

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

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

6.1.1. Controle de qualidade das análises.

A fim de estimar a exatidão do método, amostras de fÍgado e músculo de peixe certificadas foram analisadas. A tabela 1 mostra que não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores certificados e os valores observados. As recuperações variaram de 83 a 116 %, consideradas adequadas. Os valores obtidos para Pb foram altos, com recuperação acima de 120 %, indicando que uma melhor investigação é necessária para este elemento.

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).

Elemento	DOLT-3			DORM-2		
	Valor certificado	Valor observado	Recuperação em relação ao valor certificado (%)	Valor certificado	Valor observado	Recuperação em relação ao valor certificado (%)
Zn	86,6 \pm 2,4	82,94 \pm 0,5	96	25,6 \pm 2,3	24,6 \pm 2,8	96
Cd	19,4 \pm 0,6	18,87 \pm 0,6	97	0,04 \pm 0,01	0,05 \pm 0,01	116

Cu	31,2 ± 1,0	28,65 ± 0,5	92	2,34 ± 0,16	2,45 ± 0,69	105
Cr	n.p.	n.a.	n.a.	34,7 ± 5,5	34,3 ± 0,6	99
Ni	2,72 ± 0,35	2,35 ± 0,20	86	19,4 ± 3,1	16,50 ± 0,2	85
Pb	0,32 ± 0,05	0,42 ± 0,24	131	0,06 ± 0,01	0,08 ± 0,01	123
Mn	n.f.	n.a.	n.a.	3,66 ± 0,34	3,02 ± 0,21	83

n.f não fornecido; n.a. não analisado.

6.1.2.

Concentrações de elementos-traço em bÍlis e fÍgado

As concentrações de elementos-traço em fÍgado e bÍlis foram analisadas apenas em tainhas, coletadas na Praia de Ipiranga e na Praia de Itaipu. As concentrações de elementos-traço não apresentaram correlação significativa com o tamanho dos animais. Isto significa que nenhum dos elementos determinados tem sua concentração afetada pela idade dos animais. Não houve diferença significativa entre machos e fêmeas dos dois locais de coleta para as concentrações de elementos-traço em fÍgado e em bÍlis. Portanto, as amostras foram agrupadas independentemente do sexo. A figura 8 apresenta as concentrações de metais nos dois materiais biológicos analisados (como Medianas ± Desvio padrão, pela distribuição dos dados ser não-normal).

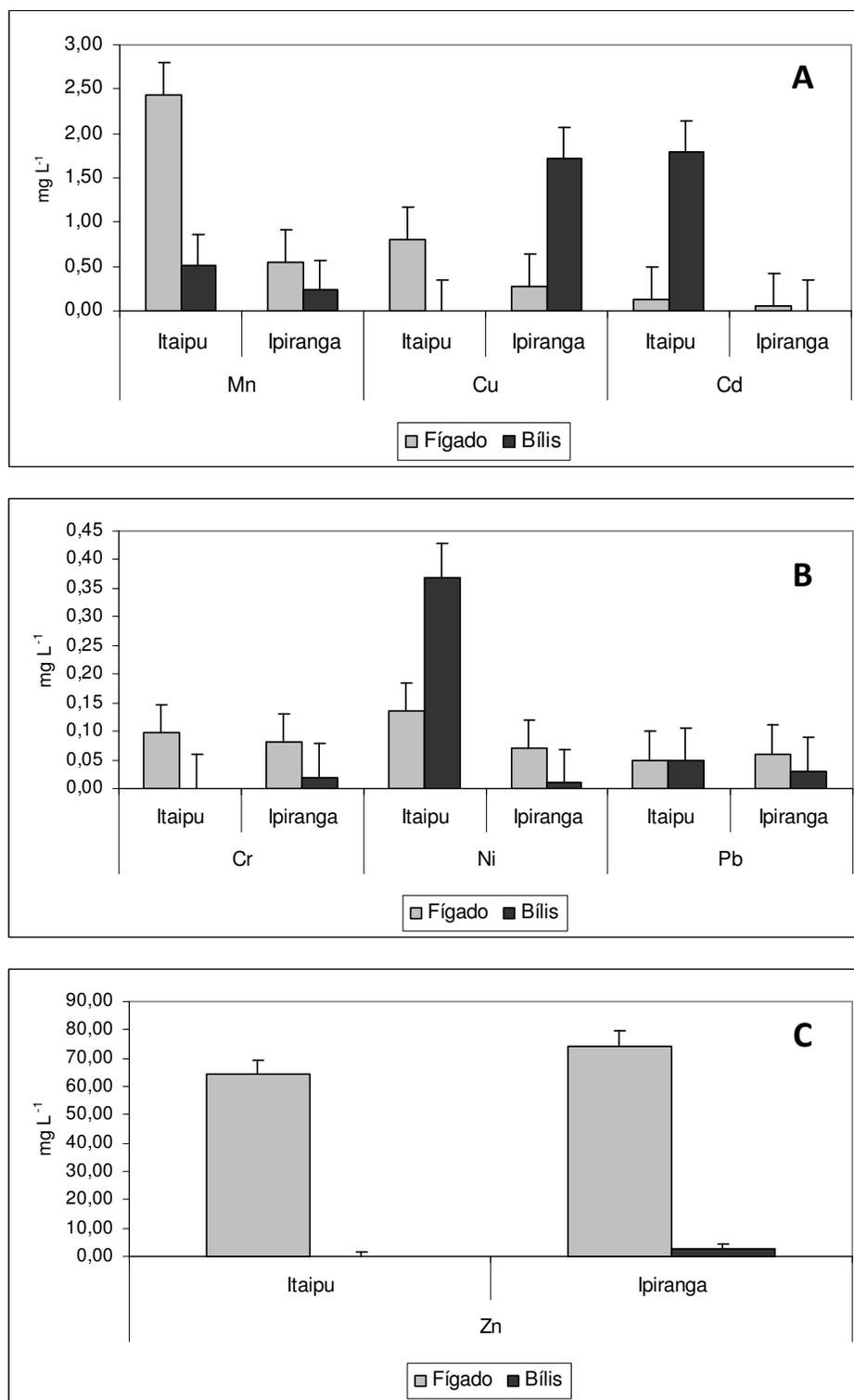


Figura 1. Concentrações de elementos-traço em fígado ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ p.u.) e bÍlis ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) de tainhas coletadas em Itaipu e Ipiranga (Medianas \pm Desvio padrŁo): (A) Mn, Cu e Cd, (B) Cr, Ni e Pb, (C) Zn. N=14 em Itaipu e N=40 em Ipiranga.

Os sete elementos avaliados neste estudo foram escolhidos devido à sua importância: Cu, Zn e Mn são elementos essenciais para o crescimento e bem-estar de organismos vivos, mas demonstram efeitos tóxicos quando os organismos são expostos em níveis mais altos que os normalmente necessários (Biney, Amuzu *et al.*, 1994; Ademoroti, 1996). Os primeiros dois elementos, por exemplo, servem de co-fatores em diversas enzimas e metaloproteínas para a maioria dos organismos vivos. Cu, em excesso, leva a dificuldades respiratórias e desequilíbrio de funções regulatórias por se acumular, primariamente, nas brânquias (Heath, 1991), enquanto o Zn em excesso reduz a capacidade funcional do fígado, levando a níveis altos de Zn serem transformados em sua forma mais tóxica (Zn^{+2}), que pode ser transportado pela corrente sanguínea para outros órgãos (Murugan, Karuppasamy *et al.*, 2008). Finalmente, Mn apresenta toxicidade moderada a organismos aquáticos e seu *uptake* em peixes tem sido reportado como sendo, primariamente, pelas brânquias (Nussey, Van Vuren *et al.*, 2000). Pb, Cr, Ni e Cd, por outro lado, não possuem nenhuma função essencial conhecida em atividades metabólicas e exibem propriedades tóxicas. O Cr, por exemplo, pode causar redução nas taxas de crescimento, aberrações cromossômicas e menor resistência à sua forma hexavalente (Epa, 1980), (Heath, 1991). Ni é um conhecido elemento carcinogênico e mutagênico e peixes demonstram efeitos sub-letais quando expostos a níveis altos deste elemento (Singh e Ferns, 1978; Nussey, Van Vuren *et al.*, 2000). A exposição ao Cd pode causar danos celulares e alterações nas atividades de diversas enzimas em peixes e mostra alto potencial para bioconcentração e acumulação nestes organismos (Viarengo, Bettella *et al.*, 1997; Yilmaz, 2009).

As concentrações de elementos traço foram detectáveis para todos os elementos estudados, devido à contaminação alta de metais presentes nos dois ambientes de coleta. Em alguns casos as concentrações dos elementos-traço em bÍlis foram mais altas na bÍlis do que no fÍgado, como no caso de Cu em Ipiranga, Cd e Ni em Itaipu (figura 6). Itaipu tem sido classificada como poluída com relação a metais, e os elementos Cu, Pb, Zn, Ni e Cr têm sido encontrados em quantidades significativamente mais altas que em outras áreas da região costeira de Niterói, devido a atividades navais e biodisponibilidade destes elementos à biota, podendo ser este o motivo desta diferença (Neto, Crapez *et al.*, 2005). Diferenças estatisticamente significativas entre os elementos-traço foram

observadas para Mn e Cd, tanto em fígado quanto em bÍlis, para Pb e Zn em bÍlis e para Ni, Zn e Cu em fígado. Em alguns casos os elemento-traço apresentaram nÍveis mais altos que outros lugares poluídos ao redor do mundo, indicando que a escolha dos locais de coleta foi adequada.

6.1.3.

Relações entre as concentrações de elementos-traço em fígado e bÍlis e a bÍlis como biomarcador de exposição a metais

Fisiologicamente, os peixes assimilam metais por diversas vias, como ingestão de material particulado suspenso ao longo da coluna d'água, ingestão de alimentos e adsorção em superfÍcies de tecidos e membranas. A concentração e acumulação destes elementos é relacionada a fatores como *status* trófico, fonte e especiação dos metais e disponibilidade de proteínas destoxicantes que se ligam à metais (Giesy e Weiner, 1977; Deb e Fukushima, 1999; Alam, Tanaka *et al.*, 2002). Depois da absorção do poluente, ele é transportado pelo sangue para um ponto de estocagem (por exemplo, um tecido ou osso) ou para o fígado, para ser biotransformado, seguido de sua excreção pela bÍlis ou armazenamento (Heath, 1991; Nussey, Van Vuren *et al.*, 2000). Devido a isto, diferentes espécies e tecidos usualmente apresentam diferentes concentrações de metais, o que demonstra a importância de verificar o potencial de novos biomarcadores em diferentes compartimentos, e, se estes apresentarem potencial e forem validados, substituir os marcadores antigos pelos novos. A análise de bÍlis também é mais vantajosa pois é uma matriz menos complexa que o fígado, facilitando sua análise química, e, o mais importante, pode não haver a necessidade de sacrificar os animais, obtendo as amostras através de canulação crônica do ducto hepático biliar, como descrito anteriormente (Grosell, O'donnell *et al.*, 2000), onde um pequeno orifÍcio é aberto próximo às guelras do peixe e um pequeno cânulo hepático é inserido para a coleta da bÍlis.

Não existem estudos com relação ao uso de bÍlis como biomarcador de exposição a metais, com exceção de um estudo conduzido no Mar do Norte (Westerlund, Aas *et al.*, 1998). Este estudo analisou três espécies de peixe, e comparou as concentrações de elementos-traço em fígado e bÍlis. Porém, um

problema que os autores observaram foi com relação às baixas concentrações de elementos-traço nas amostras, o que não permitiu que eles tirassem conclusões mais concretas a respeito do uso de bÍlis como biomarcador com relação à exposição à metais. Eles comentaram, também, que existe a necessidade de obter mais dados de localidades com nÍveis significativos de metais bem documentados nos nÍveis mais baixos da cadeia trÓfica, na Água ou no sedimento, para verificar possÍveis conexões entre nÍveis ambientes de metais e os nÍveis presentes na bÍlis. Como a Baía de Guanabara apresenta concentrações de metais significativamente mais altas que o Mar do Norte e os elementos determinados também apresentaram concentrações de metais significativamente mais altas do que os do estudo anterior, foi possível realizar correlações entre os elementos-traço dos dois compartimentos e tirar conclusões mais concretas a respeito do uso de bÍlis como biomarcador, neste caso.

Neste estudo, não foram encontradas correlações significativas entre os elementos-traço de bÍlis e fÍgado em Itaipu, mas em Ipiranga foram verificados as seguintes correlações (Tabela 2).

Tabela 2. Correlações significativas entre as concentrações de elementos-traço em bÍlis e fÍgado na praia de Ipiranga.

