



Rachel Ann Hauser Davis

**Aspectos proteômicos e determinação de
elementos-traço em bÍlis de peixe: potencial
marcador biológico de exposição ambiental?**

Tese de doutorado

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Química do Departamento de Química da PUC-Rio como
requisito parcial para obtenção do título de Doutor em
Química.

Orientadores: Prof Reinaldo Calixto de Campos
Co-Orientadora: Prof^a. Roberta Lourenço Ziolli

Rio de Janeiro
Março de 2012



Rachel Ann Hauser Davis

**Aspectos proteômicos e determinação de elementos-
traço em bÍlis de peixe: potencial marcador biológico
de exposição ambiental?**

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química da PUC-Rio. Aprovada pela Comissão Examinadora abaixo assinada.

Prof. Tatiana Dillenburg Saint´Pierre
Presidente
Departamento de Química – PUC-Rio

Prof. Roberta Lourenço Ziolli
Co-Orientadora
UNIRIO

Prof. Alcides Wagner Serpa Guarino
UNIRIO

Prof. Josino Costa Moreira
Fiocruz

Prof. Ricardo Erthal Santelli
UFRJ

Prof. Olaf Malm
UFRJ

Prof. Fátima Ventura Pereira Meirelles
Departamento de Química - PUC-Rio

Prof. José Eugênio Leal
Coordenador Setorial do Centro
Técnico Científico – PUC-Rio

Rio de Janeiro, 27 de fevereiro de 2012

Todos os direitos reservados. É proibida a reprodução total ou parcial do trabalho sem autorização da universidade, da autora e do orientador.

Rachel Ann Hauser-Davis

Graduou-se em Ciências Biológicas em 2005 e possui Licenciatura em Ciências Biológicas (2006), ambos pela Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO). É Mestre em Química Analítica pela PUC-Rio, e atualmente trabalha com o estudo de contaminação ambiental no ambiente aquático através de análises proteômicas.

Ficha Catalográfica

Davis, Rachel Ann Hauser

Aspectos proteômicos e determinação de elementos-traço em bÍlis de peixe: potencial marcador biológico de exposição ambiental? / Rachel Ann Hauser Davis; orientador: Reinaldo Calixto de Campos ; co-orientadora: Roberta Lourenço Ziolli. – 2012.

139 f. : il. (color.) ; 30 cm

Tese (doutorado)–Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Departamento de Química, 2012.

Inclui bibliografia

1. Química – Teses. 2. BÍlis. 3. ProteÍnas. 4. Técnicas proteômicas. 5. Peixes. 6. Contaminação ambiental. I. Campos, Reinaldo Calixto de. II. Ziolli, Roberta Lourenço. III. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Departamento de Química. IV. Título.

CDD: 540

“Poderia ser pior. Poderia ser comigo!”

Frase onipresente ao longo do doutorado inteiro, de autoria do Ricardo Lavandier!

Agradecimentos

Ao CNPq e à PUC-Rio pelas bolsas concedidas e ao INCTBio pela ajuda financeira.

Ao meu orientador Reinaldo Calixto de Campos, por tudo e mais um pouco.

À minha co-orientadora, Roberta Lourenço Ziolli.

Ao Professor Ricardo Queiroz Aucélio, pelo empréstimo de equipamentos.

À minha amiga Natália Quinete (como diz o Ricardo, o Senhor Myagi!).

Ao amigo Ricardo “Gurrrrdinho” Lavandier, que me ajudou muito com coisas “McGyverianas” da vida, inclusive me ensinando que eu posso amolar uma faca no mármore da janela! rs

À Raquel Lavradas e Julianna Martins por toda a ajuda, mas especialmente pelas risadas e comentários sem noção!

Ao Carlitos, pela super ajuda com tudo ligado à proteômica! Sem isso eu estaria perdida!

Ao Rodrigo Araújo Gonçalves pela (extrema) paciência e (super) ajuda ao longo do trabalho.

