N, P, K)
- Altos níveis de matéria orgânica
- Metais
- Organoclorados
- Esteróides
- Produtos derivados de óleo
- Detergentes
- Produtos de uso pessoal
- Produtos farmacêuticos
- Patógenos, vírus, bactérias, parasitas, etc

Problema do Esgoto Doméstico no Brasil



IBGE, 2000

Estudos com Biomarcadores

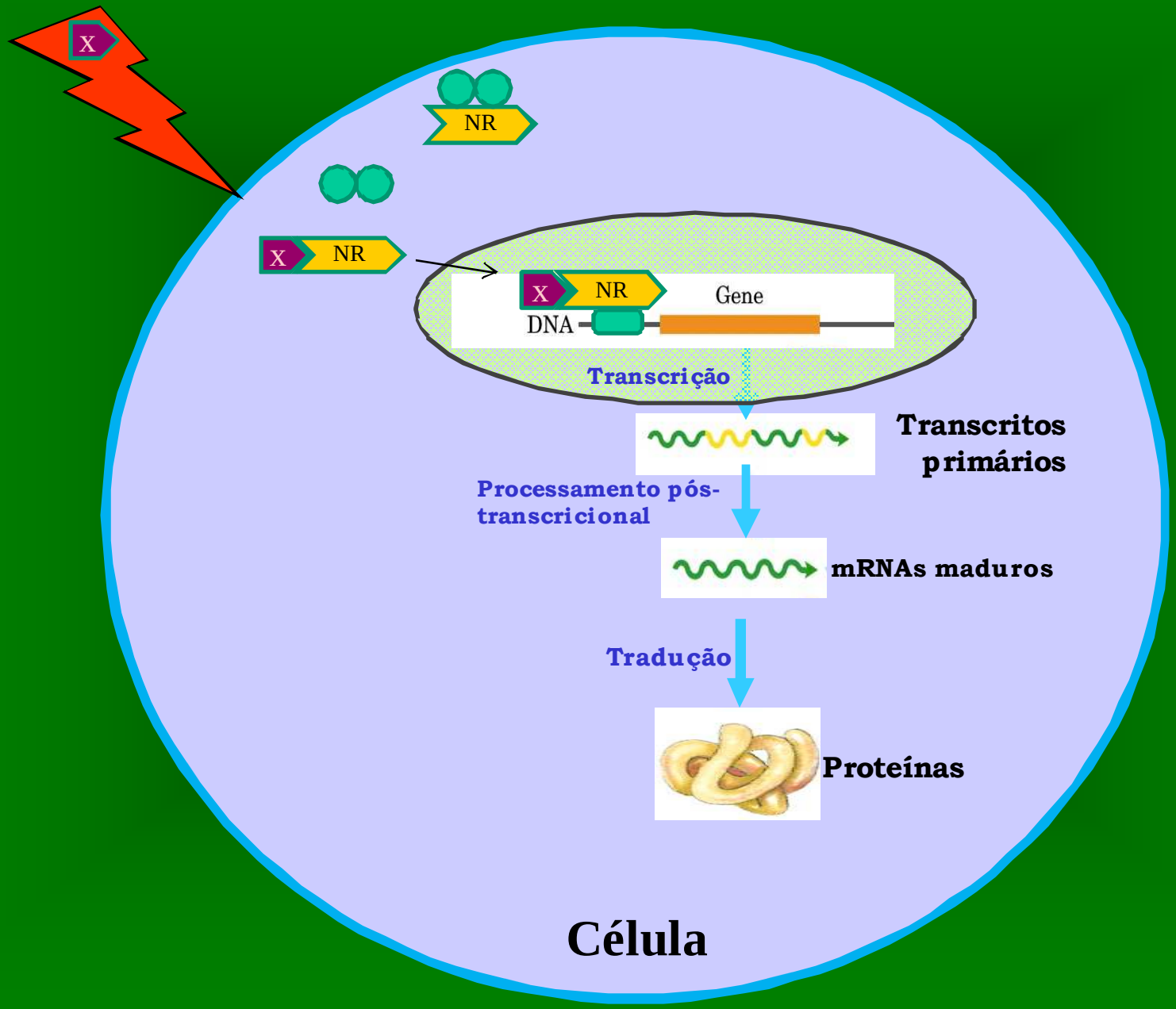
Muitas vezes alguns biomarcadores tradicionais não respondem à presença de contaminantes pois no ambiente existem misturas complexas de contaminantes.

Um conjunto de biomarcadores pode ser adequado para alguns contaminantes, mas não necessariamente para outros.

Um conjunto de biomarcadores pode ser adequado para algumas espécies, mas não responder em outras.

Dificilmente teremos espécies no ambiente que tenham sido amplamente estudadas. O que fazer?

Desafio Químico



Uma possibilidade:

Identificar múltiplos genes ou proteínas específicas de organismos referência que podem ser modificados sob diferentes condições de estresse químico e analisá-los.

Referência RNAm

Contaminado RNAm

A G U A U C
T C A T A G

RNAm / DNA

A G U A U C
T C A T A G

A G T A T C
T C A T A G

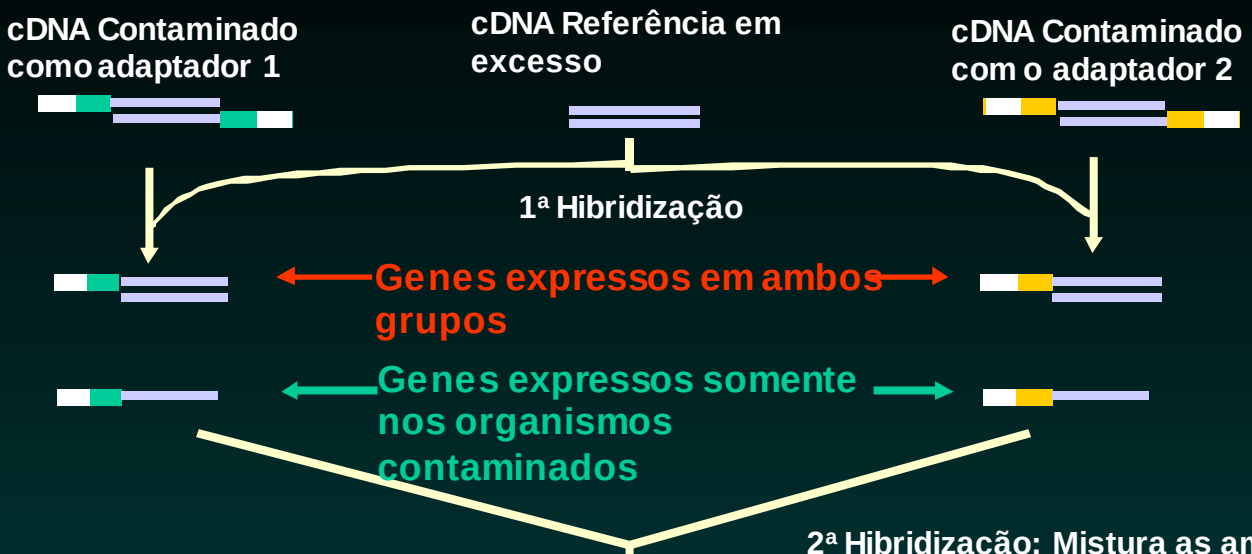
cDNA

A G T A T C
T C A T A G

Referência cDNA

Contaminado cDNA

Hibridização Subtrativa Supressiva (SSH)

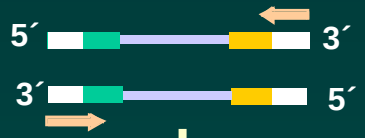


2ª Hibridização: Mistura as amostras, adiciona o cDNA referência e anela

Genes expressos somente nos organismos contaminados são hibridizados e amplificados por PCR