	Mn FÍgado	Cu FÍgado	Cd FÍgado
Mn BÍlis	0,538792	-	-
Cu BÍlis	-	0,510324	-
Cd BÍlis	-	-	-0,821429

Outras correlações também foram observadas entre Mn no fÍgado e Cu na bÍlis, e entre Pb no fÍgado e Zn na bÍlis, mas como elas apresentaram $r^2 < 0,50$ foram consideradas não significativas (Estas correlações estão apresentadas no Anexo I).

Estas correlações significativas e as correlações mais fracas que também foram verificadas, aliadas ao fato de que alguns elementos mostraram concentrações de elementos-traço mais altas na bÍlis do que no fÍgado (Ni, Cu, Cd e Cr em Itaipu e Cu em Ipiranga) reforçam a idéia de que a bÍlis de peixe possui potencial como biomarcador para exposição ambiental a metais. Cabe ressaltar, porém, que alguns elementos, como o Pb, neste estudo, mostraram valores muito

baixos, o que pode ter obscurecido quaisquer correlações com este elemento, devido à grande incerteza relativa associada a estas concentrações.

6.1.4. Análise estatística por rede neural artificial

As redes neurais utilizam a construção de um sistema que simula a função e o comportamento do cérebro humano, como os passos de aprendizado, erro e descobertas. Estas ferramentas possuem a vantagem de um sistema comportamental de aprendizado utilizando dados históricos, e, portanto, são não-condicionados por pressuposições inerentes relacionados à simplificações de modelos físicos e/ou estatísticos (Recknagel, French *et al.*, 1997; Rodrigues, Oliveira *et al.*, 2010). Tipicamente uma rede neural artificial consiste em uma camada de neurônios de entrada, pelo menos uma camada intermediária e uma camada de neurônios de saída. Os sinais são propagados camada por camada. As etapas de trabalho das redes neurais incluem a calibração, verificação e validação da rede, utilizando os dados a serem analisados (Matworks.)

Os três passos de análises por redes neurais, calibração, verificação e validação da rede, usaram 55,56 %, 29,63 % e 14,81 % indivíduos amostrados para as concentrações de fígado e 57,75 %, 26,76 % e 15,49 %, respectivamente, para as concentrações de bÍlis. As concentrações de elementos-traço em fígado apresentaram 100,00 % de classificação para todos os três tipos de amostra, e as concentrações de bÍlis apresentaram 100,00 %, 94,7 % e 90,9 % de classificação para cada uma das etapas de preparo da rede neural.

Os resultados da rede neural na comparação dos elementos-traço no fígado e na bÍlis estão apresentados na tabela 3.

Tabela 3. Resultados da rede neural para a importância de cada elemento nas duas matrizes.

Matriz	Fígado		Bílis	
	Importância	Importância normalizada (%)	Importância	Importância normalizada (%)
Elementos-traço	Importância	Importância normalizada (%)	Importância	Importância normalizada (%)
Cr	0,04	10,50	0,04	13,20
Ni	0,09	25,02	0,26	81,82
Cu	0,22	62,23	0,31	99,81
Mn	0,30	86,61	0,32	100,00
Zn	0,35	100,00	0,07	21,75

Estes resultados indicam que o Cr mostra uma importância semelhante tanto no fígado quanto na bílis, enquanto Ni e Cu mostram importância menor no fígado que na bílis. O Zn foi o elemento mais importante classificado no fígado (100,00 %), seguido do Mn (98,5 %), enquanto na bílis foram Mn (100,00 %) seguido do Cu (65,1 %). Isto significa que alguns elementos, devido a suas concentrações diferentes encontradas nos dois compartimentos, têm suas importâncias e classificações modificadas na análise de rede neural. As diferenças, ao comparar os dois compartimentos por esta análise estatística, são interessantes, pois no fígado Cr, Ni e Cu foram considerados como de baixa prioridade, enquanto na bílis sua importância era significativamente mais alta. Novamente, isto pode ser devido às diferenças altas nas concentrações observadas nos dois compartimentos, já que Zn, Ni e Cr no fígado e Cu na bílis se apresentaram significativamente mais altos em Ipiranga e Mn e Cu no fígado e Cd e Ni na bílis se apresentaram significativamente mais altos em Ipiranga. Mesmo levando isto em conta, os resultados da rede neural indicam que a bílis pode definitivamente ser uma opção em estudos de monitoramento de exposição a alguns metais, embora mais estudos ainda sejam necessários.

6.2. Preparo das amostras de bÍlis para eletroforese 1D e 2D e zimografia (*Clean-up*)

O sucesso dos protocolos de *clean-up* da bÍlis foi avaliado primeiramente analisado visualmente e qualitativamente os géis SDS-PAGE 1D e géis de zimografia, e posteriormente estatisticamente, comparando os 6 protocolos de *clean-up* utilizando a quantificação protéica total realizada pelos diferentes métodos de dosagem protéica. Nenhuma diferença significativa ($p>0,05$) foi observada entre os protocolos de purificação 1 e 2, mesmo quando estes dois protocolos foram combinados, realizando um processo seguido do outro. Os protocolos 3 e 4 mostraram perdas extremas de proteínas, enquanto os protocolos 5 e 6 foram os mais satisfatórios, sem diferenças significativas entre eles ($p>0,05$). Ao combinar os protocolos 1 e 2, nenhuma diferença significativa ($p>0,05$) foi observada com relação à quantificação protéica. O mesmo ocorreu na combinação do protocolo 2 com os protocolos 5 e 6.

Quando os resultados foram avaliados qualitativamente em géis SDS-PAGE 2D e géis 1D de zimografia, verificou-se a presença de diversos borrões ao usar as amostras dos protocolos 1 e 2, impossibilitando a interpretação dos resultados (Figura 7). Quase nenhuma banda protéica pôde ser visualizada usando os protocolos 3 e 4. As bandas mostraram separação bem-sucedida nos protocolos 5 e 6. Porém, o protocolo 5 é extremamente demorado, portando escolhendo-se o protocolo 6 como padrão para *clean-up* das amostras, dessalinizando-as por gel-filtração usando colunas recheadas com Sephadex G-25 (GE Healthcare), com um corte de 5 kDa e/ou concentradores Vivaspin com corte de 5 kDa. Estes resultados de *clean-up* foram equivalentes para as duas espécies de peixe, embora a bÍlis de tainha tenha mostrado uma melhoria significativamente maior após *clean-up*, já que esta espécie possui maior conteúdo de sais e lipídios. A figura 9 mostra as bÍlis brutas em géis de zimografia, a figura 10 mostra as bÍlis brutas em géis 1D de eletroforese corados com prata e a figura 11 demonstra as etapas de *clean-up* realizadas em géis SDS-PAGE.

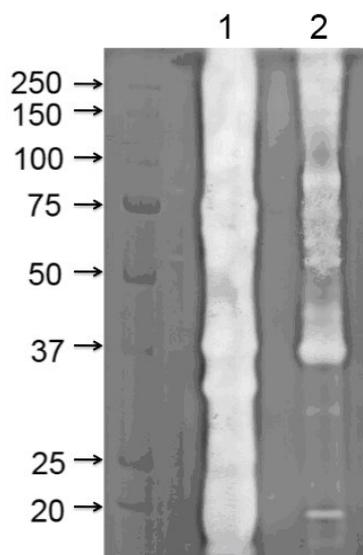


Figura 2. Borrões em zimografia 1D, com poucas bandas protéicas líticas definidas. (1. Amostra de biliar bruta de tainha; 2. amostra de biliar bruta de tilápia).



Figura 3. 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 biliar bruta de tainha; *Lane 4.* Arraste do Lane 3; *Lane 4.* Amostra de biliar bruta de tainha).

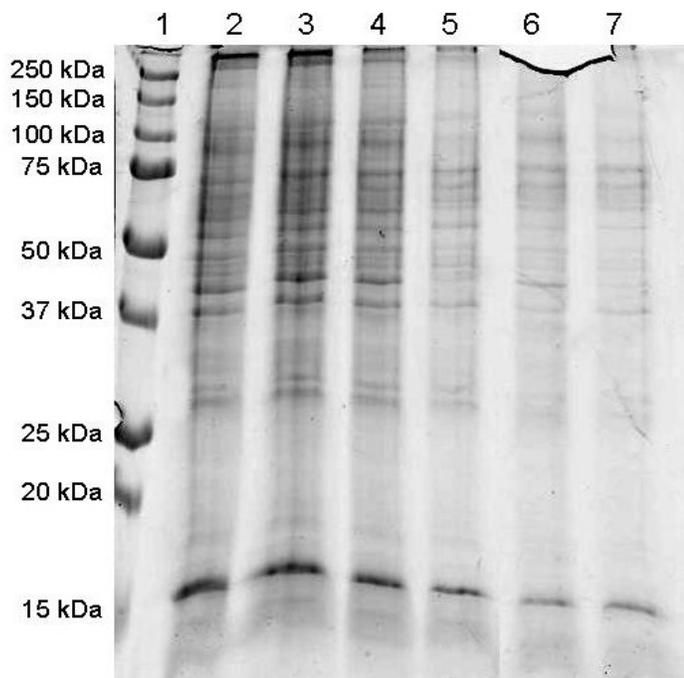


Figura 4. Gel representativo (12.5%) das etapas de *clean-up* realizadas com amostras de bÍlis de peixe: 1 – Padrão de peso molecular; 2 –BÍlis bruta; 3 – BÍlis sonicada por 5 minutos; 4 – BÍlis sonicada por 5 minutos e centrifugada a 16.00 x g por 15 min; 5 – BÍlis apenas dessalinizada; 6 – BÍlis apenas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

A bÍlis é notoriamente difÍcil de ser analisada por eletroforese, e os resultados deste estudo demonstram a necessidade de uma limpeza de amostra muito cuidadosa. Alguns estudos sobre a purificação de bÍlis já foram conduzidos – embora em amostras humanas - (Kristiansen, Bunkenborg *et al.*, 2004; Farina, Dumonceau *et al.*, 2009). Os métodos testados no presente trabalho foram realizados de acordo com estes estudos, e apresentaram resultados adequados para as análises de géis de eletroforese e MS conduzidos.

Sais, lipÍdeos e pigmentos biliares presentes na bÍlis interferiram significativamente com a quantificação de proteínas e separação por eletroforese e zimografias. Como a preocupação principal existente ao se trabalhar com a bÍlis são os sais biliares, presentes em grande quantidade, o foco dos protocolos de

clean-up era a remoção dos mesmos, de maneira a interferir o mínimo possível na amostra.

A centrifugação, embora eficaz na remoção de material insolúvel, muitas vezes não age em nenhum outro constituinte, tornando outras estratégias necessárias (Ge-Healthcare, 2004).

Os lipídeos reduzem a solubilidade protéica e podem afetar o ponto isoelétrico e o peso molecular das proteínas. Porém, mesmo após a deslipidificação, as amostras muitas vezes ainda contêm outros contaminantes, como sais e pigmentos (Ge-Healthcare, 2004).

A precipitação por acetonitrila/etanol é clássica no *clean-up* de matrizes complexas, como a bÍlis. Porém, é também um método que resulta em perda protéica, pois a precipitação pode ser incompleta, a proteína precipitada pode ser difícil de ressusender e muitas vezes não pode ser completamente recuperada. O procedimento em si também pode introduzir íons que interferem na eletroforese, além de ser um procedimento demorado (Ge-Healthcare, 2004).

A remoção de albumina e IgG é rotineiramente utilizada em amostras de soro e sangue, pois estes constituintes muitas vezes estão presentes em grandes quantidades e interferem na análise de géis de eletroforese. Porém, a albumina também é conhecida como proteína carreadora, e recentemente descobriu-se que centenas de proteínas estão ligadas à albumina ou ao IgG no plasma. Portanto, ao utilizar processos de depleção, informações importantes podem ser perdidas (Shen, Kim *et al.*, 2005). Isto foi confirmado no presente estudo, em que as amostras sem albumina e IgG mostraram praticamente nenhuma proteína nos géis de eletroforese e na quantificação protéica. Portanto, este método não foi utilizado por não ser compatível com o objetivo deste estudo.

A diálise é um método eficaz, porém muito demorado e requer grandes volumes de soluções e amostra. Como nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada entre este protocolo e a gel-filtração com corte de 5 kDa, este último protocolo foi escolhido como ideal para o *clean-up* das amostras de bÍlis, e pode ser considerado um protocolo simples e eficaz, interferindo o mínimo possível na amostra.