Ao Douglas e à Gabriella do LAATOM, pelas ajudas nas análises e por aguentarem as minhas reclamações constantes

Ao Thiago Araújo pela ajuda na técnica de HPLC-ICP-MS.

À Prof. Dra. Terezinha de Oliveira por toda a ajuda ao longo do trabalho na parte estatística e nos artigos gerados em conjunto.

À Adriana Bassini, pela ajuda laboratorial.

Ao Departamento de Química da PUC-Rio.

Resumo

Davis, Rachel Ann Hauser; de Campos, Reinaldo Calixto. **Aspectos proteômicos e de acúmulo de elementos-traço em bÍlis de peixe: potencial marcador biológico de exposição ambiental?** Rio de Janeiro, 2012. 139p. Tese de Doutorado - Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

A bÍlis de peixe é um fluido biológico com grande potencial como biomarcador de exposição ambiental a metais e misturas complexas. Este trabalho verificou o potencial desta matriz em situações de contaminação ambiental por metais e analisou aspectos proteômicos. Duas espécies de peixe (*Mugil liza* – Tainhas, e *Tilapia rendalli* – Tilápias) foram coletadas de diferentes locais. IndivÍduos de tilápia foram expostos a concentrações sub-letais de Cu em laboratório. A bÍlis foi analisada com relação ao seu conteúdo de elementos-traço (Cd, Cu, Pb, Zn, Ni, Mn), e testes estatísticos demonstram que esta matriz pode ser utilizada para biomonitoramento de exposição de metais ao invés do fÍgado, sendo mais vantajosa que esta última por ser uma matriz menos complexa, o que facilita o seu pré-tratamento, além de não haver necessidade de sacrificar o animal. Diferentes protocolos de *clean-up* foram testados com objetivo de analisar a bÍlis por eletroforese 1D e 2D e zimografias para a detecção de enzimas. O protocolo final de *clean-up* inclui sonicação, centrifugação, deslipidificação e dessalinização. A presença de metalotioneÍnas foi analisada nesta matriz, através de eletroforeses 1D, 2D, espectrofotometria e SEC-HPLC-ICP-MS, e foi verificada que existe realmente expressão destas proteínas na bÍlis, inclusive com o mesmo comportamento reportado no fÍgado, de expressão aumentada em situações de contaminação ambiental. Também foi verificada a existência de metaloproteases de matriz na bÍlis através de zimografias gelatinolÍticas, que também apresentaram potencial biomarcador de contaminação ambiental, pois algumas bandas gelatinolÍticas estiveram presentes apenas em um local contaminado quando comparado a um lugar controle. Este trabalho verificou a existência de dois biomarcadores protéicos em bÍlis de peixe, um específico à contaminação por metais (metalotioneÍnas) e um não-específico (metaloproteases de matriz), além da possibilidade de uso da bÍlis de peixe como biomarcador à exposição a metais pela determinação das concentrações de elementos-traço nesta matriz.

Palavras-chave

BÍlis; proteínas; técnicas proteômicas; peixes; contaminação ambiental.

Abstract

Davis, Rachel Ann Hauser; de Campos, Reinaldo Calixto, (Advisor). **Proteomic aspects and trace-element accumulation in fish bile: potential biological marker for environmental exposure?** Rio de Janeiro, 2012. 139p. DSc. Thesis - Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