Genes expressos em ambos grupos são suprimidos após o PCR

Adiciona primers que se ligam aos adaptadores para amplificar os genes por PCR

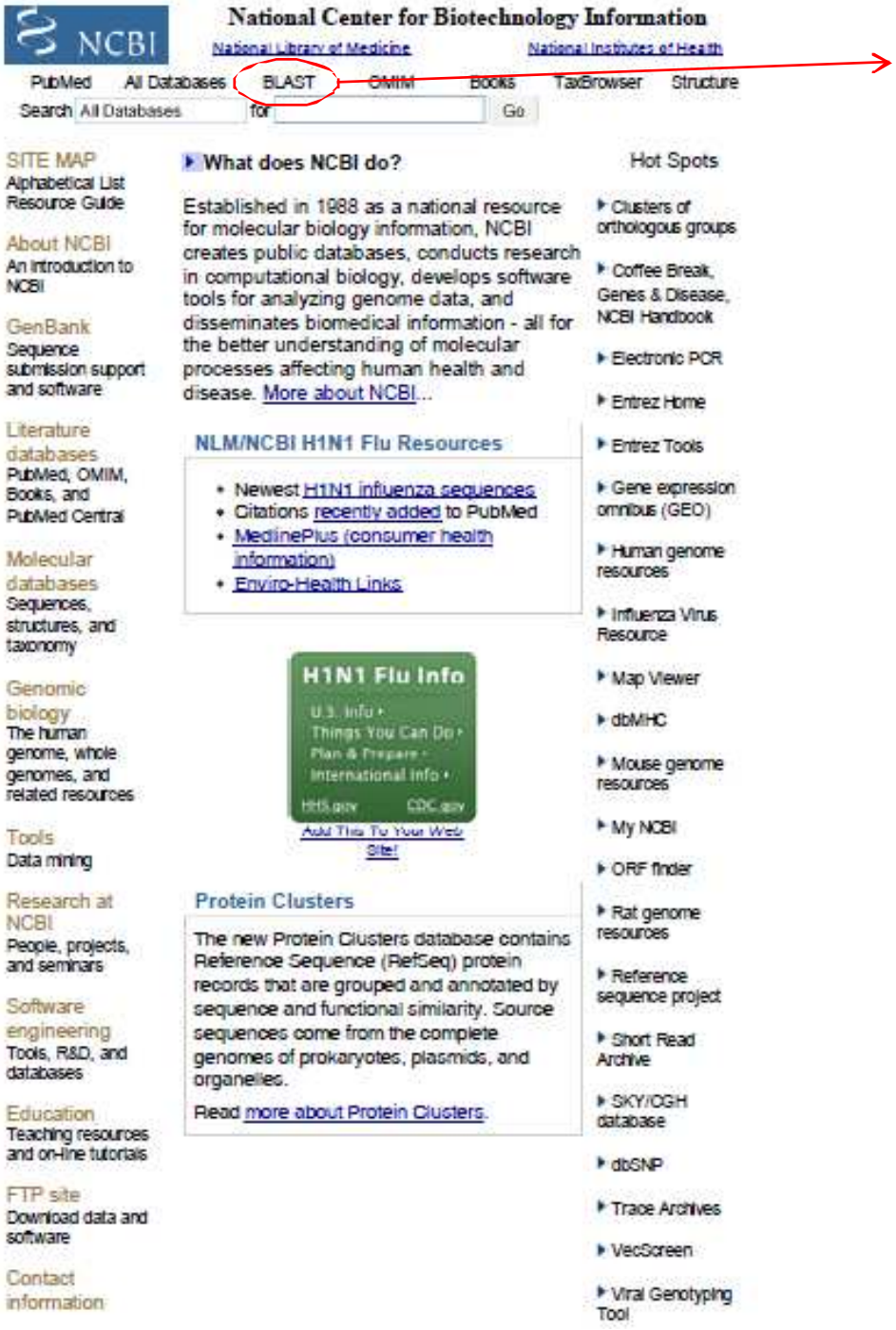


Purificação do produto de PCR

Clonagem e sequenciamento

- >sequencia_X

acatttatgcaatggagctggcgtttgatgcaatacggggccat
aagtctgcacattctttagctacaggtccagtgatagctgatcctt
tcatttctcccttattgttgactatgacccccgcattatcttcgaagt
atatgaacaccccattcttcctccgaacaggtttcctctgtcgtat
caccacagcaggcataacctttttctaagttctggctttcctttctt
gactgtggcaacaaacatgtctccagctccagcagctggcattc
tgttgaggcgacccttgataccgctgacagcgatcacaaacag
attcttggcacctgtattgtcggcacagttaatgactgcacccac
aggcaacgcgagggagatacggaacttcc



BLAST Basic Local Alignment Search Tool

BLAST finds regions of similarity between biological sequences. more...

The Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) finds regions of local similarity between sequences. The program compares nucleotide or protein sequences to sequence databases and calculates the statistical significance of matches. BLAST can be used to infer functional and evolutionary relationships between sequences as well as help identify members of gene families.

New **Designing or Testing PCR Primers?** Try your s

BLAST Assembled Genomes

Choose a species genome to search, or list all genomic BLAST databases.

- Human
- Mouse
- Rat
- *Arabidopsis thaliana*
- *Oryza sativa*
- *Bos taurus*
- *Danio rerio*
- *Drosophila melanogaster*
- *Gallus gallus*
- *Pan troglodytes*
- *Microbes*
- *Apis mellifera*

Basic BLAST

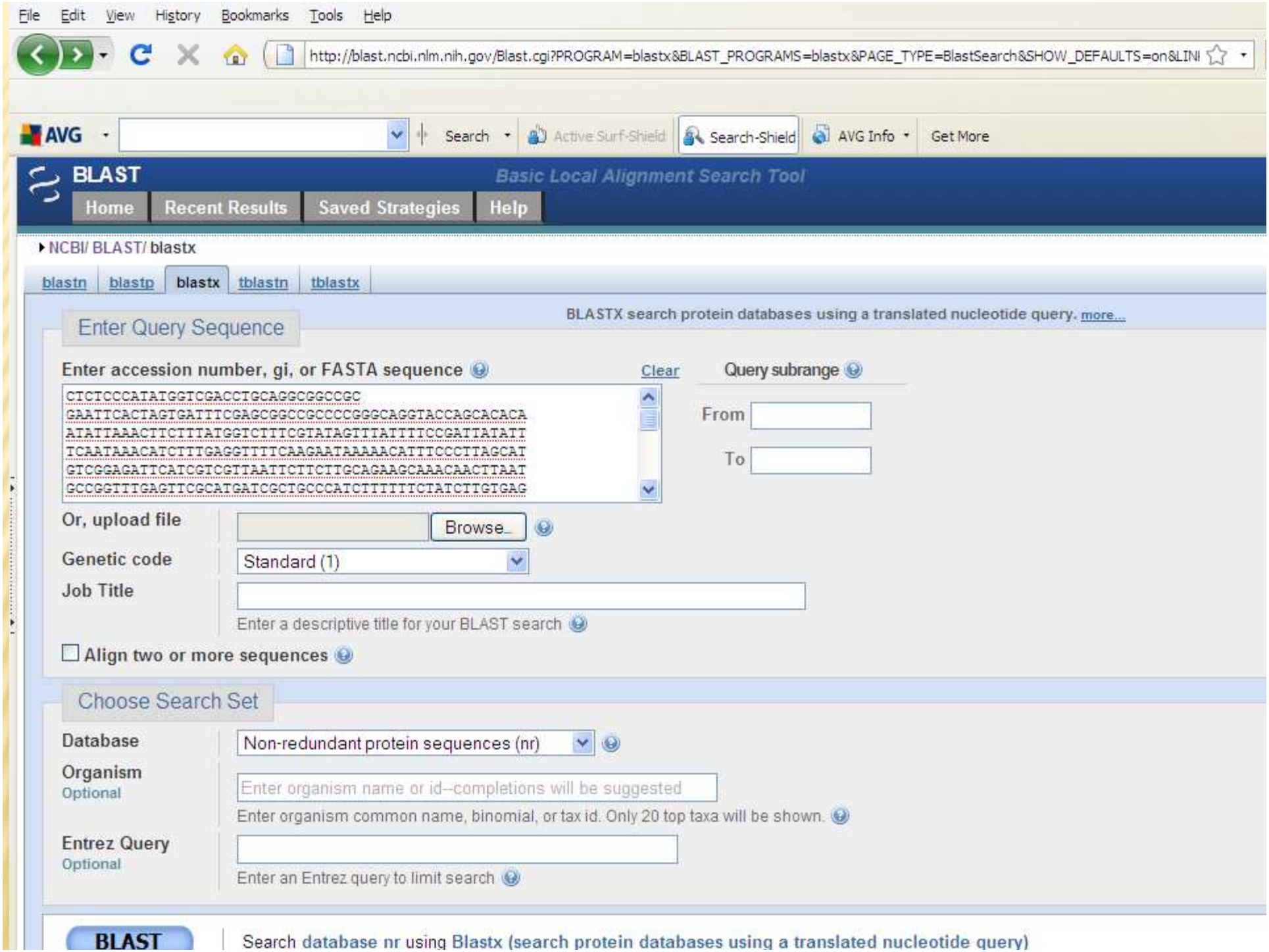
Choose a BLAST program to run.

nucleotide blast	Search **a nucleotide database** using **a nucleotide** query *Algorithms:* blastn, megablast, discontiguous megablast
protein blast	Search **protein database** using **a protein** query *Algorithms:* blastp, psi-blast, phi-blast
blastx	Search **protein database** using **a translated nucleotide** query
tblastn	Search **translated nucleotide database** using **a protein** query
tblastx	Search **translated nucleotide database** using **a translated nucleotide** query

Specialized BLAST

Choose a type of specialized search (or database name in parentheses.)