Estudos prévios em nosso laboratório indicam que a bÍlis de tainha é composta por mais pigmentos biliares do que a bÍlis de tilápia, verificado pelo conteúdo de biliverdina em seu comprimento de absorção (380 nm), em um

espectrofotômetro Lambda 19 Perkin Elmer[®]. Portanto, é razoável assumir que a bÍlis desta espécie também contenha mais sais. Isto foi visualmente confirmado por borrões grandes em amostras de bÍlis de tainha corridos em SDS-PAGE 1D e zimografia, tornando quase impossível discernir bandas protéicas individuais. A bÍlis de tilápias também mostrou alguns borrões, porém em menor intensidade. Depois do *clean-up* das amostras foram verificados resultados reprodutÍveis para ambas as espécies de peixe por separação 1D e zimografia.

6.3. Dosagem de proteínas totais

As amostras brutas de bÍlis foram impossÍveis de quantificar, devido a muitos interferentes, por todos os métodos de dosagem protéica. Após o *clean-up*, os resultados mostraram-se melhores e mais coerentes.

Os métodos de Bradford e do biureto não se mostraram adequados para a quantificação de proteínas totais em bÍlis de peixe, pois variaram significativamente ($p < 0,05$) entre si em uma faixa muito ampla, mostrando uma tendência a super-estimar a quantidade de proteínas. Os métodos de Lowry modificado por Peterson e o kit 2D Quant-kit (GE Healthcare) retornaram resultados bons e coerentes entre si, porém o kit 2D-Quant Kit mostrou-se mais rápido e reprodutÍvel, portanto foi escolhido para ser o método padrão de dosagem protéica em bÍlis de peixe.

6.4. Quantificação de metalotioneínas

6.4.1. Densitometria

A quantificação de metalotioneínas por densitometria é um método relativamente simples, onde o gel é scaneado e depois analisado via software de

imagem (Adobe Photoshop®). As intensidades das bandas de um padrão conhecido (BSA) são então calculadas para plotar uma curva analítica e então quantificar as bandas de interesse de amostras analisadas juntamente com a curva analítica (Fig. 12).

As curvas do presente trabalho apresentaram r^2 na ordem de 0,988 a 0,990, consideradas adequadas para este tipo de quantificação, e foi possível quantificar as bandas de metalotioneína, que apresentaram valores consistentes com a reação espectrofotométrica de Ellman, descrita a seguir.

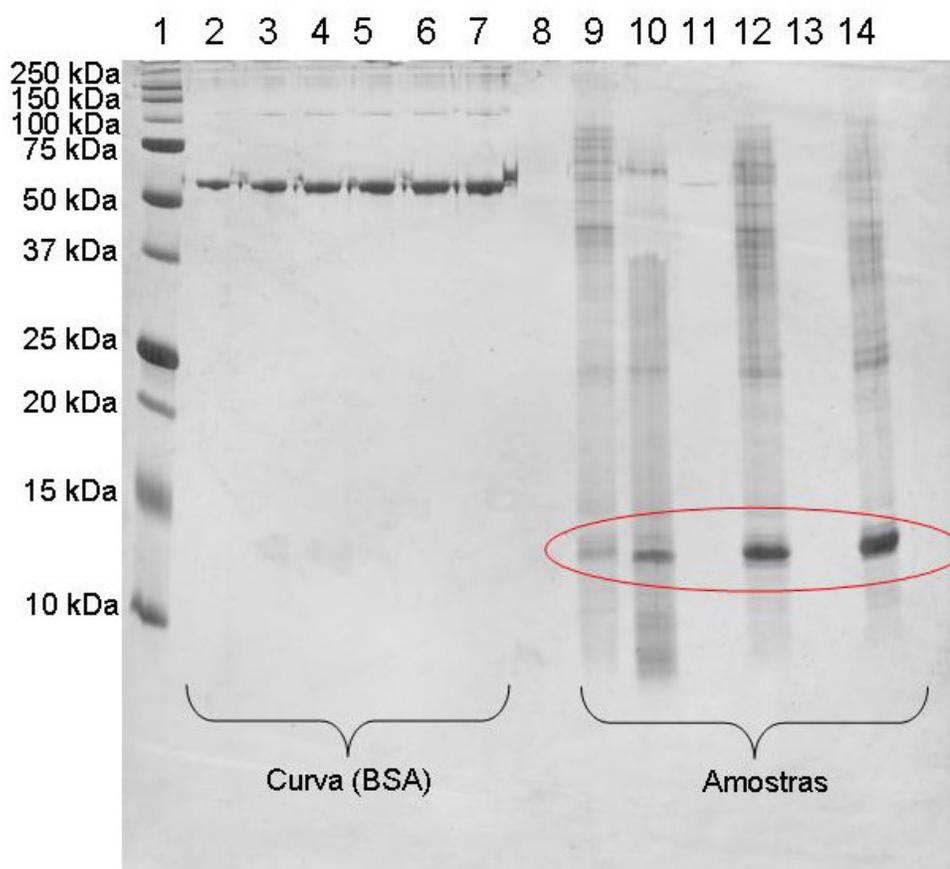


Figura 5. Quantificação de bandas de metalotioneína extraídas por extração térmica em amostras ambientais por densitometria. *Lane 1*: Padrões de peso molecular; *Lanes 2-7*: Padrões de BSA (curva); *Lanes 9-14*: Amostras ambientais de MT extraídas de bÍlis de tilÁpias da Lagoa de JacarepaguÁ. Eletroferograma obtido atrÁvés da separaÁo utilizando o mÉtodo de Laemmli.

6.4.2. Método espectrofotométrico (Reação de Ellman)

A reação espectrofotométrica de Ellman é específica para a detecção de proteínas ricas em cisteína, um grupo que inclui as MT, e tem sido extensivamente utilizada para a quantificação destas proteínas. Este método de quantificação também é simples, mas se destaca em comparação com a densitometria por ser significativamente mais rápido.

As curvas analíticas obtidas através deste método apresentaram melhores resultados que os por densitometria, com r^2 sempre acima de 0,997. Como este r^2 se mostrou mais alto que o r^2 obtido através da quantificação por densitometria nos géis SDS-PAGE, os valores entre os dois métodos foram consistentes e o método espectrofotométrico é mais rápido e simples de realizar, optamos por quantificar as metalotioneínas de bÍlis por este método, ao invés da densitometria. Os resultados da quantificação pela reação de Ellman estão demonstrados na figura 13. Os três grupos demonstraram ser estatisticamente diferentes entre si ($p < 0,05$), com valores mais baixos no local de referência (N=4), valores intermediários na Lagoa de Jacarepaguá (N=6) e os valores mais altos no experimento de contaminação laboratorial com concentrações sub-letais de cobre (N=10), indicando o mesmo comportamento que as MT de fÍgado de peixe descritos na literatura onde estas proteínas estão mais expressas em locais com contaminação por metais (Langston, Chesman *et al.*, 2002), sendo consideradas bioindicadores de contaminação ambiental por metais no ambiente aquático.

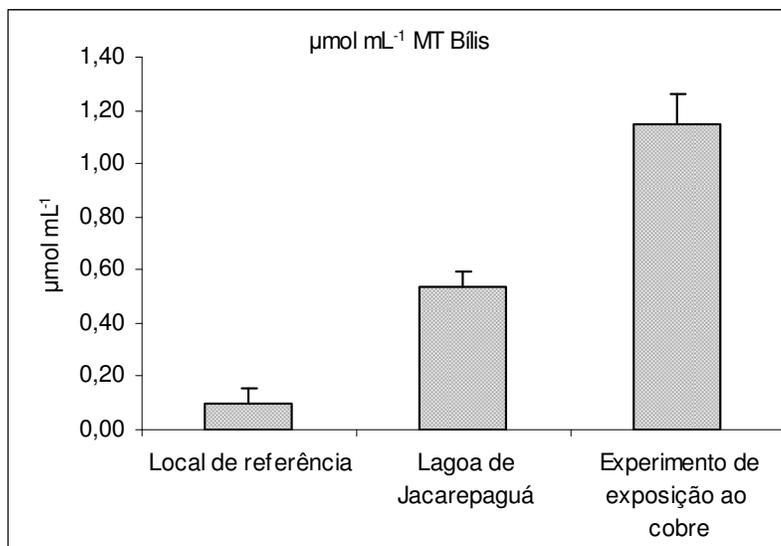


Figura 6. Gráfico representando a quantificação de MT por reação espectrofotométrica das MTs presentes na bÍlis de *T. rendalli* em três localidades diferentes. Os dados estão apresentados como médias \pm mesvio padrão.

Para fins de comparação também foi realizada a quantificação de amostras de MT de fÍgados de peixes do local de referência (n=9) e do experimento de contaminação com cobre em laboratório (n=10) pelo método de Ellman (Figura 14).

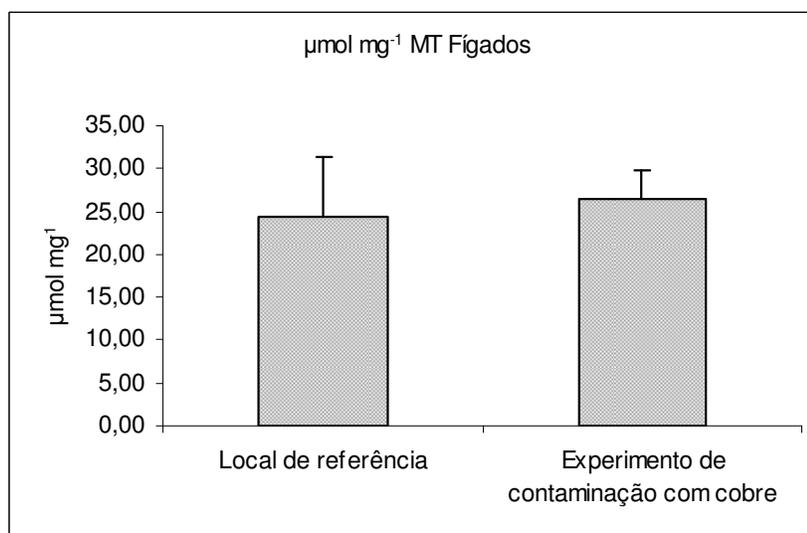


Figura 7. Gráfico representando a quantificação por reação espectrofotométrica das MTs presentes nos fÍgados de *T. rendalli* do local de referência e do

experimento de contaminação com cobre. Os dados estão apresentados como médias \pm desvio padrão.

Neste caso, não houve diferença significativa entre os dois grupos, embora as concentrações de MT nos fígados contaminados tenham se apresentado consistentemente mais altas. As MT de fígado apresentaram valores aproximadamente 25 vezes maiores que as MT de bÍlis da Lagoa de Jacarepaguá, e aproximadamente 250 vezes maiores que as MT de bÍlis do local de referência.

6.4.3.

Separação de amostras de MT em géis 1D e 2D

Ao analisar os eletroferogramas 1D de amostras de metalotioneínas em bÍlis, foi verificado que a extração térmica foi bem-sucedida, embora tenham permanecido algumas outras bandas proteicas em algumas das amostras. Porém, dessas bandas nenhuma se apresentou muito próxima dos 14 kDa, que seriam as bandas correspondentes à metalotioneínas de acordo com a literatura, indicando que estas proteínas estão presentes em fígados de tilápia em sua forma de dímero, com este mesmo peso molecular (Chen, Chen *et al.*, 2004). Outros estudos também indicam que as MT em fígados de outras espécies de peixe possuem peso molecular de 11 kDa em peixe-pedra, 10-12 kDa em uma espécie de linguado e 13-15 kDa em outra espécie de linguado (Kito, Tazawa *et al.*, 1982; Kammann, Friedrich *et al.*, 1996). Portanto, temos confiança de que a identificação destas bandas de 14 kDa em bÍlis de peixe está correta como sendo de metalotioneínas. Além disso, em muitas das amostras, a extração térmica resultou em apenas uma banda com peso próximo a 14 kDa visualizada nos géis, sendo as outras bandas visíveis de peso molecular muito alto, não sendo possíveis serem metalotioneínas.

Foi verificado que não houve diferença entre correr os géis de eletroforese pelo protocolo de Laemmli (géis 15%) utilizando tris-glicina ou pelo protocolo de Schagger e Von Jagow (géis 16,5%) que utiliza tricina como íon carreador, pois o peso molecular aparente das metalotioneínas de bÍlis de tilápias é de 14 kDa, grande o suficiente para ser separada adequadamente pelo método de Laemmli

(figura 15). Portanto, escolheu-se realizar as corridas usando este método, pois o tampão de Laemmli é mais simples e rápido de preparar.