Fish bile is a biological fluid with great potential as a biomarker of environmental exposure to metals and complex mixtures. This study verified the potential of this matrix in environmental contamination situations by metals and analysed proteomic aspects. Two fish species (*Mugil liza* – mullets, and *Tilapia rendalli* – tilapias) were sampled from different locations. Tilapia individuals were exposed to sub-lethal Cu concentrations in the laboratory. Bile was analyzed regarding trace-element concentrations (Cd, Cu, Pb, Zn, Ni, Mn), and statistical techniques indicate that this matrix can be used in biomonitoring for metal exposure instead of liver, being more advantageous than the latter, since this is a less complex matrix, leading to easier pre-treatment, besides the possibility of not having to sacrifice the animal. Different clean-up protocols were tested with the aim of analysing bile by 1D and 2D electrophoresis and zymographies for protein and enzyme detection. The final clean-up protocol consists of sonication, centrifugation, delipidation and desalting. The presence of metallothioneins was analyzed in this matrix by 1D and 2D electrophoresis, spectrophotometry and SEC-HPLC-ICP-MS, and it was verified that there really is metallothionein expression in bile, showing similar behaviour to that reported in liver, of increased expression in environmental contamination situations. We also verified the existence of matrix metalloproteases in bile by gelatinolytic zymographies, and these also showed potential as biomarkers for environmental contamination, since some gelatinolytic bands were present only in a contaminated site in comparison to a reference location. This study verified the existence of two protein biomarkers in fish bile, one specific to metal contamination (metallothioneins) and one non-specific (matrix metalloproteinases), besides the possibility of utilizing fish bile as a biomarker to metal exposure by the determination of trace-elements in this matrix.

Keywords

Bile; proteins; proteomic techniques; fish; environmental contamination.

Sumário

1 INTRODUÇÃO	16
1.1. Biomarcadores	16
1.1.1. Definição e uso	16
1.1.2. Peixes como bioindicadores	19
1.2. Os campos proteômico e metaloproteômico e suas aplicações em estudos de monitoramento ambiental	20
1.2.1. O uso de biomarcadores em estudos proteômicos ambientais	22
1.2.2. A aplicação de técnicas proteômicas na identificação de biomarcadores protéicos em peixes	23
1.3. A bÍlis como biomarcador	26
1.4. MetalotioneÍnas como biomarcadores de exposição a metais em peixes	27
2 TÉCNICAS ANALÍTIICAS: DETERMINAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ELEMENTOS-TRAÇO E TÉCNICAS PROTEÔMICAS	29
2.1. Determinação e quantificação de elementos-traço	29
2.2. Técnicas proteômicas	30
2.2.1. A importância do preparo de amostras para aplicações proteômicas	31
2.2.2. Eletroforese uni- e bidimensional (1D e 2D)	34
2.2.3. Métodos de coloração de géis de eletroforese	36
2.2.4. Zimografias	37
2.2.5. Processamento das proteínas visualizadas através da eletroforese 2D	38
2.3. Espectrometria de massas na identificação de proteínas	39
2.3.1. MALDI	40
2.3.1.1. A importância da matriz	41
2.3.1.2. Analisador	42
2.4. Ferramentas de bioinformática	42

3 JUSTIFICATIVA	44
4 OBJETIVOS	45
3.1. Objetivo geral	45
3.2. Objetivos específicos	45
5 MATERIAL E MÉTODOS	47
5.1. Áreas de estudo	47
5.1.1. Lagoa Rodrigo de Freitas	48
5.1.2. Lagoa de Jacarepaguá	48
5.1.3. Itaipu	49
5.1.4. Praia de Ipiranga	50
5.1.5. Silva Jardim	50
5.2. Coleta de peixes	50
5.3. Experimento laboratorial de exposição de adultos de <i>Tilapia rendalli</i> a quantidade sub-letal de cobre	51
5.4. Processamento das amostras	52
5.5. Preparo e análise das amostras para análise de elementos-traço por ICP-MS	53
5.6. Preparo e análise das amostras de metalotioneínas extraídas de bÍlis	54
5.7. Preparo das amostras de bÍlis para eletroforese 1D e 2D (<i>Clean-up</i>)	56
5.7.1. Protocolo 1 – Sonicação seguida de centrifugação	56
5.7.2. Protocolo 2 – Deslipidificação	57
5.7.3. Protocolo 3 – Precipitação proteica por acetonitrila e etanol	57
5.7.4. Protocolo 4 – Depleção de albumina e imunoglobulina G (IgG)	58
5.7.5. Protocolo 5 – Dessalinização por diálise	58
5.7.6. Protocolo 6 – Dessalinização por gel-filtração	58
5.7.7. Protocolo 7 – Combinações de protocolos de <i>clean-up</i>	58
5.8. Determinação de proteínas totais em bÍlis de peixe	60
5.8.1. Método de Bradford	60
5.8.2. Método de Lowry modificado por Peterson	60
5.8.3. Método utilizando o 2D Quant-Kit (GE Healthcare®)	61

