

7 CONCLUSÕES

7.1. Bílis de peixe como biomarcador de contaminação ambiental por metais

- Correlações significativas de concentrações de elementos-traço em bílis de peixes de dois locais contaminados foram obtidas para três elementos (Mn, Cd e Cu) em bílis e fígado;
- A estatística de rede neural indica que as concentrações de Ni, Cr, Cu e Mn foram suficientes para validar o seu uso ao invés de concentrações no fígado;
- Técnicas multi-elementares como o ICP-MS oferecem um modo rápido, eficiente e de relativo baixo custo para analisar diversas amostras de locais com suspeita de contaminação por metais ao mesmo tempo;
- Existe a possibilidade de não ser necessário sacrificar os animais, tornando esta metodologia mais interessante e elegível como monitoramento preliminar e rotineira de elementos traço em bílis, especialmente em casos de contaminação recente, já que a bílis reflete a contaminação pontual e recente melhor que o fígado, que é melhor indicador de contaminação crônica.
- Os resultados demonstram que existe um grande potencial para a bílis ser um bom biomarcador de exposição a elementos traço no ambiente.

7.2.**Análise de concentrados de metalotioneínas extraídas de bÍlis de peixe**

- 3 técnicas independentes (espectrofotometria, SDS-PAGE e SEC-HPLC-ICP-MS) verificaram a expressão de MT pela primeira vez em bÍlis de peixe;
- As análises por SDS-PAGE constataram a presença de uma banda protéica de aproximadamente 14 kDa, corroborando com a literatura que indica que as MT em fÍgados de peixe apresentam este mesmo peso molecular.
- As MT em bÍlis seguem o mesmo comportamento das MT em fÍgados, estando mais expressas em situações de contaminação ambiental, indicando que é possível utilizar a expressão de MT em bÍlis de peixe ao invés de fÍgado em programas de monitoramento ambiental;
- Novamente existe a possibilidade de não sacrificar o animal.
- Os perfis de MT por SEC-HPLC-ICP-MS de MT de bÍlis e fÍgado de locais de referência não se apresentaram muito diferentes, indicando que as mesmas informações podem ser extraídas de ambas as matrizes;
- Os perfis de MT se mostraram semelhantes a outras matrizes biológicas, como fÍgado de peixe e fluido cérebro-espinhal em humanos, confirmando a identificação destas proteínas como MT.
- Existe a possibilidade de comportamento único da MT com relação à ligação a metais em bÍlis de tilápia, e este trabalho corroborou desse comportamento único em bÍlis de acará.

7.3.

Clean-up das amostras de bÍlis de peixe para análise por eletroforese 1D, 2D e zimografias

- Dois dos protocolos (diálise e gel-filtração/concentração por Vivaspín) retornaram resultados equivalentes, porém como a diálise é um processo demorado, a gel-filtração com corte molecular de 5 kDa foi escolhida, com objetivo de interferir o mínimo possível na constituição protéica de bÍlis de peixe;
- O processo satisfatório de *clean-up* foi confirmado por análises das amostras através de géis SDS-PAGE e posterior análise por MALDI-ToF;
- Foram obtidos espectros satisfatórios de padrões de proteína e amostras corridas em géis SDS-PAGE e tripsinizadas;
- Foi realizada a identificação bem-sucedida de uma das proteínas desta matriz por esta técnica, a proteína ribossomal S27A Ubiquitina-40S, implicada como biomarcador de crescimento celular precoce em casos de carcinoma coloretal em humanos.

7.4.

Metaloproteases de matriz (MMP) em bÍlis de peixe

- A bÍlis de duas espécies de peixes contém quantidades substanciais de MMPs com afinidade gelatinolítica, com perfis distintos para cada espécie;
- 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;

- Os ensaios com inibidores proteicos confirmaram a natureza lítica das bandas protéicas e a atividade gelatinolítica, pois inibidores específicos de metaloproteases de matriz excluÍram a presença de atividades devido a serino- ou cisteÍno-proteases;
- Foram verificadas bandas líticas no lugar contaminado que estavam ausentes do local de referênciA, indicando que as MMP possuem potencial como biomarcador de contaminação ambiental;
- As MMPs já têm sido implicadas em remodelagem estrutural e cÂncer, e como existe uma relação direta entre inflamação e cÂncer mais estudos sÂo necessÁrios, já que diversos peixes encontrados aolongo do trabalho apresentaram tumores nas vísceras e inflamação crônica (dados nÂo mostrados).

7.5. Conclusões finais

Este trabalho verificou a existênciA de dois biomarcadores protéicos em bÍlis de peixe, um especÍfico à contaminação por metais (metalotioneÍnas) e um nÂo-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. Com isto, embora tenhamos sacrificados os animais para analisar os fÍgados, foi comprovado que, para certos elementos, nÂo existe esta necessidade, tornando o trabalho mais interessante neste aspecto. Uma proteína implicada em cÂncer coloretal em humanos tambéM foi identificada. Estes resultados indicam que a bÍlis, portanto, tem grande potencial ainda nÂo estudado, e mais estudos podem e devem ser conduzidos, tanto no estudo mais aprofundado dos biomarcadores encontrados no presente estudo como na busca por novos biomarcadores nesta matriz.