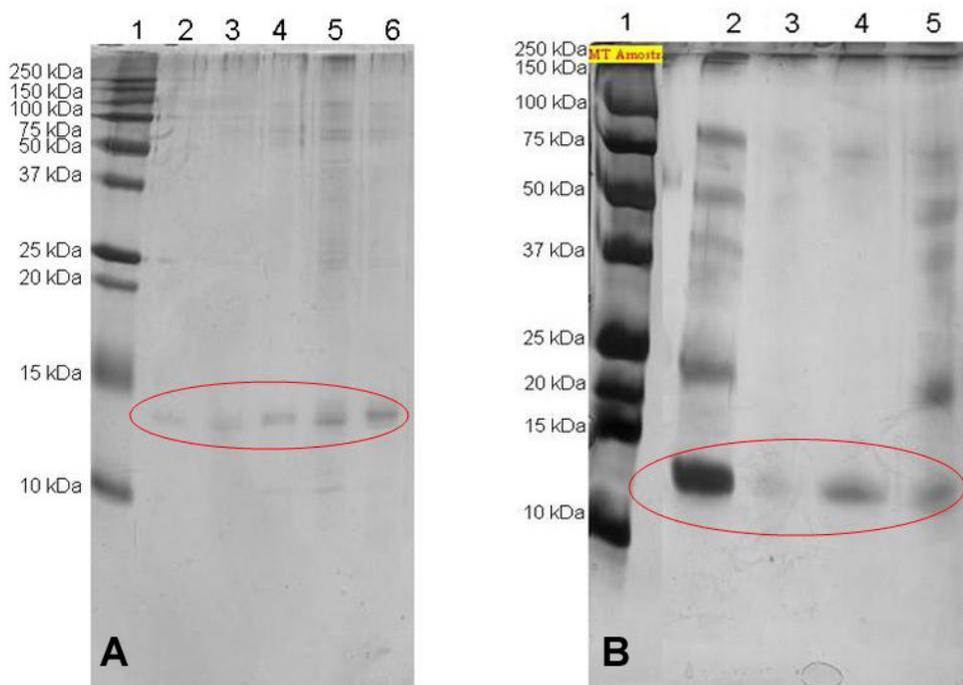


Figura 8. Géis 1D comparando as corridas de amostras de MT de tilápias pelo método de Laemmli (A) e método de Schagger e Von Jagow (B). Os círculos em vermelho indicam as bandas de 14 kDa em cada um dos casos. Os géis são 15 %, corados por prata.

As bandas de 14 kDa foram evidenciadas fortemente em amostras ambientais expostas no ambiente, e mais fortes nos indivíduos expostos a cobre no experimento realizado em laboratório. Nas amostras do local de referência foram verificadas bandas extremamente fracas (figura 16). Estes perfis observados nos géis 1D são consistentes com a quantificação de MTs pela reação espectrofotométrica de Ellman descrita na seção 6.4.2.

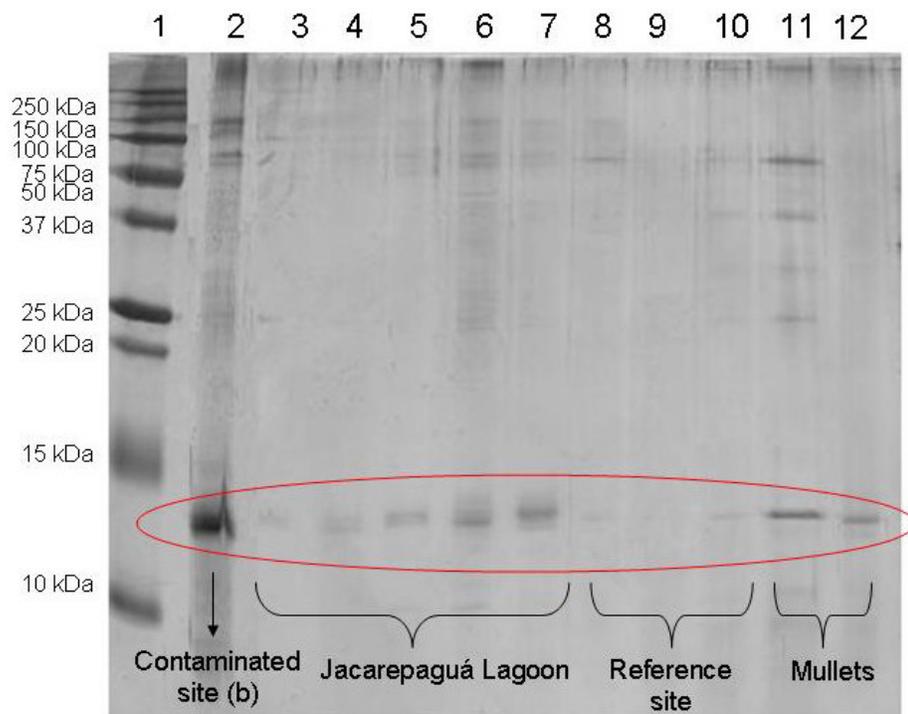


Figura 9. Eletroferograma 1D demonstrando a extração de metalotioneínas de amostras de bÍlis de tilÁprias e as diferençAs entre amostras controle e amostras ambientais. *Lane 1*: Padrões de peso molecular; *Lane 2*: Amostra de MT extraída de bÍlis de tilÁpia da Lagoa Rodrigo de Freitas; *Lanes 3-7*: Amostras de MT extraídas de bÍlis de tilÁpia da Lagoa de JacarepaguÁ; *Lanes 8-10*: Amostras de MT extraídas de tilÁprias 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 através da separaçáo utilizando o método de Laemmli.

O segundo *lane* é uma amostra de tilÁpia de outro local contaminado (Lagoa Rodrigo de Freitas, mais contaminado que JacarepaguÁ por metais, e, conseqüentemente, apresentando uma banda mais intensa). Os *lanes 3-7* sáo amostras de MT extraídas de bÍlis de tilÁpia da Lagoa Rodrigo de Freitas, e os *lanes 8-10* sáo amostras do local de referênciA. Os dois últimos *lanes* sáo amostras de outra espécie, tainhas, para verificaçáo se também seria possÍvel determinar a presençA de metalotioneínas em bÍlis desta outra espécie, o que foi confirmado (sáo duas amostras ambientais, uma de um lugar contaminado – Praia de Ipiranga

– e outro vendido em feira livre). Os *lanes* 3-7 são amostras de MT extraídas de bÍlis de tilÁpia da Lagoa de JacarepaguÁ, apresentando bandas mais intensas que as bandas de referÊncia, vistas nos *lanes* 8-10.

Nos eletroferogramas 2D (fig. 17) verificam-se a existÊncia de pontos protÉicos que nÁo estÁo presentes no local de referÊncia (A – Silva Jardim) e aparentes no local contaminado (B – Lagoa de JacarepaguÁ). TambÊm se verifica que alguns dos pontos protÉicos existentes nos dois locais no gel B sÁo mais intensos, confirmando as diferenÇas observadas nos eletroferogramas 1D. TambÊm foram corridos eletroferogramas 2D destas amostras com o peso molecular ao lado direito, confirmando o peso molecular dos pontos mostrados abaixo como sendo de 14 kDa (dados nÁo mostrados pois os gÉis se deterioraram antes de ser possÍvel o seu escaneamento).

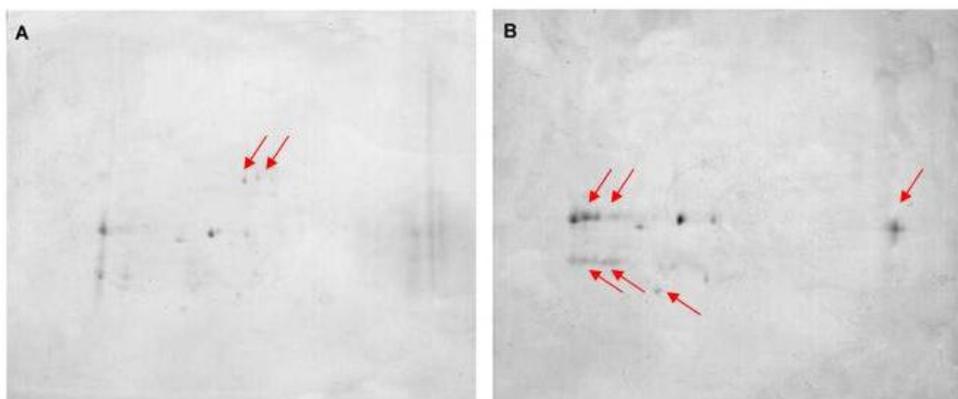


Figura 10. Eletroferogramas 2D representativos do local controle (A) e da Lagoa de JacarepaguÁ (B), onde verificam-se pontos protÉicos mais expressos no local contaminado, e alguns pontos protÉicos do local de referÊncia que nÁo estÁo expressos no local contaminado. Eletroferograma obtido atravÊs da separaÇÁo utilizando o mÉtodo de Laemmli. As setas indicam as diferenÇas dos pontos protÉicos entre as duas localidades.

6.5. Análise de metalotioneínas por LC-ICP-MS

Embora o acoplamento SEC-HPLC não pode distinguir entre as isoformas de metalotioneínas MT-1 e MT-2, este é um primeiro passo recomendado para visualizar o perfil inteiro de metalotioneínas e quais elementos estão ligados a estas proteínas (Prange e Schaumlöffel, 2002). Portanto, após a extração térmica das MT de bÍlis de peixe, foram realizadas separações SEC-HPLC-ICP-MS com leituras realizadas online de 5 elementos (Cu, Cd, Zn, Pb e Hg) para caracterizar os perfis de MT da bÍlis de três espÉcies de peixe, tainhas, tilÁpias e acarás.

Os perfis cromatográficos para as amostras mostraram pequenas variações, mas a maioria das espÉcies presentes eluiu entre 10 e 30 min, apresentando 5-7 sinais contendo os metais associados a estas proteínas. Os íons Cu e Zn estão presentes em todas as amostras de MT, tanto de bÍlis quanto de fÍgado (Figuras 18-24). Algumas amostras apresentaram baixos sinais de Hg e Pb, e na maioria das amostras não observou-se a presença de sinais de Cd.

Em algumas das amostras de bÍlis de tilÁpia do local de referÉncia, o sinal contendo Zn se sobrepôs com outros contendo Cu, porÉm outros sinais de Cu tambÉm foram verificados na ausÉncia de Zn. Isto estÁ de acordo com um estudo que analisou fÍgado de acarás por esta mesma tÉcnica, e que tambÉm verificou a detecção de um sinal de Cu nÁo contendo Zn (Rodríguez-Cea, Arias *et al.*, 2006). Os autores desse estudo indicam com isso um comportamento único de ligaçÁo diferencial a metais por algumas isoformas de MT, tambÉm reportada em outros estudos (Vasak e Hasler, 2000; Ferrarello, De La Campa *et al.*, 2002), e que, portanto tambÉm ocorre com as MT de bÍlis de tilÁpias, podendo, como os autores postulam, ser relacionado com os diferentes papÉis de destoxificaçÁo e regulaçÁo de metais no organismo. Os resultados obtidos com relaçÁo a MT de bÍlis de tilÁpias indicam, portanto, que alÉm destas proteínas exibirem comportamento semelhante ao do fÍgado, com expressÁo aumentada em locais com contaminaçÁo por metais, podem tambÉm exibir caracterÍsticas únicas com relaçÁo à suas ligaçÁes com metais.

Os perfis de MT de bÍlis e fÍgado de peixe se mostraram semelhantes aos perfis de MT observados em estudos com diferentes matrizes em diferentes

organismos, como fluido cerebrospinal em humanos, fígado e rins de ratos, citosol proveniente de cérebro humano e citosóis de fígado de diferentes espécies de peixe (Polec, Perez-Calvo *et al.*, 2002; Richarz e Bratter, 2002; Rodriguez-Cea, Arias *et al.*, 2006; Gellein, Roos *et al.*, 2007), mais uma confirmação independente de que, realmente, as metalotioneínas estão presentes na bÍlis. Os perfis de Cu, curiosamente, se mostraram praticamente idênticos em muitas das amostras aos sinais de Cu observados em amostras de MT do citosol do cerebelo humano (Richarz e Bratter, 2002).

A figura 18 indica o perfil cromatográfico (no-separado por íon) das metalotioneínas presentes na bÍlis de tilapias do local de referncia (Silva Jardim), apenas para verificar os tempos de eluio da metalotioneína.