- Make specific primers with Primer-BLAST
- Search trace archives
- Find conserved domains in your sequence (cds)
- Find sequences with similar conserved domain architecture (cdart)
- Search sequences that have gene expression profiles (GEO)
- Search immunoglobulins (IgBLAST)
- Search for SNPs (snp)
- Screen sequence for vector contamination (vecscreen)
- Align two (or more) sequences using BLAST (bl2seq)
- Search protein or nucleotide targets in PubChem BioAssay
- Search SRA transcript libraries


File Edit View History Bookmarks Tools Help
http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastx&BLAST_PROGRAMS=blastx&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINI
AVG Search Active Surf-Shield Search-Shield AVG Info Get More
BLAST
Basic Local Alignment Search Tool
Home Recent Results Saved Strategies Help
NCBI/ BLAST/ blastx
blastn blastp blastx tblastn tblastx
BLASTX search protein databases using a translated nucleotide query. more...
Enter Query Sequence
Enter accession number, gi, or FASTA sequence
Clear
Query subrange
From
To
CTCTCCCATATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGC
GAATTCACTAGTGATTTCGAGCGGCCGCCCCGGGCAGGTACCAGCACACA
ATATTAAACTTCTTTATGGTCTTTCGTATAGTTTATTTTCCGATTATATT
TCAATAAACATCTTTGAGGTTTTCAAGAATAAAAACATTTCCCTTAGCAT
GTCGGAGATTCATCGTCGTTAATTCTTCTTGCAGAAGCAAACAACTTAAT
GCCGGTTTGAGTTCGCATGATCGCTGCCCATCTTTTTTCTATCTTGTGAG
Or, upload file
Browse...
Genetic code
Standard (1)
Job Title
Enter a descriptive title for your BLAST search
Align two or more sequences
Choose Search Set
Database
Non-redundant protein sequences (nr)
Organism
Optional
Enter organism name or id--completions will be suggested
Enter organism common name, binomial, or tax id. Only 20 top taxa will be shown.
Entrez Query
Optional
Enter an Entrez query to limit search
BLAST
Search database nr using Blastx (search protein databases using a translated nucleotide query)

NCBI Blast:Nucleotide Sequence (792 letters) - Mozilla Firefox

File Edit View History Bookmarks Tools Help

http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

AVG Search Active Surf-Shield Search-Shield AVG Info Get More

Nucleotide Sequence (792 letters)

Query ID lcl|39735
Description None
Molecule type nucleic acid
Query Length 792

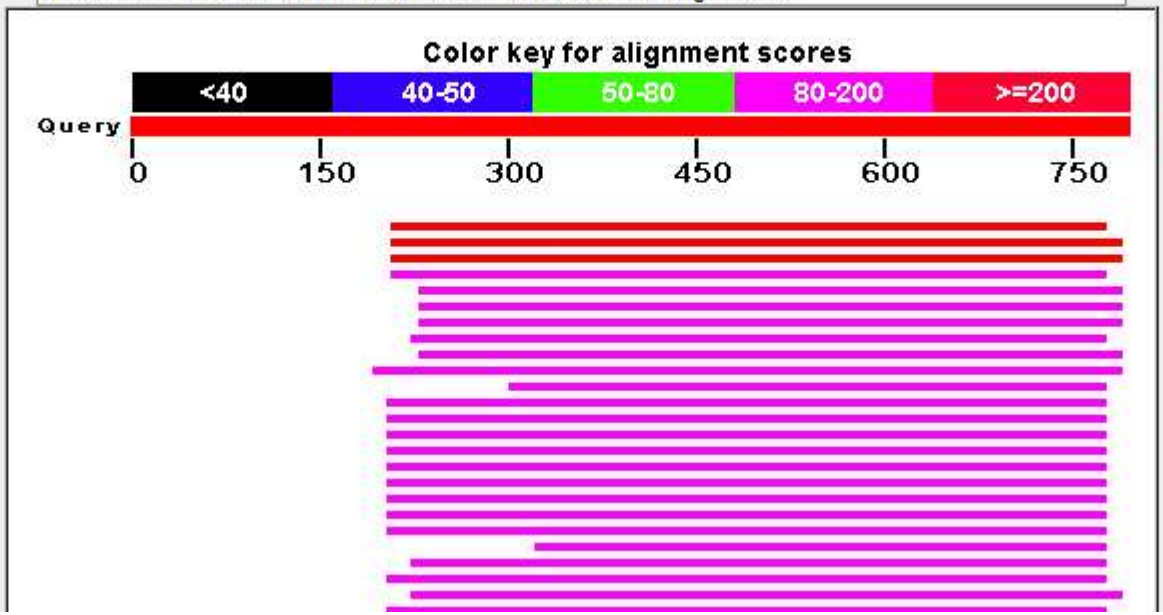
Database Name nr
Description All non-redundant GenBar
translations+PDB+SwissP
samples from WGS project
Program BLASTX 2.2.20+ ▷Citation

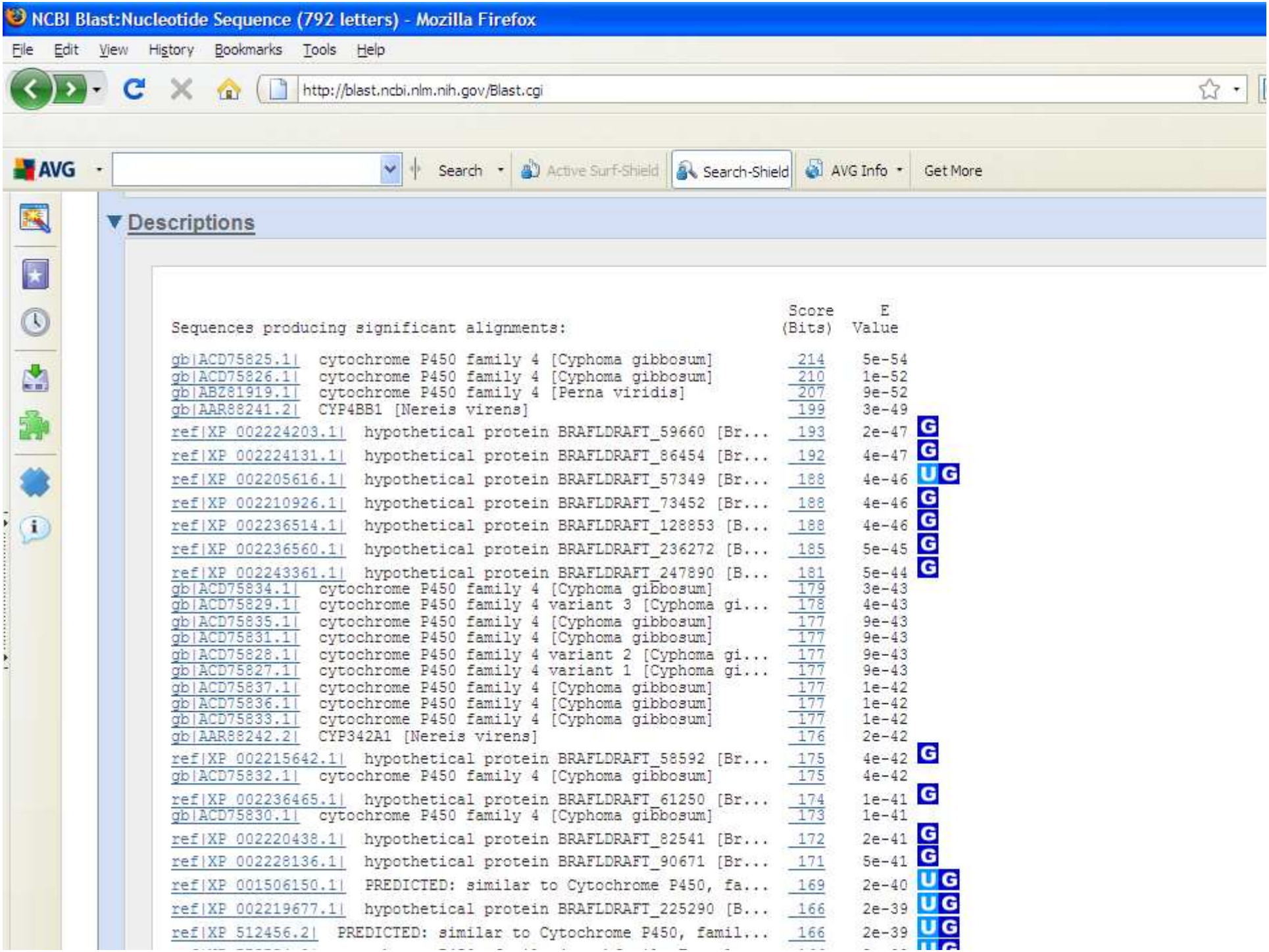
Other reports: ▷Search Summary [Taxonomy reports]