5.9. Eletroforese 1D e 2D de amostras de bÍlis de peixe	62
5.9.1. Coloração e revelação dos géis com Coomassie Blue G-250 e Nitrato de prata	64
5.9.2. Escaneamento e análise dos géis	64
5.10. Processamento dos <i>spots</i> proteicos para análise por espectrometria de massa	65
5.11. Análise por MALDI-ToF	65
5.12. Pesquisa bioinformática	66
5.13. Zimografias	66
5.14. Análises estatísticas	67
 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	 68
6.1. Análises de bÍlis e fÍgado por ICP-MS para determinação do conteúdo total de elementos-traço e verificação da possibilidade de usar apenas a bÍlis como biomarcador de exposição a metais	68
6.1.1. Controle de qualidade das análises	68
6.1.2. Concentrações de elementos-traço em bÍlis e fÍgado	69
6.1.3. Relações entre as concentrações de elementos-traço em fÍgado e bÍlis e a bÍlis como biomarcador de exposição a metais	72
6.1.4. Análise estatística por rede neural artificial	74
6.2. Preparo das amostras de bÍlis para eletroforese 1D e 2D e zimografia (<i>Clean-up</i>)	76
6.3. Dosagem de proteínas totais	80
6.4. Quantificação de metalotioneínas	80
6.4.1. Densitometria	80
6.4.2. Método espectrofotométrico (Reação de Ellman)	82
6.4.3. Separação de amostras de MT em géis 1D e 2D	84
6.5. Análise de metalotioneínas por LC-ICP-MS	88
6.6. Eletroforese 1D e 2D	96
6.7. Análise por MALDI-ToF	100
6.8. Zimografias	102
6.8.1. Comparações entre amostras contaminadas e de referência	104

7 CONCLUSÕES	110
7.1. Bólis de peixe como biomarcador de contaminação ambiental por metais	110
7.2. Análise de concentrados de metalotioneínas extraídas de bólis de peixe	111
7.3. <i>Clean-up</i> das amostras de bólis de peixe para análise por eletroforese 1D, 2D e zimografias	112
7.4. Metaloproteases de matriz (MMP) em bólis de peixe	112
7.5. Conclusões finais	113
8 PERSPECTIVAS	114
9 ANEXOS	115
10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	131

Lista de figuras

Figura 1. Esquema clássico dos níveis de respostas dos sistemas biológicos frente a poluentes (Bayne, Brown <i>et al.</i> , 1985).	18
Figura 2. Esquema de separação de proteínas através da técnica de eletroforese bidimensional.	35
Figura 3. Esquema da modificação das proteínas causada pelo uso dos SDS na eletroforese bidimensional.	36
Figura 4. Matrizes mais comumente usadas na técnica MALDI. A = Ácido sinapínico (ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxilcinâmico); B = ácido α -cyano-4-hidroxilcinâmico; C= ácido 2,5-dihidroxibenzóico; D= 2', 4', 6'-trihidroxiacetofenona; E= ácido retinóico <i>all trans</i> ; F = 3-aminoquinolina (Sporns e Wang, 1998).	41
Figura 5. Mapa mostrando a localização das 5 áreas de estudo do presente trabalho. As tainhas foram coletadas na Lagoa Rodrigo de Freitas, na Praia de Itaipu e na Praia de Ipiranga, enquanto as tilápias foram coletadas na Lagoa de Jacarepaguá, na Lagoa Rodrigo de Freitas e em Silva Jardim, e os acarás foram coletados apenas na Lagoa Rodrigo de Freitas.	47
Figura 6. Escala de cor das amostras de bÍlis coletadas ao longo deste trabalho. As bÍlis mais claras indicam que o peixe se alimentou recentemente, enquanto as bÍlis mais escuras indicam que o peixe está sem se alimentar por algum tempo.	56
Figura 7. Esquema dos procedimentos de <i>clean-up</i> das amostras de bÍlis de peixe.	59
Figura 8. Concentrações de elementos-traço em fÍgado ($\mu\text{g.g}^{-1}$ p.u.) e bÍlis ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) de tainhas coletadas em Itaipu e Ipiranga (Medianas \pm Desvio padr�o): (A) Mn, Cu e Cd, (B) Cr, Ni e Pb, (C) Zn. N=14 em Itaipu e N=40 em Ipiranga.	70
Figura 9. Borrões em zimografia 1D, com poucas bandas protéicas l�ticas definidas. (1. Amostra de bÍlis bruta de tainha; 2. amostra de	