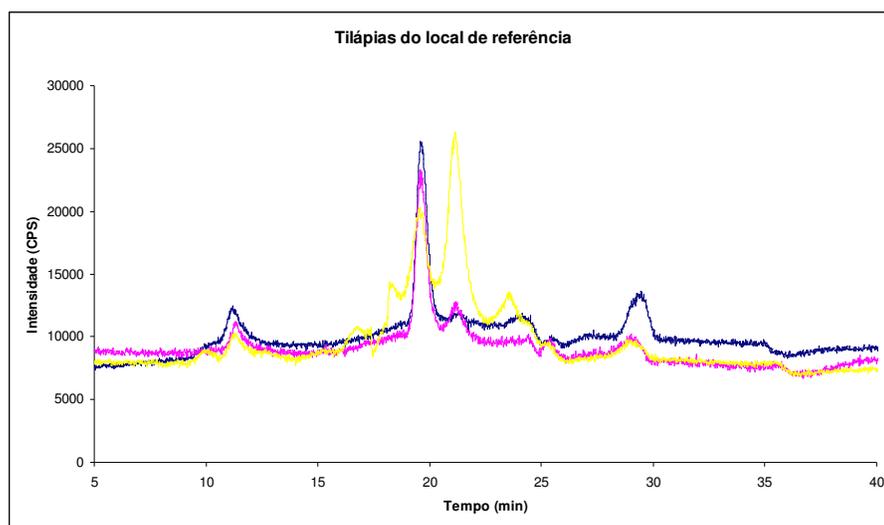


Figura 11. Perfil cromatográfico das metalotioneínas (no-separado por íon) presentes em bÍlis de tilapias coletadas do local de referncia. As 3 cores diferentes indicam trs amostras de MT extraídas de 3 tilapias coletadas no local de referncia.

Ao separar este perfil de MT extraídas de bÍlis de tilapia do local de referncia por íon (Pb, Hg, Cd, Zn e Cu), verifica-se o perfil da figura 19. O sinal de Zn e o sinal de Cu apresentaram o mesmo tempo de reteno em quase todas as amostras analisadas, tanto de bÍlis quanto de fÍgado. Verificam-se sinais diferenciados de cada íons, com um perfil característico.

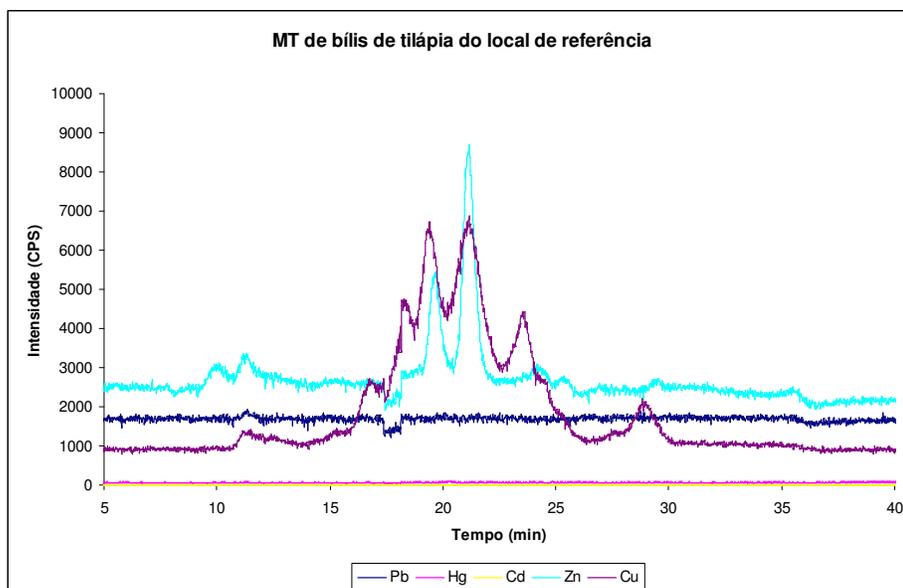


Figura 12. Perfil geral das metalotioneínas presentes em bÍlis de tilÁprias coletadas do local de referÊncia separadas por íon determinado (Pb, Hg, Cd, Zn e Cu). A linha amarela (Cd) apresentou sinal tÁo baixo que se sobrepÔs ao eixo do grÁfico.

Os perfis cromatogrÁficos de MT extraÍdas de bÍlis de tilÁprias do local de referÊncia se mostraram muito similares, onde a eluiçÁo das MT se deu entre 10 e 30 min, aproximadamente, com sinais bem definidos de Zn e Cu e nenhum sinal aparente de Cd, Pb ou Hg.

Ao analisar as amostras ambientais, verificou-se um perfil semelhante Às amostras do local de referÊncia, com algumas pequenas diferençAs ao separar as amostras por local de coleta. No caso das amostras coletadas na Lagoa de JacarepaguÁ, todas as amostras de tilÁpia apresentaram perfil semelhante entre si, e tambÊm similares Às amostras de referÊncia (Fig. 20). HÁ a presençA de 2 ou mais sinais de Zn contendo Cu. As amostras de MT extraÍdas de tilÁprias da Lagoa Rodrigo de Freitas apresentaram perfil semelhante, porÊm com menos sinais distintos de Cu (Fig 21), tambÊm apresentando 2 ou mais sinais de Zn contendo Cu. Na figura 21 foi deliberadamente cortada a escala, pois o sinal de Zn se apresentou com uma CPS muito maior que os demais íons (chegando a 28000 CPS). Isto foi feito para a visualizaçÁo adequada do perfil dos outros íons.

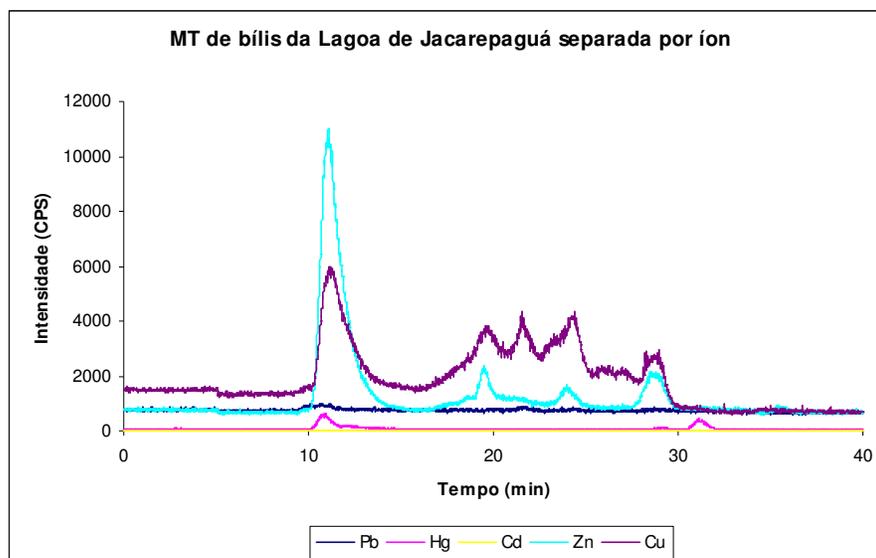


Figura 13. Perfil de amostra de metalotioneÍnas de bÍlis de tilÁpias da Lagoa de JacarepaguÁ separado por íon.

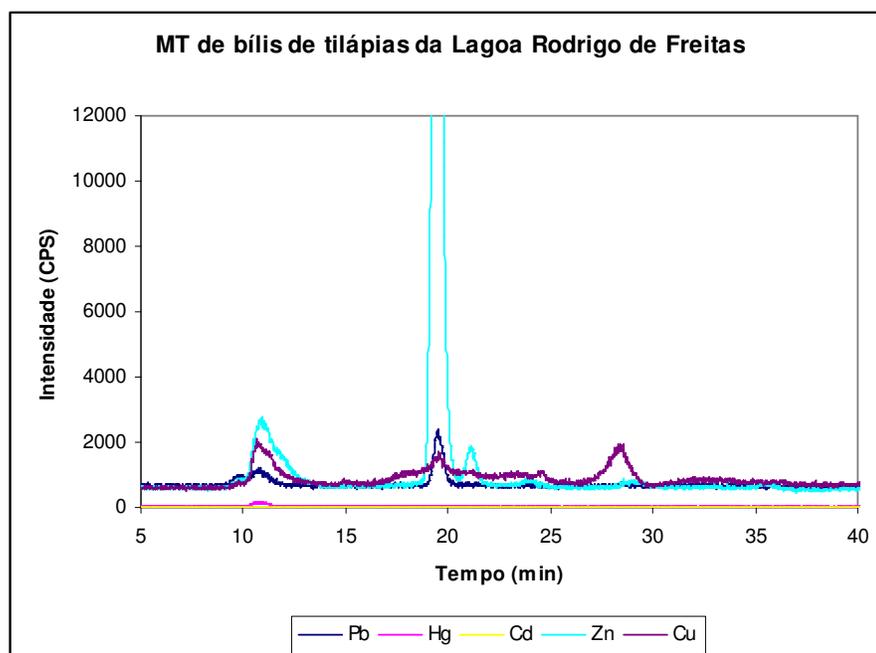


Figura 14. Perfil de metalotioneÍnas de bÍlis de tilÁpias da Lagoa Rodrigo de Freitas separado por íon.

Ao comparar as amostras de bÍlis com as amostras de fÍgado do local de referÊncia (dados nÁo mostrados), foi observado o mesmo perfil em ambas as matrizes, o que indica que, aparentemente, foi extraÍda a mesma isoforma de MT

em ambos os casos. Porém, como colunas de exclusão por tamanho não conseguem separar a isoforma, isto é apenas uma hipótese, devido ao mesmo perfil observado.

Também foi possível a análise de amostras de bÍlis de outras espécies por SEC-HPLC-ICP-MS, evidenciando um perfil semelhante ao das MTs de bÍlis de tilápia (Fig. 22 e 23, respectivamente tainhas e acarás), comprovando que esta proteína está expressa também em bÍlis de outras espécies. Foram analisadas neste caso tainhas da Praia de Ipiranga, de alto mar (Praia de Copacabana), de uma feira livre e de um supermercado local, e acarás da Lagoa Rodrigo de Freitas.

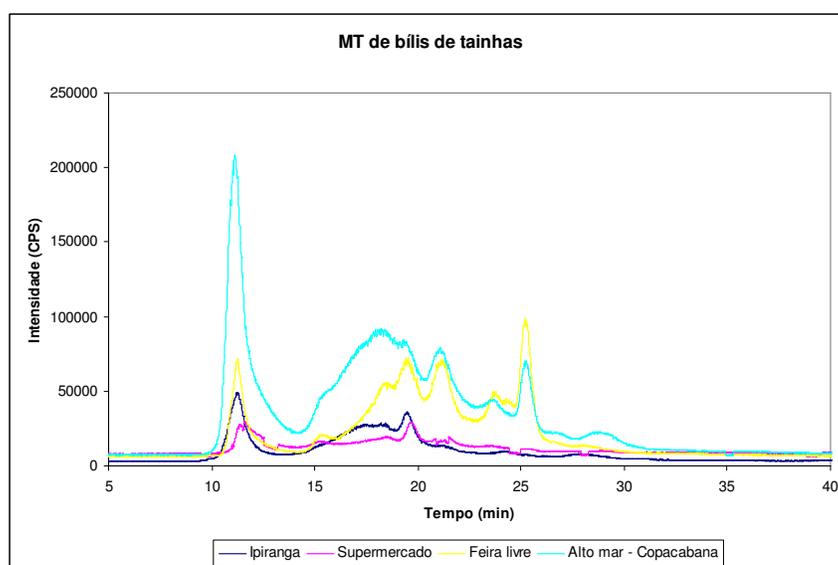


Figura 15. Perfis de MT de bÍlis de tainhas de 4 localidades diferentes: a linha azul escura indica amostra extraída de tainha obtida na praia de Ipiranga; a linha rosa indica amostra extraída de tainha obtida em supermercado local; a linha amarela indica amostra extraída de tainha obtida em uma feira livre local e a linha azul clara indica amostra extraída de tainha obtida em alto mar (Praia de Copacabana).

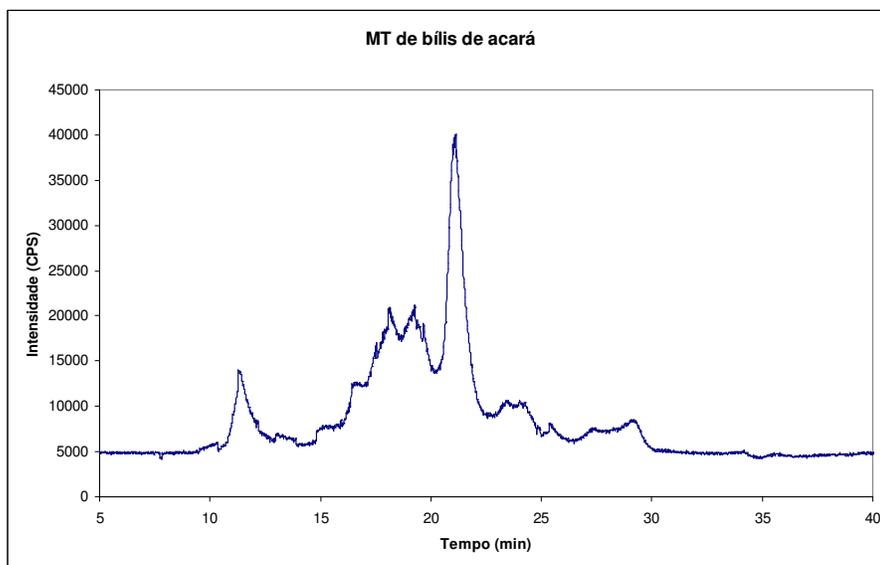


Figura 16. Perfis cromatográfico de MT extraÍdos de bÍlis de acará da Lagoa Rodrigo de Freitas.