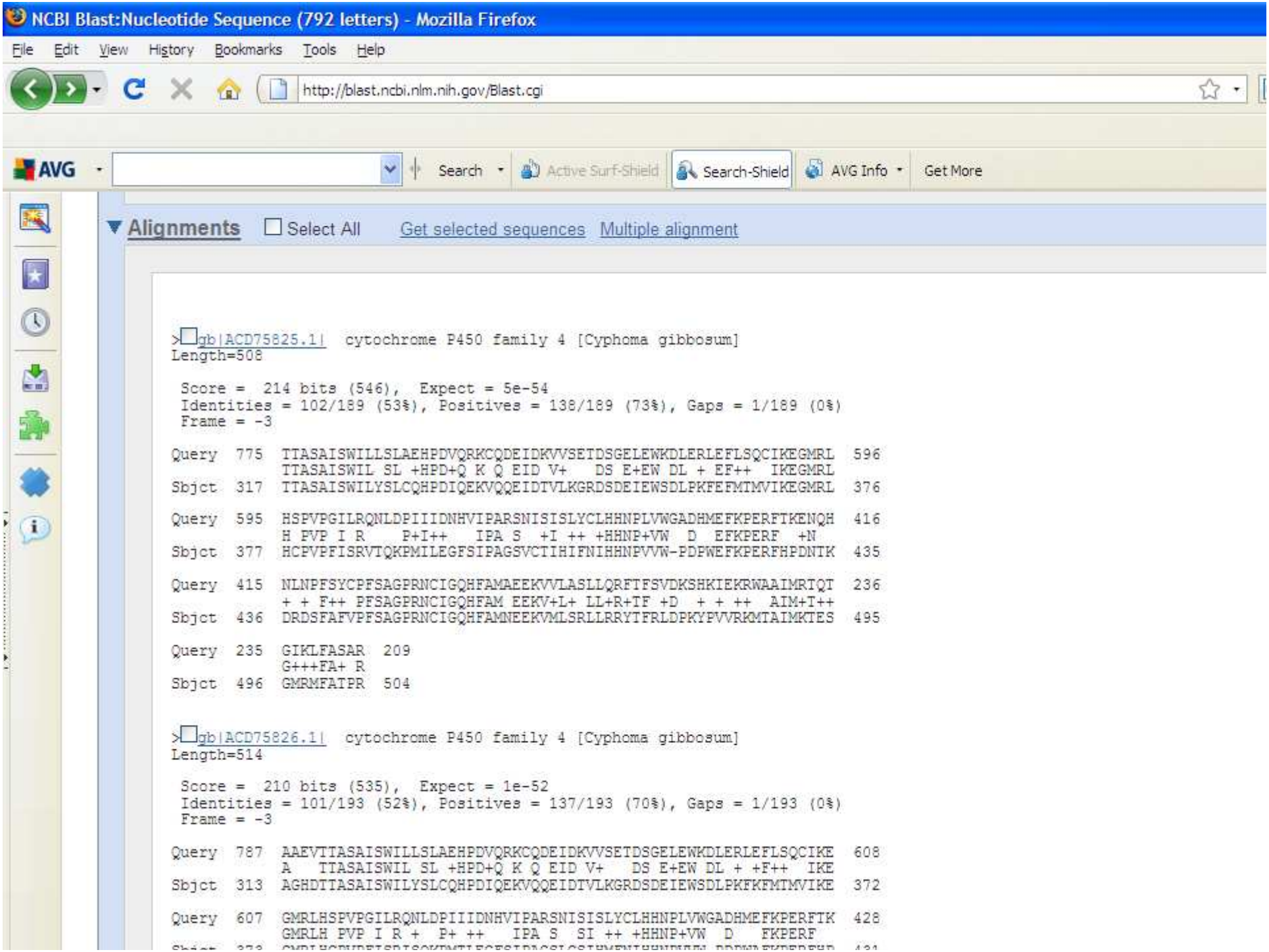
▼ Graphic Summary

Distribution of 101 Blast Hits on the Query Sequence

Mouse-over to show defline and scores, click to show alignments




NCBI Blast:Nucleotide Sequence (792 letters) - Mozilla Firefox
File Edit View History Bookmarks Tools Help
http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
AVG
Search
Active Surf-Shield
Search-Shield
AVG Info
Get More
Descriptions
Sequences producing significant alignments:
Score (Bits)
E Value
gb|ACD75825.1| cytochrome P450 family 4 [Cyphoma gibbosum] 214 5e-54
gb|ACD75826.1| cytochrome P450 family 4 [Cyphoma gibbosum] 210 1e-52
gb|ABZ81919.1| cytochrome P450 family 4 [Perna viridis] 207 9e-52
gb|AAR88241.2| CYP4BB1 [Nereis virens] 199 3e-49
ref|XP_002224203.1| hypothetical protein BRAFLDRAFT_59660 [Br... 193 2e-47
ref|XP_002224131.1| hypothetical protein BRAFLDRAFT_86454 [Br... 192 4e-47
ref|XP_002205616.1| hypothetical protein BRAFLDRAFT_57349 [Br... 188 4e-46
ref|XP_002210926.1| hypothetical protein BRAFLDRAFT_73452 [Br... 188 4e-46
ref|XP_002236514.1| hypothetical protein BRAFLDRAFT_128853 [B... 188 4e-46
ref|XP_002236560.1| hypothetical protein BRAFLDRAFT_236272 [B... 185 5e-45
ref|XP_002243361.1| hypothetical protein BRAFLDRAFT_247890 [B... 181 5e-44
gb|ACD75834.1| cytochrome P450 family 4 [Cyphoma gibbosum] 179 3e-43
gb|ACD75829.1| cytochrome P450 family 4 variant 3 [Cyphoma gi... 178 4e-43
gb|ACD75835.1| cytochrome P450 family 4 [Cyphoma gibbosum] 177 9e-43
gb|ACD75831.1| cytochrome P450 family 4 [Cyphoma gibbosum] 177 9e-43
gb|ACD75828.1| cytochrome P450 family 4 variant 2 [Cyphoma gi... 177 9e-43
gb|ACD75827.1| cytochrome P450 family 4 variant 1 [Cyphoma gi... 177 9e-43
gb|ACD75837.1| cytochrome P450 family 4 [Cyphoma gibbosum] 177 1e-42
gb|ACD75836.1| cytochrome P450 family 4 [Cyphoma gibbosum] 177 1e-42
gb|ACD75833.1| cytochrome P450 family 4 [Cyphoma gibbosum] 177 1e-42
gb|AAR88242.2| CYP342A1 [Nereis virens] 176 2e-42
ref|XP_002215642.1| hypothetical protein BRAFLDRAFT_58592 [Br... 175 4e-42
gb|ACD75832.1| cytochrome P450 family 4 [Cyphoma gibbosum] 175 4e-42
ref|XP_002236465.1| hypothetical protein BRAFLDRAFT_61250 [Br... 174 1e-41
gb|ACD75830.1| cytochrome P450 family 4 [Cyphoma gibbosum] 173 1e-41
ref|XP_002220438.1| hypothetical protein BRAFLDRAFT_82541 [Br... 172 2e-41
ref|XP_002228136.1| hypothetical protein BRAFLDRAFT_90671 [Br... 171 5e-41
ref|XP_001506150.1| PREDICTED: similar to Cytochrome P450, fa... 169 2e-40
ref|XP_002219677.1| hypothetical protein BRAFLDRAFT_225290 [B... 166 2e-39
ref|XP_512456.2| PREDICTED: similar to Cytochrome P450, famil... 166 2e-39