bílis bruta de tilápia). 77

Figura 10. Borrões em géis 1D com poucas bandas protéicas definidas. (*Lane 1*. Padrão de peso molecular; *Lane 2*. Arraste do *Lane 3*; *Lane 3*. Amostra de bílis bruta de tainha; *Lane 4*. Arraste do *Lane 3*; *Lane 4*. Amostra de bílis bruta de tainha). 77

Figura 11. Gel representativo (12.5%) das etapas de *clean-up* realizadas com amostras de bílis de peixe: 1 – Padrão de peso molecular; 2 – Bílis bruta; 3 – Bílis sonicada por 5 minutos; 4 – Bílis sonicada por 5 minutos e centrifugada a 16.00 x g por 15 min; 5 – Bílis apenas dessalinizada; 6 – Bílis apenas deslipidificada; 7 – Bílis passada por todas as etapas de limpeza (sonicada, centrifugada, deslipidificada e dessalinizada). Coloração por Coomassie Blue G-250. 78

Figura 12. Quantificação de bandas de metalotioneína extraídas por extração térmica em amostras ambientais por densitometria. *Lane 1*: Padrões de peso molecular; *Lanes 2-7*: Padrões de BSA (curva); *Lanes 9-14*: Amostras ambientais de MT extraídas de bílis de tilápias da Lagoa de Jacarepaguá. Eletroferograma obtido através da separação utilizando o método de Laemmli. 81

Figura 13. Gráfico representando a quantificação de MT por reação espectrofotométrica das MTs presentes na bílis de *T. rendalli* em três localidades diferentes. Os dados estão apresentados como médias \pm desvio padrão. 83

Figura 14. Gráfico representando a quantificação por reação espectrofotométrica das MTs presentes nos fígados de *T. rendalli* do local de referência e do experimento de contaminação com cobre. Os dados estão apresentados como médias \pm desvio padrão. 83

Figura 15. Géis 1D comparando as corridas de amostras de MT de tilápias pelo método de Laemmli (A) e método de Schagger e Von Jagow (B). Os círculos em vermelho indicam as bandas de 14 kDa em cada um dos casos. Os géis são 15 %, corados por prata. 85

Figura 16. Eletroferograma 1D demonstrando a extração de metalotioneínas de amostras de bílis de tilápias e as diferenças entre amostras controle e amostras ambientais. *Lane 1*: Padrões de peso