Ao analisar os perfis de bÍlis de tainha, foi verificado que o perfil  semelhante em todas as 4 localidades. Todas as amostras apresentam 2 sinais distintos de Zn, ambos contendo Cu, e 5 sinais distintos de Cu. Tambm apresentam sinais de Hg contidos no 1 sinal de Zn/Cu (Fig. 24).

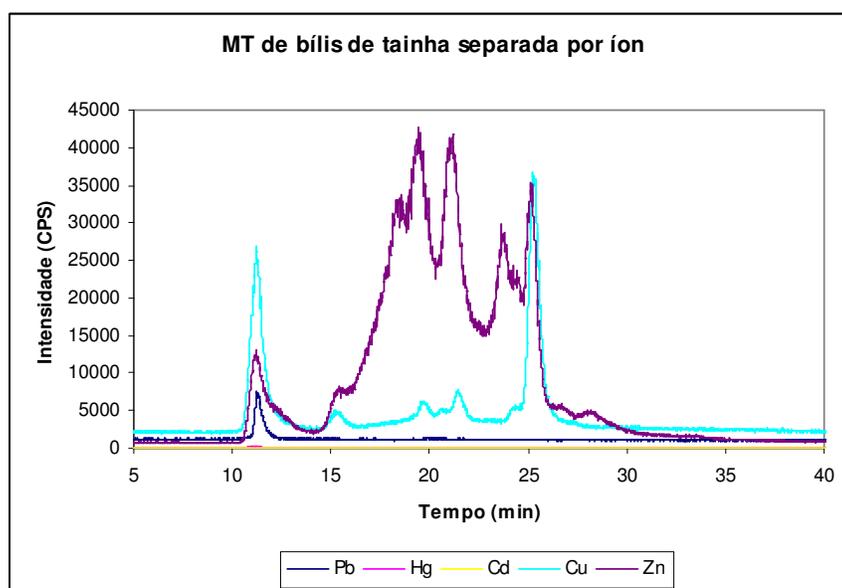


Figura 17. MT de bÍlis de tainha separada por íon.

Foi possível realizar a comparação entre a MT de bÍlis de acarÁ (*G. brasiliensis*) com a MT de citosol de fÍgado desta mesma espÉcie, pois esta foi analisada no estudo de Rodriguez-Cea e colaboradores (Rodriguez-Cea, Arias *et al.*, 2006) (Infelizmente os fÍgados de acarÁs nÁo estavam disponÍveis para anÁlise). NÁo foi possÍvel fazer o mesmo com as outras espÉcies, pois nÁo existem estudos com MTs de fÍgado de tainha ou tilÁpia por SEC-HPLC-ICP-MS. No caso do acarÁ, verifica-se uma semelhança no perfil cromatogrÁfico dos íons Zn e Cu (nÁo houve a presença de sinais de Cd na bÍlis desta espÉcie). O sinal do Zn, porÉm, mostrou-se bastante deslocado para a direita na bÍlis, e nÁo houve a presença do Último sinal do Cu na bÍlis que estava presente no citosol do fÍgado desta mesma espÉcie (fig. 25), mostrando, portanto, que a isoforma de MT presente na bÍlis desta espÉcie pode ser diferente da isoforma presente no citosol de fÍgado. Cabe ressaltar que os animais do estudo de Rodriguez-Cea e colaboradores foram capturados no Rio ParaÍba do Sul, o que pode tambÉm ter sido responsÁvel pelas diferenças observadas entre os perfis de bÍlis e citosol de fÍgado.

Como dito anteriormente, os autores do estudo que analisou MT de fÍgados de acarÁ, ao verificar sinais de Cu nÁo contendo Zn, postularam um comportamento Único de ligaçÁo diferencial a metais por algumas isoformas de MT, o que foi corroborado com MT de bÍlis desta mesma espÉcie.

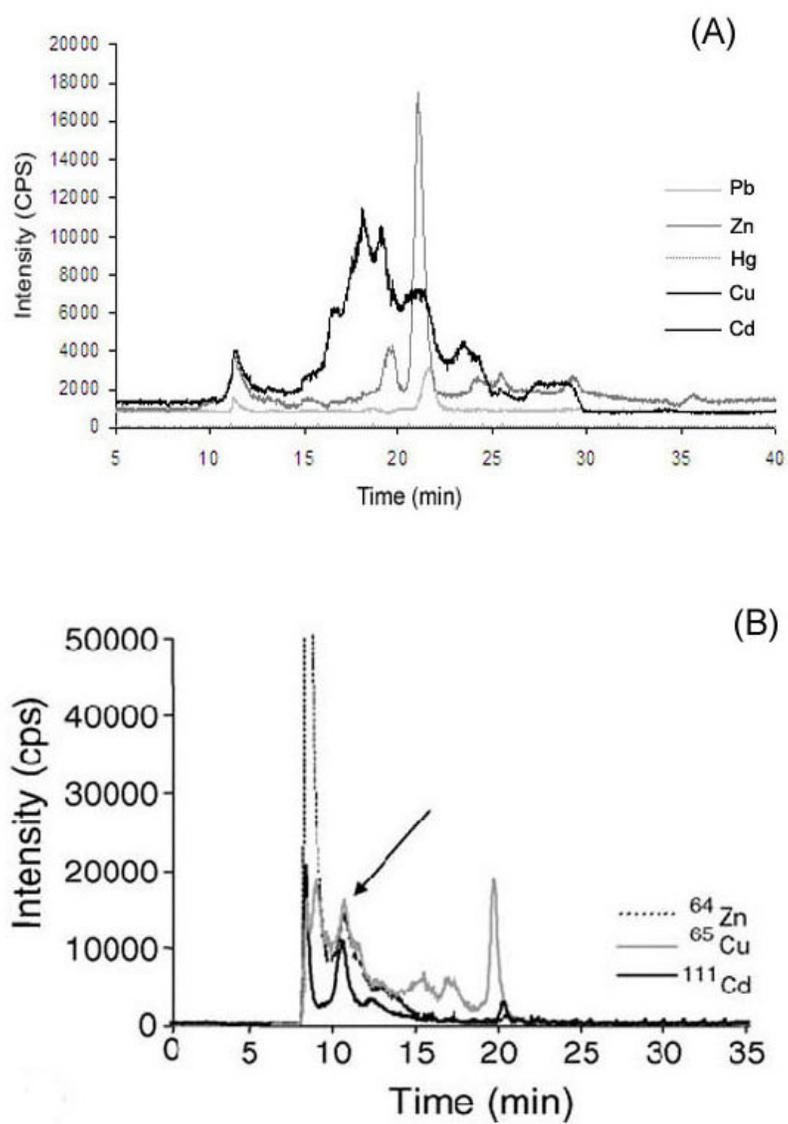


Figura 18. Comparação entre o perfil de MT de bÍlis do presente estudo (A) e o citosol de fÍgado (B), ambos de acarÁ (*G. brasiliensis*) do estudo de Rodriguez-Cea e colaboradores (2006).

6.6. Eletroforese 1D e 2D

Os eletroferogramas 1D realizadas com bílis já passadas pelas etapas de *clean-up* de tainhas e tilápias mostraram a presença de bandas variando de alto a baixo peso molecular, com presença maior de proteínas de baixo peso molecular, por isso a necessidade de utilizar géis de 15 %. O perfil eletroforético de amostras de bílis de tainha e tilápia está mostrado na figura 23, em um gel 15 % corado com prata. Verificam-se diferenças aparentes com relação à presença de algumas bandas presentes na amostra de tilápia que estão ausentes da amostra de tainha e vice-versa (apontadas pelas setas em vermelho na figura 26), e a presença de mais bandas de baixo peso molecular na amostra de tilápia em comparação com a amostra de tainha.

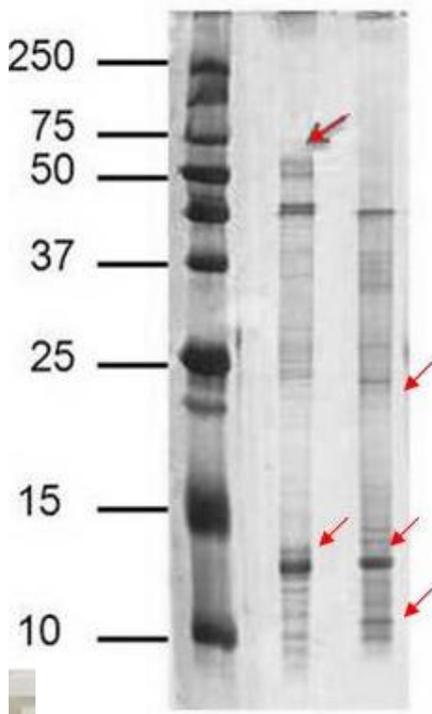


Figura 19. Perfil eletroforético 1D de amostras de bílis de tilápia e tainha, em gel 15 % corado com prata. As setas indicam diferenças entre os perfis de tainhas e tilápias.

Nos eletroferogramas 2D (fig. 27) foi verificado que o *status* alimentar do peixe interfere bastante no número de *spots* protéicos visualizados. Os peixes que haviam se alimentado há mais tempo, de maneira geral apresentaram maior volume de bÍlis na vesÍcula biliar, concentrada e com coloraÍo mais escura devido à maior concentraÍo de pigmentos biliares (biliverdina e billirubina) alÍm de proteÍnas e outros componentes da bÍlis. Observa-se um aumento na quantidade de *spots* protéicos nos géis, em uma faixa mais ampla de pH, com o aumento do perÍodo desde a Última alimentaÍo. A quantidade mÍdia de pontos protéicos nas amostras de bÍlis de peixes com perfil proteÔmico concentrado (que no se alimentaram recentemente) foi de aproximadamente 1000 *spots*, em pH 4-7.

Em tainhas, a escala de cor de bÍlis varia de amarelo (peixe que se alimentou recentemente e apresenta a bÍlis "pouco concentrada) a marrom escuro (peixe que est sem se alimentar h algum tempo e apresenta a bÍlis muito concentrada), e em tilpias varia de verde claro (pouco concentrada) a verde escuro/verde amarronzado (muito concentrada). Portanto, no caso da anlise de bÍlis de peixes, a cor da bÍlis tambÍm é um indicativo importante a ser levado em consideraÍo. A figura 27 ilustra as diferenas entre uma bÍlis pouco concentrada (gel A – cor amarela), uma com concentraÍo razovel (gel B – cor castanha) e uma muito concentrada (gel C – cor marrom escura) de trÊs indivÍduos de *M. liza* obtidos em Itaipu (A), em supermercado (B) e alto mar (praia de Copacabana) (C). Todos os eletroferogramas foram obtidos em géis 15 %, com faixa de anlise de pH 3-10 e coloraÍo por prata.

Este aspecto é interessante em um contexto de programas de monitoramento ambiental, pois os dados proteÔmicos obtidos no presente trabalho podem ser comparados com alguns estudos que analisaram a influÊncia do *status* alimentar de peixes em certos aspectos da composiÍo biliar, como concentraÍes de xenobiÔticos e pigmentos (Richardson, Gubbins *et al.*, 2004). Estes estudos verificaram que peixes que permaneceram 24 h sem alimentaÍo apresentaram concentraÍes de diversos metabÓlitos de HPA e biliverdina (pigmento biliar) significativamente mais altas em comparaÍo com indivÍduos que se alimentaram nesse mesmo perÍodo. No caso do presente trabalho, verificou-se a mudana do perfil protéico e da concentraÍo de pigmentos (coloraÍo mais escura em bÍlis mais concentradas) e proteÍnas. Nas bÍlis menos concentradas o perfil é

significativamente diferente, pois há a predominância de proteínas de baixo peso molecular e na bÍlis mais concentrada as proteínas se apresentam em uma faixa mais ampla, tanto de baixo quanto de alto peso molecular. Portanto, em diferentes *status* alimentares existem diferentes proteínas presentes na bÍlis. Possivelmente, as proteínas expressas em indivíduos sem se alimentar podem ter correlação com xenobiÓticos, por exemplo, com relação à destoxificação dos mesmos, e mais estudos devem ser conduzidos com relação a este aspecto.