NCBI Blast:Nucleotide Sequence (792 letters) - Mozilla Firefox
File Edit View History Bookmarks Tools Help
http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
AVG
Search
Active Surf-Shield
Search-Shield
AVG Info
Get More
Alignments
Select All
Get selected sequences
Multiple alignment
>gb|ACD75825.1| cytochrome P450 family 4 [Cyphoma gibbosum]
Length=508
Score = 214 bits (546), Expect = 5e-54
Identities = 102/189 (53%), Positives = 138/189 (73%), Gaps = 1/189 (0%)
Frame = -3
Query 775 TTASAISWILLSLAEHPDVQRKCQDEIDKVVSETDSGELEWKDLERLEFLSQCIKEGMRL 596
TTASAISWIL SL +HPD+Q K Q EID V+ DS E+EW DL + EF++ IKEGMRL
Sbjct 317 TTASAISWILYSLCQHPDIQEKVQQEIDTVLKGRDSDEIEWSDLPKFEFMTMVIKEGMRL 376
Query 595 HSPVPGILRQNLDPIIIDNHVIPARSNISISLYCLHHNPLVWGADHMEFKPERFTKENQH 416
H PVP I R P+I++ IPA S +I ++ +HHNP+VW D EFKPERF +N
Sbjct 377 HCPVPFISRVTQKPMILEGFSIPAGSVCTIHIFNIHHNPVVW-PDPWEFKPERFHPDNTK 435
Query 415 NLNPFSYCPFSAGPRNCIGQHFAMAEEKVVLASLLQRFTFSVDKSHKIEKRWAAIMRTQT 236
+ + F++ PFSAGPRNCIGQHFAM EEKV+L+ LL+R+TF +D + + ++ AIM+T++
Sbjct 436 DRDSFAFVPFSAGPRNCIGQHFAMNEEKVMLSRLLRRYTFRLDPKYPVVRKMTAIMKTES 495
Query 235 GIKLFASAR 209
G+++FA+ R
Sbjct 496 GMRMFATPR 504
>gb|ACD75826.1| cytochrome P450 family 4 [Cyphoma gibbosum]
Length=514
Score = 210 bits (535), Expect = 1e-52
Identities = 101/193 (52%), Positives = 137/193 (70%), Gaps = 1/193 (0%)
Frame = -3
Query 787 AAEVTTASAISWILLSLAEHPDVQRKCQDEIDKVVSETDSGELEWKDLERLEFLSQCIKE 608
A TTASAISWIL SL +HPD+Q K Q EID V+ DS E+EW DL + +F++ IKE
Sbjct 313 AGHDTTASAISWILYSLCQHPDIQEKVQQEIDTVLKGRDSDEIEWSDLPKFKFMTMVIKE 372
Query 607 GMRLHSPVPGILRQNLDPIIIDNHVIPARSNISISLYCLHHNPLVWGADHMEFKPERFTK 428
GMRLH PVP I R + P+ ++ IPA S SI ++ +HHNP+VW D FKPERF

Grande Florianópolis e a Maricultura

- **SC** – maior produtor brasileiro de moluscos marinhos

- 60,29% da produção total de mexilhões;
- 95,07% da produção total de ostras;
- 52,69% (639,34 hectares) da área estadual disponível para cultivos;
- 68,45% dos produtores catarinenses (538 produtores). EPAGRI, 2007

Controle 33%

Marine Environmental Research xxx (2008) xxx–xxx

Contents lists available at ScienceDirect

Marine Environmental Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/marenvrev

Differential gene expression in oyster exposed to sewage

Igor Dias Medeiros [a,b], Marília Nardelli Siebert [a], Guilherme de Toledo e Silva [a], Milton Ozório Moraes [c], Maria Risoleta Freire Marques [a], Afonso Celso Dias Bainy [a,*]

[a] Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Campus Universitário, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis 88040-900, SC, Brazil
[b] Laboratório de Ciências Marinhas, Universidade do Sul de Santa Catarina, Av. Colombo Sales, 89, Laguna 88790-000, SC, Brazil
[c] Laboratório de Hanseníase, Fundação Oswaldo Cruz, FIOC Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Av. Brazil, 4365 Manguinhos, 21040-360 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Table 1
List of up-regulated genes in gills of oyster *Crassostrea gigas* exposed for 48 h to untreated domestic sewage

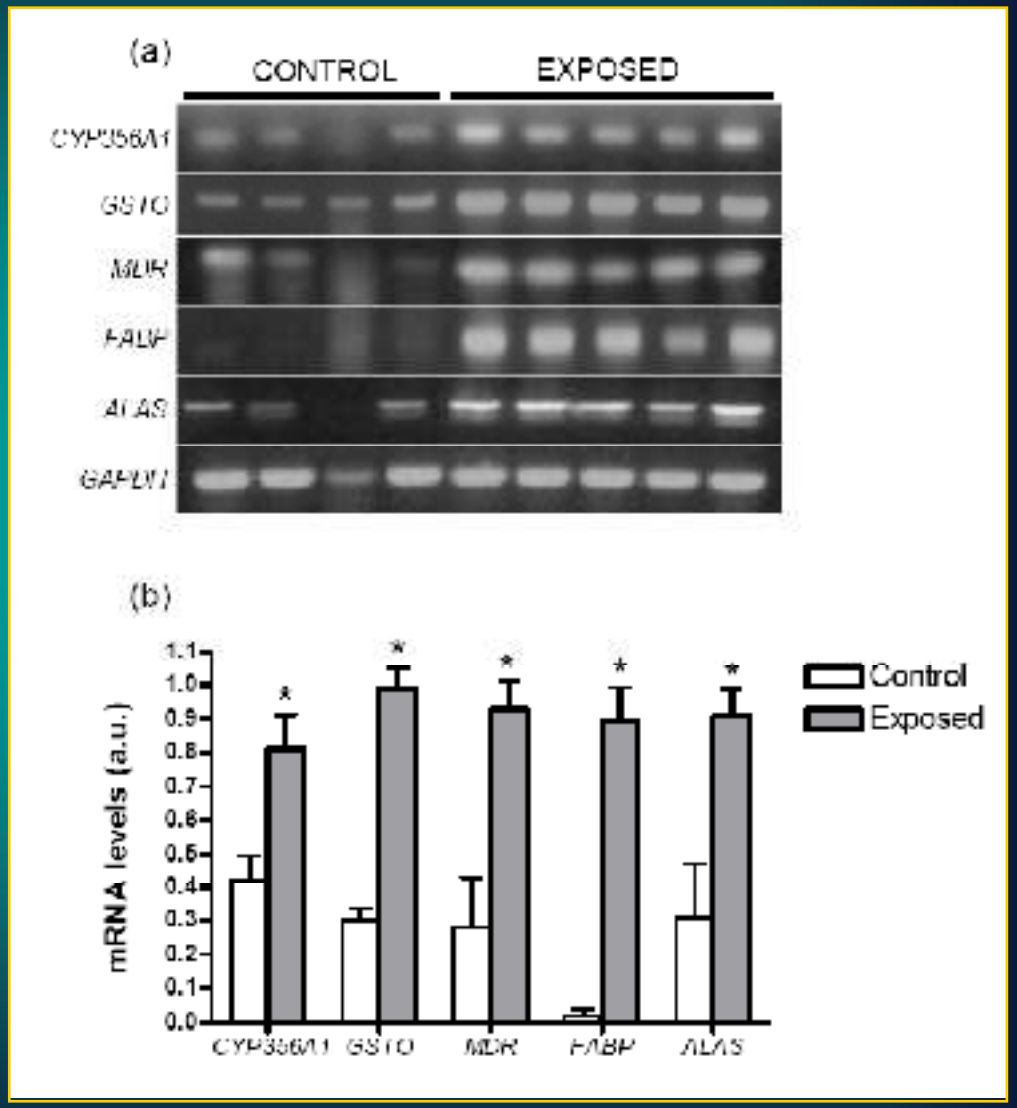
Putative match	GenBank accession number[a]	Species match	Length	e-value	GenBank accession number[b]
Cytochrome P450 356A1	EB645271	*Squalus acanthias*	509 aa	3e − 24	AAB34256
Glutathione S-transferase omega class	–	*Crassostrea gigas*	243 aa	4e − 22	CAD89618
Multi drug resistance protein	EU073425	*Gallus gallus*	1307 aa	1e − 52	XP_418636
Acyl CoA oxidase similar protein	EU108716	*Danio rerio*	690 aa	1e − 38	AAH83524
Alternative oxidase isoform A	EU108720	*Acanthamoeba castellanii*	370 aa	1e − 91	AB804277
5-Aminolevulinate synthase	EU073062	*Sepia officinalis*	603 aa	1e − 51	AAD20808
40S ribosomal protein S2	EU108718	*Lytechinus pictus*	277 aa	2e − 23	AAK95183
Ribosomal protein L18a similar protein	EU108719	*Branchiostoma belcheri*	176 aa	1e − 20	AAN52374
Asparaginyl tRNA-synthetase similar protein	EU108715	*Drosophila melanogaster*	538 aa	2e − 94	NP_609948
Fatty acid binding protein	EU069496	*Caenorhabditis elegans*	136 aa	1e − 09	NP_491928
Solute carrier family 27 similar protein	EU108714	*Canis familiaris*	913 aa	1e − 08	XP_531894
Sterile alpha motif with 8 domain	EU108712	*Mus musculus*	478 aa	3e − 36	NP_080559
PHD finger similar protein	EU108713	*Canis familiaris*	1955 aa	5e − 33	XP_867023
C8orf1 (hT41) similar protein	EU108711	*Pan troglodytes*	549 aa	1e − 42	XP_528185
Ras homolog gene family	EU108717	*Rattus norvegicus*	205 aa	1e − 12	AAH61760

[a] GenBank access number deposited after this work.
[b] GenBank access number of the closest match (e-value) obtained after blasting to National Center of Biotechnology Information.