- molecular; *Lane 2*: Amostra de MT extraída de bÍlis de tilÁpia da Lagoa Rodrigo de Freitas; *Lanes 3-7*: Amostras de MT extraÍdas de bÍlis de tilÁpia da Lagoa de JacarepaguÁ; *Lanes 8-10*: Amostras de MT extraÍdas de tilÁpias do local de referÊncia; *Lane 11*: Amostras de MT extraÍdas de tainha da Lagoa Rodrigo de Freitas; *Lane 12*: Amostras de MT extraÍdas de tainha obtida em supermercado. Eletroferograma obtido atravÊs da separaÇÇo utilizando o mÊtodo de Laemmli. 86
- Figura 17. Eletroferogramas 2D representativos do local controle (A) e da Lagoa de JacarepaguÁ (B), onde verificam-se pontos protÊicos mais expressos no local contaminado, e alguns pontos protÊicos do local de referÊncia que nÇo estÇo expressos no local contaminado. Eletroferograma obtido atravÊs da separaÇÇo utilizando o mÊtodo de Laemmli. As setas indicam as diferenÇas dos pontos protÊicos entre as duas localidades. 87
- Figura 18. Perfil cromatogrÁfico das metalotioneÍnas (nÇo-separado por íon) presentes em bÍlis de tilÁpias coletadas do local de referÊncia. As 3 cores diferentes indicam trÊs amostras de MT extraÍdas de 3 tilÁpias coletadas no local de referÊncia. 89
- Figura 19. Perfil geral das metalotioneÍnas presentes em bÍlis de tilÁpias coletadas do local de referÊncia separadas por íon determinado (Pb, Hg, Cd, Zn e Cu). A linha amarela (Cd) apresentou sinal tÇo baixo que se sobrepÇs ao eixo do grÁfico. 90
- Figura 20. Perfil de amostra de metalotioneÍnas de bÍlis de tilÁpias da Lagoa de JacarepaguÁ separado por íon. 91
- Figura 21. Perfil de metalotioneÍnas de bÍlis de tilÁpias da Lagoa Rodrigo de Freitas separado por íon. 91
- Figura 22. Perfis de MT de bÍlis de tainhas de 4 localidades diferentes: a linha azul escura indica amostra extraÍda de tainha obtida na praia de Ipiranga; a linha rosa indica amostra extraÍda de tainha obtida em supermercado local; a linha amarela indica amostra extraÍda de tainha obtida em uma feira livre local e a linha azul clara indica amostra extraÍda de tainha obtida em alto mar (Praia de Copacabana). 92

Figura 23. Perfis cromatográfico de MT extraídos de bÍlis de acarÁ da Lagoa Rodrigo de Freitas.	93
Figura 24. MT de bÍlis de tainha separada por íon.	93
Figura 25. Comparação entre o perfil de MT de bÍlis do presente estudo (A) e o citosol de fÍgado (B), ambos de acarÁ (<i>G. brasiliensis</i>) do estudo de Rodriguez-Cea e colaboradores (2006).	95
Figura 26. Perfil eletroforético 1D de amostras de bÍlis de tilÁpia e tainha, em gel 15 % corado com prata.	96
Figura 27. BÍlis de indivÍduos de <i>M. liza</i> com diferentes <i>status</i> alimentares: peixe que se alimentou recentemente, com bÍlis pouco concentrada (A), peixe que estÁ sem se alimentar hÁ algum tempo, com bÍlis razoavelmente concentrada (B) e peixe que estÁ sem se alimentar hÁ bastante tempo, com bÍlis muito concentrada (C). Géis 15 %, pH 3-10, coloração por nitrato de prata.	99
Figura 28. Espectro de padrÁo de BSA tripsinado para leitura por MALDI-ToF	101
Figura 29. Espectro da proteÍna RS27A_ICTPU.	101
Figura 30. Comparação entre os tempos de incubação dos géis de zimografia.	102
Figura 31. Perfil geral de MMPs em bÍlis de tainha (1A, 2A e 3A) e bÍlis de tilÁpia (1B, 2B e 3B).	104
Figura 32. Diferenças na bÍlis de tilÁpia do local de referênciA (<i>lanes</i> 1 e 2) e o local contaminado (Lagoa Rodrigo de Freitas, <i>lanes</i> 3 e 4). Os círculos mostram as bandas lítiCas presentes apenas no local contaminado.	105

Lista de tabelas

Tabela 1. Concentrações dos elementos (mg.kg^{-1} peso seco) no material de referência certificado (DORM-2 e DOLT-3). Valores são mostrados como média \pm DP (n=6).	68
Tabela 2. Correlações significativas entre as concentrações de elementos-traço em bÍlis e fÍgado na praia de Ipiranga.	73
Tabela 3. Resultados da rede neural para a importância de cada elemento nas duas matrizes.	75
Tabela 4. Condições dos ensaios enzimáticos e resultados	103
Tabela 5. Classificação das MMPs adaptado de Snoek-van Beurden e Hoff (2005).	106