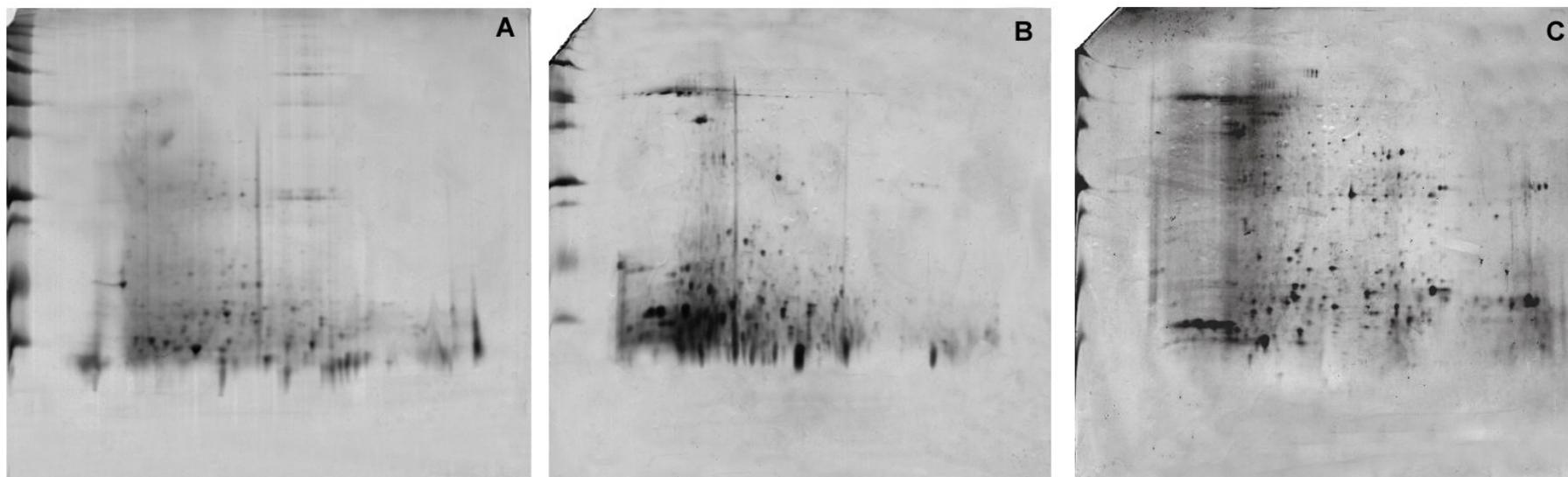


Figura 20. BÍlis de indivíduos de *M. liza* com diferentes *status* alimentares: peixe que se alimentou recentemente, com bÍlis pouco concentrada (A), peixe que estÁ sem se alimentar hÁ algum tempo, com bÍlis razoavelmente concentrada (B) e peixe que estÁ sem se alimentar hÁ bastante tempo, com bÍlis muito concentrada (C). Géis 15 %, pH 3-10, coloraço por nitrato de prata.

Com relação a aspectos técnicos da eletroforese 2D, a reprodutibilidade das análises de géis 2D foi verificada utilizando o software de imagem Image Master Platinum 6.0 (GE Healthcare[®]), contando o número de ocorrências (“matches”) entre os mesmos *spots* das triplicatas de uma mesma amostra, medidas nas mesmas condições. Os matches foram sempre acima de 70 % para os géis em pH 3-10, indicando boa reprodutibilidade da técnica. Em pH 4-7 a reprodutibilidade aumentou para 75 %. O número de proteínas diferencialmente expressas em géis de bÍlis não foi analisado, como era o objetivo inicial do trabalho e como se realiza rotineiramente em outras matrizes, pois com as diferenças significativas descritas acima, com relação ao *status* alimentar dos indivíduos, esta comparação não seria interessante. Portanto, em próximos estudos, o status alimentar dos indivíduos deverá ser controlado, para poder então verificar se existem proteínas diferencialmente expressas em uma mesma situação, e não com *status* de alimentação diferentes.

6.7. Análise por MALDI-ToF

A digestão trÍptica foi eficiente, como comprovado pelo espectro do padrão de BSA (fig. 28), onde foi possível a identificação dos sinais de peptÍdeos como sendo realmente de BSA, com certeza de identificação de 100 %, já que a análise utilizando o programa Mascot retornou apenas este resultado de identificação.

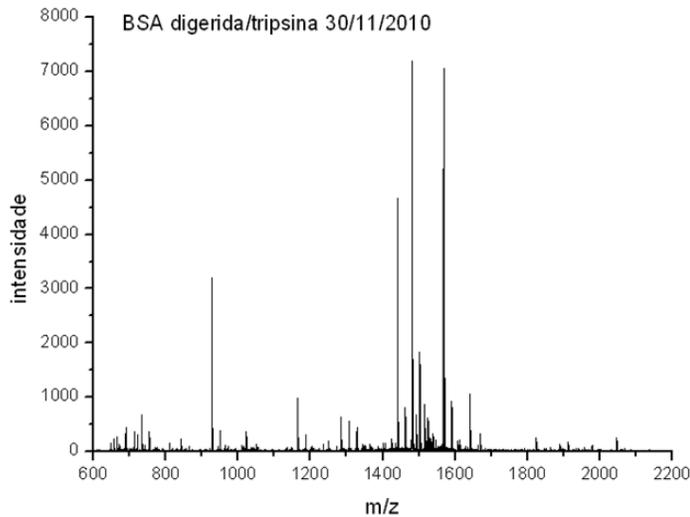


Figura 21. Espectro de padrão de BSA tripsinado para leitura por MALDI-ToF

A análise das amostras tripsinadas levou à identificação através do programa MASCOT da proteína RS27A_ICTPU; a proteína ribossomal S27A Ubiquitina-40S (Figura 29). Infelizmente não foi possível realizar mais análises de identificação de proteínas de bÍlis de peixe no equipamento, pois o mesmo apresentou problemas na sua bomba à vácuo, mas apenas com este resultado se confirma que os procedimentos de limpeza, eletroforese 2D e digestão trÍptica de amostras de bÍlis foram eficientes para análises por MALDI-ToF, inclusive de géis corados com prata e descorados com acetonitrila e água.

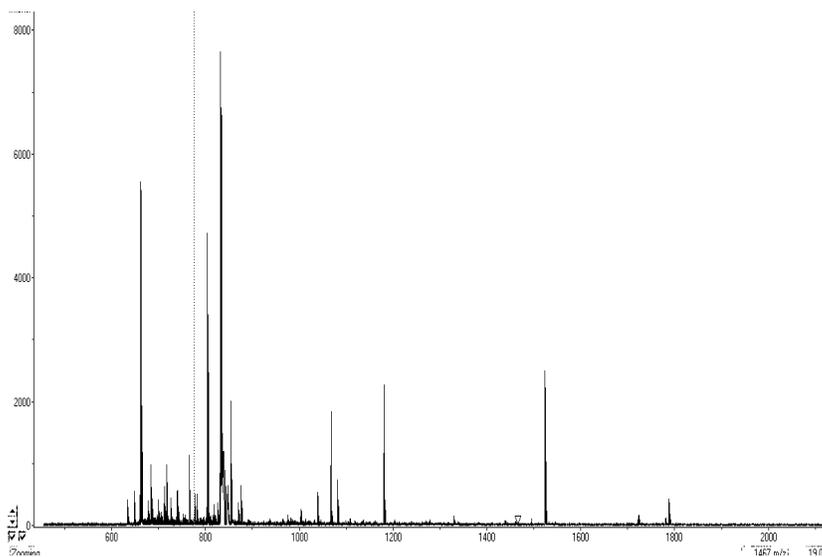


Figura 22. Espectro da proteína RS27A_ICTPU.

As ubiquitinas são polipeptídeos distribuídos universalmente dentre os eucariotos e estão envolvidas no controle do ciclo celular, na replicação do DNA e na resposta ao estresse através de uma rota proteolítica dependente da ubiquitina (Ciechanover, D. *et al.*, 1984; Finley e Varshavsky, 1985). A proteína identificada por MALDI no presente estudo é um componente da subunidade 40S do ribossomo e tem como função molecular se ligar a íons metálicos (zinco), além de ser parte constituinte do ribossomo. Ela também já foi implicada como biomarcador de crescimento celular precoce em casos de carcinoma colorretal em humanos, sendo interessante o estudo de sua expressão em peixes de locais contaminados e controle para ver se o mesmo ocorre aqui (inclusive pelo fato de que diversos peixes coletados ao longo do trabalho das localidades contaminadas apresentaram tumores nas vísceras).

6.8. Zimografias

Os melhores resultados zimográficos foram obtidos com 13 horas de incubação dos géis no tampão de incubação, onde bandas mais nítidas foram observadas (Figura 30). Portanto todos os zimogramas foram incubados por 13 h ao longo deste trabalho.

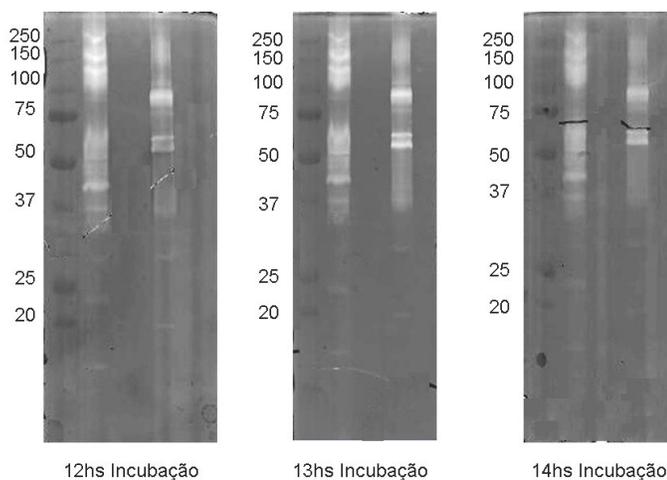


Figura 23. Comparação entre os tempos de incubação dos géis de zimografia.

Para determinar que tipos de proteases são encontradas na bÍlis de peixe, o efeito inibidor de diferentes tipos de inibidores enzimáticos foi investigado. Os ensaios confirmaram a natureza lítica das bandas protéicas e a atividade gelatinolítica, pois inibidores específicos de metaloproteases de matriz (MMPs) excluÍram a presença de atividades devido a serino- ou cisteÍno-proteases (Tabela 4). Algumas bandas de baixo peso-molecular não foram afetadas por estes inibidores, e, portanto, não foram consideradas metaloproteases.

Tabela 4. Condições dos ensaios enzimáticos e resultados

Inibidor enzimático	Concentração no tampão de substrato	Tipo	Efeito
EDTA	20 mM	Quelante de cátions divalentes e inibidor de metaloproteases	Ausência ou supressão significativa de qualquer banda
PMSF	1 mM	Inibidor de serino proteases	Nenhum efeito
1,10 fenantrolina	10 mM	Inibidor de metaloproteases	Ausência ou supressão significativa de qualquer banda
E-64	20 µM	Inibidor de cisteÍno protease	Nenhum efeito

Os perfis zimográficos gelatinolíticos mostram diferenças entre as MMPs de tainhas e tilápias (figura 31). As bandas protéicas principais da bÍlis de tainhas corresponderam aos pesos moleculares aproximados de 200, 136, 43, 36, 34, 29, 23 e 14 kDa, e na bÍlis de tilápia nos pesos moleculares aproximados de 179, 97, 79, 61, 54, 45, 36, 33 e 21 kDa. Foi observada a prevalência de bandas líticas de alto peso molecular na bÍlis de tilápias, em comparação com a bÍlis de tainhas.

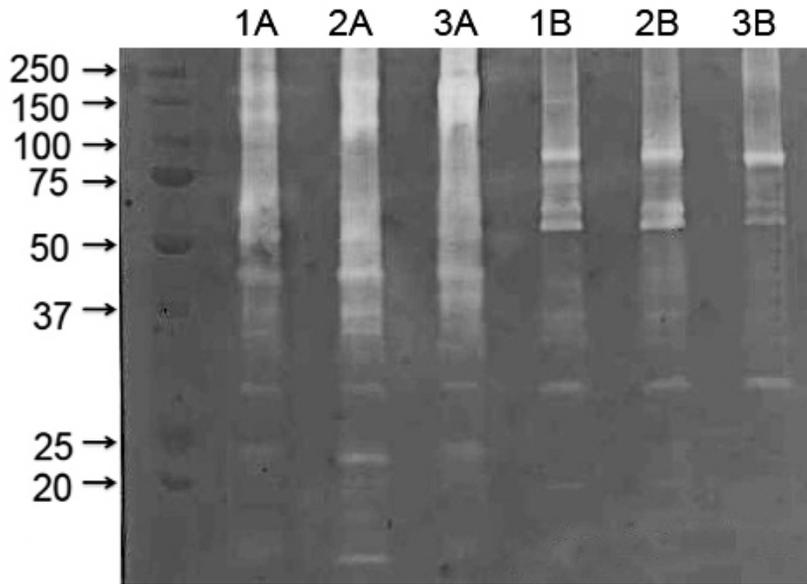


Figura 24. Perfil geral de MMPs em bÍlis de tainha (1A, 2A e 3A) e bÍlis de tilÁpia (1B, 2B e 3B).