Exposição em laboratório

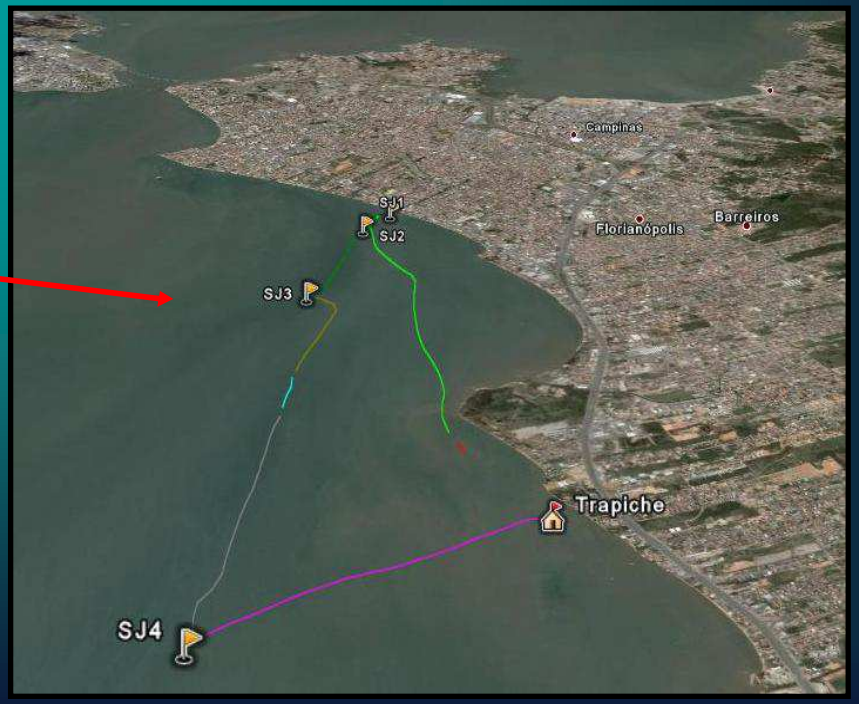
48 h

Control 33%

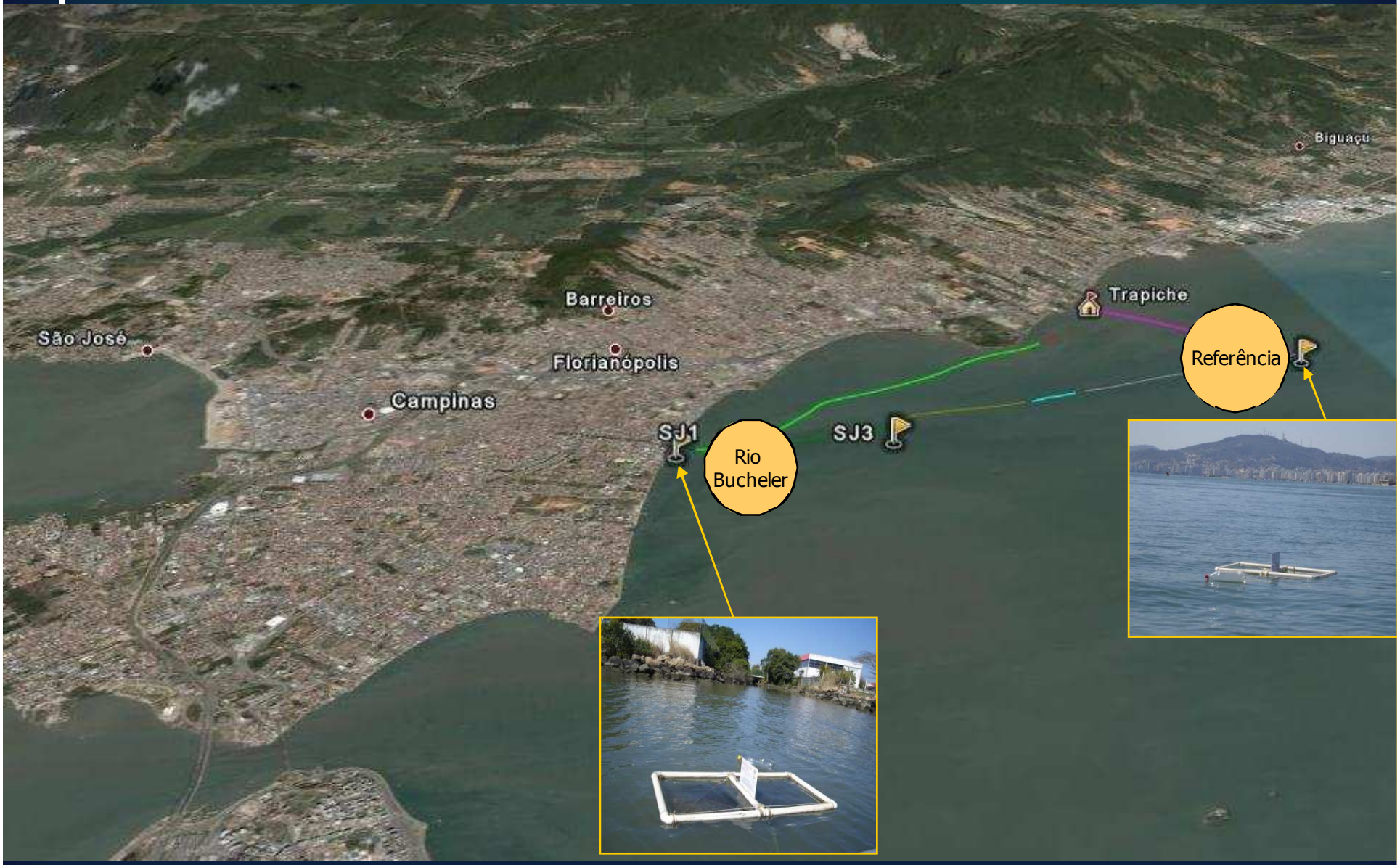


Medeiros et al. (2008). *Environ.Toxicol. Pharmacol.* **26**, 362-365.