6.8.1.

Comparações entre amostras contaminadas e de referéncia

As comparações entre as amostras de tilÁpia do local de referéncia e o local contaminado (neste caso, a Lagoa Rodrigo de Freitas), foi conduzida qualitativamente, verificando a preséncia ou auséncia de certas bandas líticas dos géis entre as duas localidades. Isto foi feito pois não faria sentido quantificar a proteína total das amostras, já que a mesma quantidade de proteína foi aplicada para as amostras, e também porque este é um método de quantificação de proteínas totais, não-seletivo. A densitometria relativa nos casos de zimogramas também não foi conduzida, pois não é precisa, devido ao fato de o quanto a enzima é renaturada poder variar ao longo das etapas do processo de incubação. Portanto, apenas a preséncia ou auséncia das bandas foi analisada (ensaios ELISA para tal quantificação poderiam ser utilizados, porém não estavam disponíveis no presente estudo).

Após os testes de purificação e inibição, testes preliminares zimográficos

foram conduzidos para verificar se as MMPs em bÍlis de peixes possuem potencial como biomarcadores ambientais, comparando bÍlis de tilÁprias de dois lugares, o local de referÊncia (n=6) e a Lagoa Rodrigo de Freitas (n=7), que É contaminada por metais e misturas complexas. A figura 32 mostra os resultados, onde os *lanes* 1 e 2 sÁo do local de referÊncia e os *lanes* 3 e 4 sÁo do local contaminado. Os cÍrculos indicam as proteases presentes apenas na Lagoa Rodrigo de Freitas, e ausentes no local de referÊncia. A legenda MW corresponde a *molecular weight* (peso molecular) das bandas do padrÁo de peso molecular utilizado para estimar o peso molecular das bandas lÍticas das amostras.

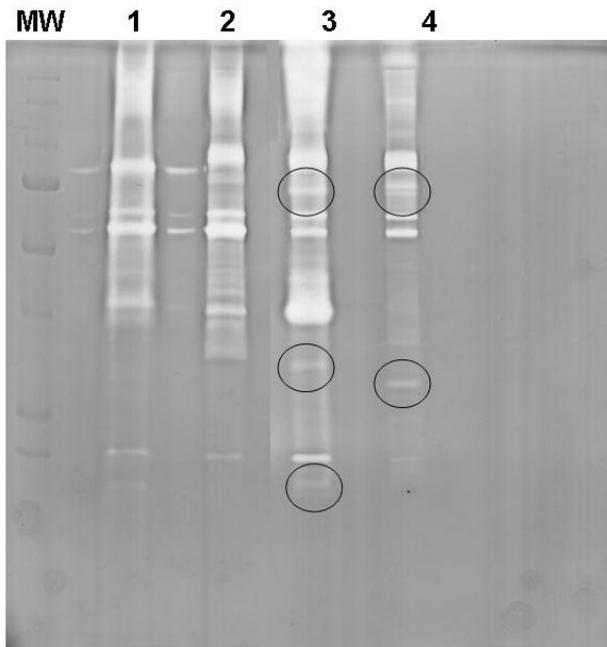


Figura 25. DiferençAs na bÍlis de tilÁpia do local de referÊncia (*lanes* 1 e 2) e o local contaminado (Lagoa Rodrigo de Freitas, *lanes* 3 e 4). Os cÍrculos mostram as bandas lÍticas presentes apenas no local contaminado.

A anÁlise da composiçÁo proteÁsica de amostras biolÁgicas complexas É conduzida com segurançA usando tÉcnicas zimogrÁficas, porque a visualizaçÁo destas enzimas É diretamente dependente de atividade proteolÍtica (Feitosa, Gremski *et al.*, 1998; Jain, Nanchahal *et al.*, 2001; Troeberg e Nagase, 2003). Estas tÉcnicas sÁo tambÊm amplamente utilizadas no estudo de aspectos da funçÁo de MMPs (Kjeldsen, Johnsen *et al.*, 1993; Itoh, Ito *et al.*, 1998). A anÁlise das MMPs em amostras biolÁgicas pode contribuir para a caracterizaçÁo de doençAs

envolvendo a destruição de tecidos e o estudo das respostas a mudanças de desenvolvimento e patológicas (Theret, Musso *et al.*, 1998; Bueno, Daneri *et al.*, 2000), e um tipo de MMP, as metaloproteases de matriz do tipo de membrana (membrane-type matrix metalloproteinases - MT-MMPs) está aparentemente envolvida em interações célula-matriz (Yang, Hayashi *et al.*, 1996; Yamada, Oshima *et al.*, 2010) e também implicada em diversos papéis imunomodulatórios (Schonbeck, Mach *et al.*, 1998). As MMPs são geralmente identificadas de acordo com suas especificidades ao substrato do gel e sua ocorrência, como visto na tabela 5, adaptado de Snoek-van Beurden e Hoff (Snoek-Van Beurden e Von Den Hoff, 2005)).

Tabela 5. Classificação das MMPs adaptado de Snoek-van Beurden e Hoff (2005).

Subgrupo	MMP	Nome	Substrato
1. Colagenases	MMP-1	Colagenase-1	Col I, II, III, VII, VIII, X, gelatina
	MMP-8	Colagenase-2	Col I, II, III, VII, VIII, X, agrecana, gelatina
	MMP-13	Colagenase-3	Col I, II, III, IV, IX, X, XIV, gelatina
2. Gelatinases	MMP-2	Gelatinase A	Gelatina, Col I, II, III, IV, VII, X
	MMP-9	Gelatinase B	Gelatina, Col IV, V
	MMP-3	Stromelisina -1	Col II, IV, IX, X, XI, gelatina
3. Stromelisinases	MMP-10	Stromelisina-2	Col IV, laminina, fibronectina, elastina
	MMP-11	Stromelisina-3	Col IV, fibronectina, laminina, agrecana
	MMP-7	Matrilisina-1	Fibronectina, laminina, Col IV, gelatina
4. Matrilisinases	MMP-26	Matrilisina-2	Fibrinogênio, fibronectina, gelatina

	MMP-14	MT1-MMP	Gelatina, laminina	fibronectina,
	MMP-15	MT2-MMP	Gelatina, laminina	fibronectina,
	MMP-16	MT3-MMP	Gelatina, laminina	fibronectina,
5. MT-MMP	MMP-17	MT4-MMP	Fibrinogênio, fibrina	
	MMP-24	MT5-MMP	Gelatina, laminina	fibronectina,
	MMP-25	MT6-MMP	Gelatina	
	MMP-12	Metaloelastase macrófaga	Elastina, Col IV	fibronectina,
	MMP-19	Enamelisina	Agrecana, fibrilina, gelatina	elastina, Col IV,
6. Outras MMPs	MMP-20	XMMP	Agrecana	
	MMP-21	CMMP	Agrecana	
	MMP-23	Epilisina	Gelatina, fibronectina	caseína,
	MMP-27		Desconhecido	
	MMP-28		Desconhecido	

Enquanto outros métodos, como análises por ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay – Ensaio imunoadsorvente ligado a enzimas), também têm sido utilizados na pesquisa de MMPs, a zimografia de gelatina oferece as vantagens de sensibilidade na faixa de picograma e a avaliação de diversas MMP sem a necessidade de reagentes caros (Kleiner e Stetlerstevenson, 1994; Van Den Steen, Dubois *et al.*, 2002). Além disso, os inibidores de MMPs de tecido (TIMPs - MMP tissue inhibitors) se dissociam das MMPs durante a eletroforese, portanto excluindo a possibilidade de inibição da atividade enzimática por estes inibidores (Kleiner e Stetlerstevenson, 1994).

As MMPs são encontradas em diferentes tecidos de muitos organismos diferentes, e têm sido caracterizadas de acordo com sua maior ou menor expressão

em diversas situações. Porém, estas metaloproteases não são bem estudadas em peixes, e existem apenas alguns estudos a respeito, descritos a seguir.

Recentemente foram descobertas MMPs em oócitos de peixe, sugerindo o envolvimento destas proteínas durante o desenvolvimento folicular, a maturação ovocitária ou processos pós-ovulatórios (Kimura, Shinohara *et al.*, 2001); descobriu-se que a MMP 13 possui papel na embriogênese normal de peixes (Hillegass, Villano *et al.*, 2007), e se descreveu que a MMP 9 possui papel chave na imunidade inata de carpas, expressa em órgãos imunes clássicos de peixes e em leucócitos periféricos e do peritônio, indicando um papel em respostas imunes destes organismos (Chadzinska, Baginski *et al.*, 2008). Evidências também indicam que as MMPs gelatinolíticas estão envolvidas na desintegração do tecido conectivo intramuscular que induz a maciez pós-morte do músculo de peixe durante o armazenamento a frio (Chen, Tsai *et al.*, 2008). Portanto, estas metaloproteases se mostram claramente importantes para peixes, em diversas situações. Porém, as MMPs em bÍlis não foram estudadas a fundo ainda, e os únicos exemplos são de pacientes humanos sofrendo de cÂncer colorctal (Sato, Okada *et al.*, 1997) e de aves (*Meleagris gallopavo* – peru comum) (Rath, Huff *et al.*, 2001). Assim sendo, este é o primeiro estudo a respeito de MMPs em bÍlis de peixe.

Os zimogramas mostraram diversas bandas gelatinolíticas presentes, o que é um pouco surpreendente pois outros estudos com outros animais, como perus, mostraram apenas a presença de 4 ou 5 bandas líticas (Rath, Huff *et al.*, 2001). Outro fato interessante é a presença de bandas líticas de peso molecular muito baixo (< 25 kDa). Isto não é muito comum, e pode indicar proteases específicas a peixes. Nem todas as bandas gelatinolíticas foram identificadas como MMPs, pois os inibidores de classes específicas não mostraram efeito para todas as bandas. Embora positiva, a identificação de quais MMPs estão presentes em bÍlis de peixe não foi obtida no presente estudo, e mais testes com padrões de MMP seriam de interesse para agregar conhecimento com relação a estas metaloproteases em bÍlis de peixe. Neste estudo, as comparações entre a expressão de MMP de machos e fêmeas não foi conduzida, porém isto pode ser importante em um contexto ecológico, pois, como observado anteriormente, estas metaloproteases têm sido reportadas como ligadas ao desenvolvimento folicular de fêmeas de peixes, e maturação de ovócitos, e existe a possibilidade de que elas estejam também

presentes no desenvolvimento testicular e do esperma de machos, possivelmente com expressão diferenciada.

A função da MMP na bÍlis de peixes não é clara. Estudos em humanos sofrendo de c¢ncer coloretal indicam que eles podem ser biomarcadores úteis na identificao de c¢ncer metast¢tico de fÍgado, j¢ que foram encontrados em nÍveis significativamente mais altos em pacientes com este tipo de c¢ncer, em comparao com pacientes saud¢veis, e alguns autores acreditam que as MMP em bÍlis podem estar envolvidas na funo digestiva de p¢ssaros (Rath, Huff *et al.*, 2001). Por¢m, existe pouca informao se as MMPs podem ser secretadas como produtos ex¢crinos como muitas das enzimas envolvidas na fisiologia gastrointestinal (Rath, Huff *et al.*, 2001) ou se possuem alguma outra funo. Em estudos pr¢vios em nosso laborat¢rio (dados n¢o mostrados), n¢s observamos peixes expostos a altos nÍveis de contaminao, apresentando tumores no fÍgado, melanomacr¢fagos, infiltraes leucocit¢rias, parasitas e infeco generalizada do fÍgado inteiro, atrav¢s de an¢lises histol¢gicas. Como as MMP possuem funes conhecidas na quebra de componentes da matriz extracelular e s¢o parte tanto do remodelamento tecidual normal quanto do remodelamento e da reabsoro de tecido patol¢gico, cicatrizao de feridas e invases tumorais,  razo¢vel levantar a hiptese de que um aumento nos nÍveis de MMP em bÍlis de peixe pode ser devido  contaminao ambiental e a processos de destoxificao ocorrendo no fÍgado, j¢ que este rg¢o  o principal rg¢o detoxificador do corpo e a bÍlis  uma excreo direta deste rg¢o. Como a bÍlis j¢ tem sido utilizada em programas de monitoramento ambiental ao redor do mundo e  um biomarcador v¢lido para situaes de contaminao ambiental, mais estudos devem ser conduzidos com relao  expresso de MMPs neste fluido, comparando indivÍduos saud¢veis e n¢o-saud¢veis.