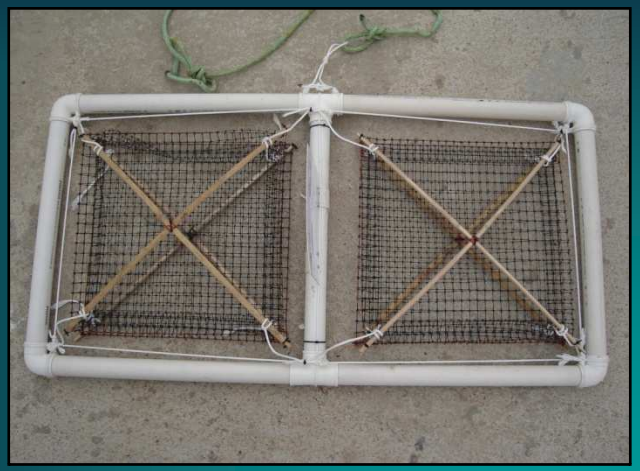
São José – SC – Baía Norte



Área de Estudo



Metodologia

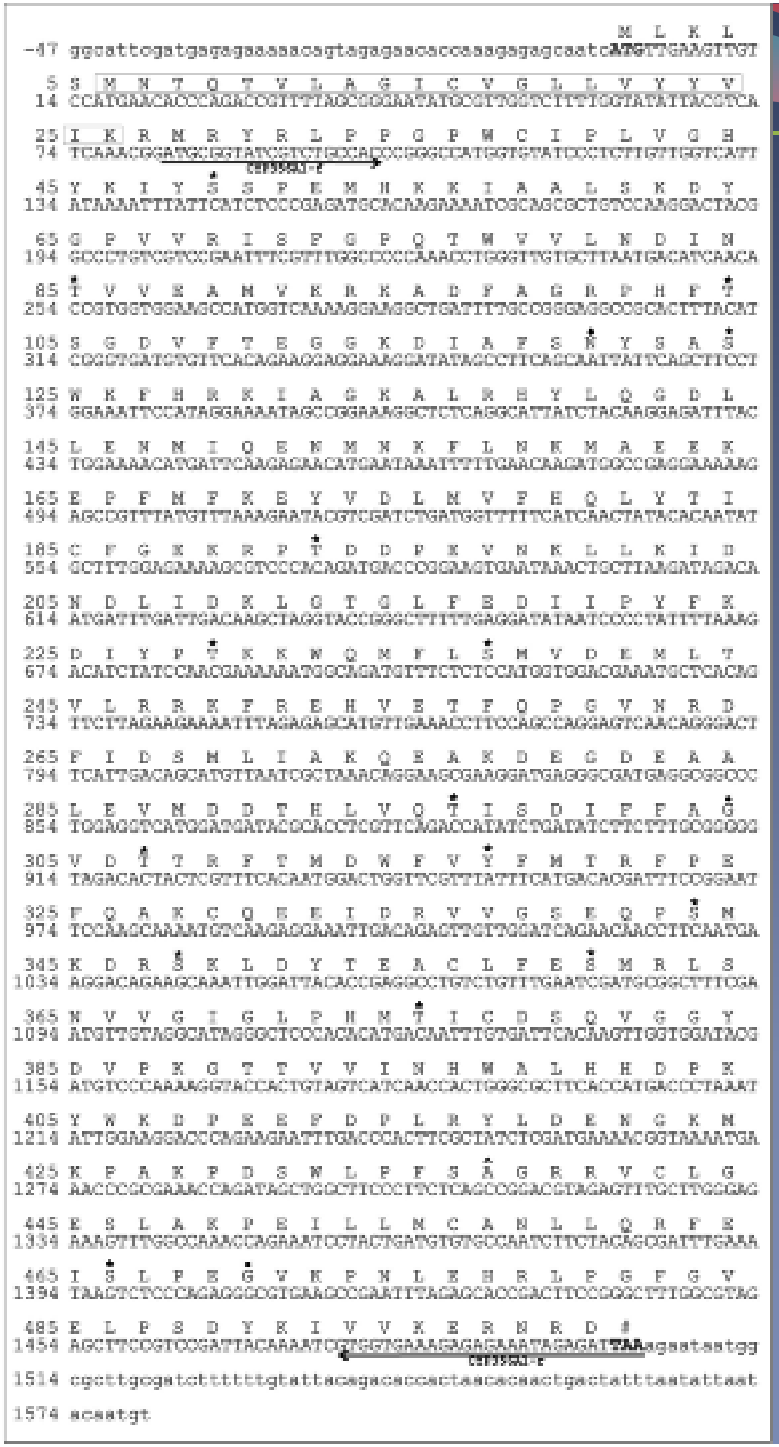


Inverno 2006 – 14 dias de exposição
Verão 2007 – 24h, 48h, 7 dias e 14 dias de exposição
Inverno 2009 – 24 h e 14 dias de exposição

Rio Bucheler

Após 14 dias

Gancho de desinfetante de latrina



CYP356A1

- Região de inserção na membrana;
- Primers utilizados na obtenção da sequência completa (sem a região de inserção na membrana)
- * fosforilação
- ● N-mirsitoilação
- ^ amidação;
- ♦ N-glicosilação.

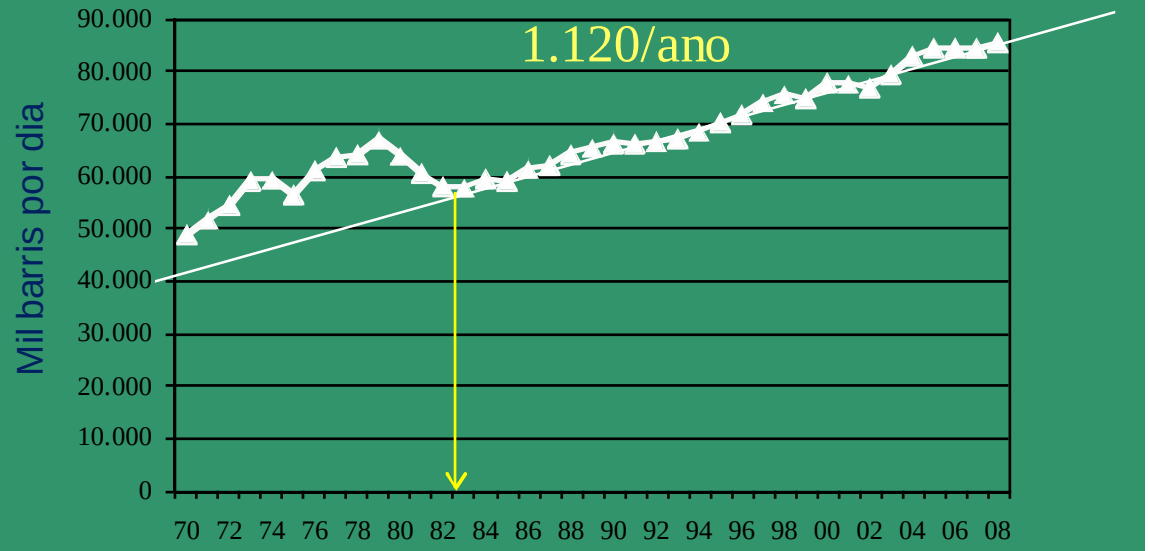
Conclusões

- Após 14 dias de exposição neste local, espécimens de ostras *C. gigas* e *C. rhizophorae* apresentaram um aumento significativo nos níveis de LABs, HPAs, e ΣDDTs no inverno e no verão.

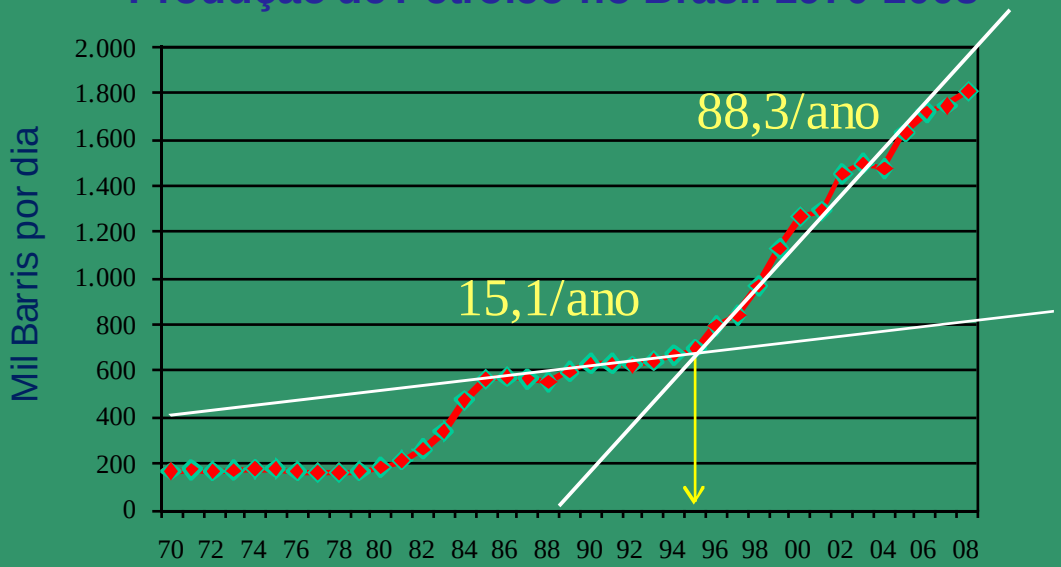
- O grau de transcrição dos genes da FABP e da GSTΩ parecem ser ótimos biomarcadores de exposição em ostras *C. gigas* expostas a curto prazo a efluentes contendo esgoto doméstico.

- A expressão heteróloga de genes identificados em bibliotecas subtrativas e a posterior produção de anticorpos poderá auxiliar no desenvolvimento de metodologias complementares de avaliação e monitoramento ambiental.

Produção de Petróleo no mundo 1970-2008



Produção de Petróleo no Brasil 1970-2008



Source: http://www.eia.doe.gov/ipm/supply.html

Respostas bioquímicas e moleculares em peixes, *Poecilia vivipara*, expostos à fração acomodada em água do óleo diesel

Óleo Diesel

50% transporte
49% agropecuária
1% geração de energia elétrica

Composição química

- ✯ Hidrocarbonetos alifáticos (HAs – parafinas);
- ✯ Hidrocarbonetos aromáticos:

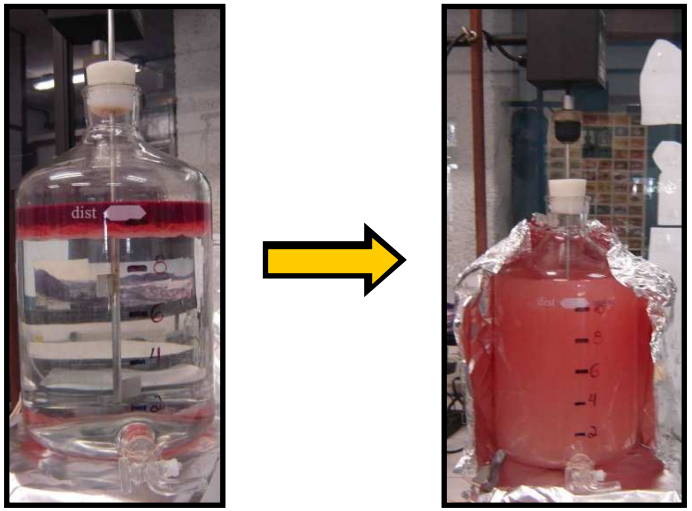
Monocíclicos (BTEX)
(permeabilidade membranas)

Policíclicos (HPAs)
(+ tóxicos; carcinogênicos)

Metodologia

Produção de FAD

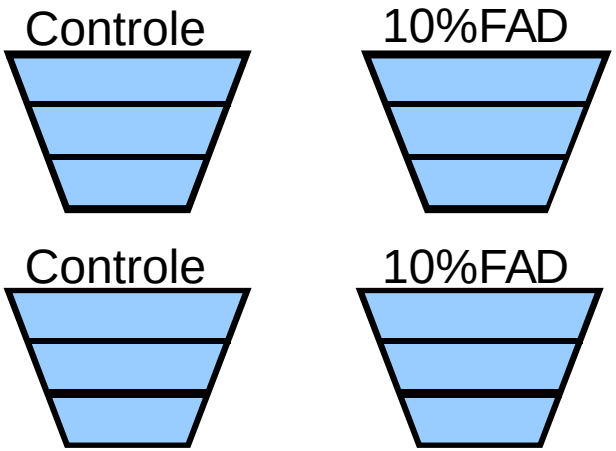
Fração Acomodada em Água do óleo diesel (FAD)

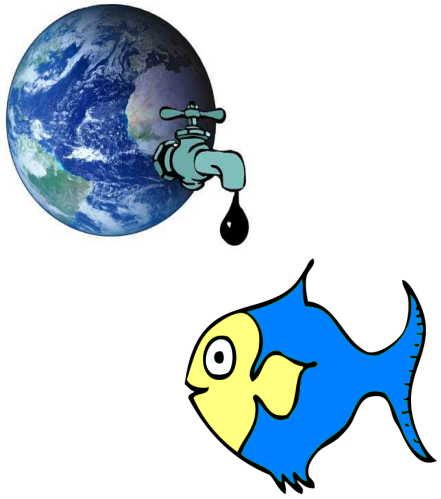


- Singer et al. (2000)
- 1:9 - óleo diesel:água do mar
- 40rpm durante 23 horas a 21ºC
- 1 hora para estabilização

Metodologia

Experimento 2: exposição a 10% da FAD





- 24hrs
- Análises químicas e moleculares

Resultados

Genes diferencialmente expressos

Lista de genes induzidos pela exposição à 10% da FAD.

Função biológica	Homólogo (proteína ou DNA)	Espécie comparada	e-value	Número de acesso no GenBank
Fase I de Biotransformação	***Citocromo P450 1A (CYP1A)***	*Fundulus heteroclitus*	1,00E-76	AF026800.1 AF026800
	Citocromo P450 2P2 (CYP2P2)	*Fundulus heteroclitus*	3,00E-04	AF117342.1
Fase II de Biotransformação	***Glutationa S-transferase R1 (GST)***	*Pagrus major*	1,00E-47	AB158412.1|
	UDP glicoronosil transferase 1 familia B (UDPGT1B)	*Platichthys flesus*	8,00E-45	AM746199.1|
	O-methyltransferase (MET)	*Danio rerio*	6,00E-118	BC090471.1
Fase III de biotransformação	*Proteína ligadora de ATP CC4 (ABCC4)*	*Danio rerio*	5,00E-39	EU586042.1
Cadeia transportadora de elétrons	*Citocromo c oxidase subunidade I (COXI)*	*Cubiceps paradoxus*	9,00E-154	AB205442.1
Sinalização celular	*Presenilina – enhancer 2 (PEN2)*	*Oreochromis mossambicus*	9,00E-36	AY522633.1
Apoptose	*Proteína integral de membrana 2B (ITM2B)*	*Epinephelus coioides*	1,00E-17	FJ438523.1
Chaperona	*Complexo associado ao polipeptídeo nascente alfa (NAC)*	*Oreochromis mossambicus*	3,00E-20	AY522625.1
Efluxo de Colesterol e sistema imune	*Precursor da Alfa microglobilina/bicunina (AMBP)*	*Danio rerio*	7,00E-29	BC150464.1
	Precursor da Apolipoproteína AI (APOAI)	*Platichthys flesus*	4,00E-32	AJ844288.1

Resultados

Genes diferencialmente expressos

Lista de genes reprimidos pela exposição à 10% da FAD

Função biológica	Homólogo (proteína ou DNA)	Espécie comparada	e-value	Número de acesso no GenBank
Vitelogênese	***Vitelogenina A (VgA)***	*Poecilia reticulata*	9,00E-115	EF408838.1
	Vitelogenina B (VgB)	*Poecilia reticulata*	7,00E-25	EF456700.1
	Vitelogenina C (VgC)	*Gambusia affinis*	4,00E-43	AB181837.1
Sistema imune	***Proteína do sistema complemento C3 (C3)***	*Paralichthys olivaceus*	4,00E-65	AB021653.1
	Inibidor C1 (C1)	*Oncorhynchus mykiss*	1,00E-59	AJ519929.1 OMY519929
Chaperona	*Proteina de choque térmico 90 (HSP90)*	*Solea senegalensis*	4,00E-61	AB367527.1
Transporte transmembrana	*Transportador de ânions orgânicos membro 1c1 (OATP2)*	*Mus musculus*	5,00E-23	BC078456.1
Metabolismo do ferro e sistema imune	***Transferrina (TF)***	*Acanthopagrus schlegelii*	4,00E-32	AY365052.1
Metabolismo do Glicogênio	*UDP glicose pirofosforilase(UDPGP)*	*Salmo salar*	2,00E-27	BT045585.1
Transporte de Oxigênio	*Hemoglobina*	*Salmo salar*	8,00E-48	BT060431.1
	Alfa hemoglobina A	*Seriola quinqueradiata*	5,00E-48	AB034639.1
Metabolismo de ácidos graxos	*Proteína ligante de AcilCoA (ACBP)*	*Oryzias latipes*	1,00E-39	FJ843607.1
Sinalização celular	*Integrina beta 1*	*Danio rerio*	7,00E-34	DQ149101.1
Tradução	*Proteína ribossomal L5*	*Salmo salar*	2,00E-27	BT045585.1

Considerações finais e Perspectivas

- Nesse estudo houve a indução dos genes *CYP1A*, *GST, CYP2P2*, *UDPGT1B* e *MET*, sugerindo que estes genes e os produtos codificados por eles possam ser utilizados como biomarcadores.

- A ativação na expressão dos genes *CYP1A*, *GST*, *UDPGT1B* pode estar associada a ativação do AHR pelos componentes da FAD.

- Estudos focados na identificação dos fatores de transcrição que modulam os genes validados por qPCR são necessários. Essa informação permitirá identificar as classes de xenobióticos capazes de desencadear a ativação transcricional desses genes, ajudando a delimitar a especificidade de um gene e seu produto como biomarcador.

Perspectivas atuais

- Estudos em campo in situ com *Crassostrea brasiliana* e *Poecilia vivipara*

Perspectivas atuais

- Clonagem de genes de biotransformação em espécies de importância para a Aquicultura e ambiental.

Financiamento direto

INCT – Toxicologia Aquática
CNPq/CT-Hidro-Agro (Proc. 500088/2006-3)
CNPq/CT-Petro (processo nº 550706/2005-4)
CNPq/Universal (Proc. 484328/2006-9)
Projeto CNPq/MAPA 578200/2008-2

Financiamento indireto

Agradecimentos

Guilherme Toledo e Silva
Jaco Joaquim Mattos
Fabrício Flores Nunes
Mariana Coelho Naldi
Marília Nardelli Siebert
Tarquin Dorrington
Karim Hahn Luchmann
Dra. Maria Risoleta F. Marques

Dr. Igor D. Medeiros

Dr. Cláudio M.R. de Melo
Dr. Jaime F. Ferreira

Dr. Rolf R. Weber
Dr. Satie Taniguchi
Dr. Márcia Bícego
Dr. Rosalinda C. Montone
Silvio Tarou Sasaki

Dr. Juliano Zanette
Dr. Luis Felipe Niencheski
Dr. Adalto Bianchini

Prefeitura Municipal de São José

Dr. Edmundo Carlos Grisard
Patrícia H. Stoco