

# ANÁLISE PROTEÔMICA DE BÍLIS DE PEIXES

Aluno: Alex Andrade de Lima

## 1. Introdução

Peixes são reconhecidos como animais bioindicadores, ou seja, é possível identificar as interações entre eles e possíveis agentes contaminantes e também mensurar efeitos sub-letais que podem ser causados por tais agentes. Por esse motivo peixes são muito úteis na avaliação da contaminação dos locais em que estão presentes e como bioindicadores são ótimos modelos para análises que envolvem bioquímica e fisiologia. Além disso, sua excreção biliar pode ser utilizada como matriz de estudo por também ser um biomarcador de contaminação ambiental [1]. Estudos que consistiam em colocar várias espécies de peixes vivendo em habitat contaminado especificamente, por exemplo, por hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAH) mostraram, por intermédio da análise da secreção biliar de cada peixe, que havia uma alta concentração de PAH na bÍlis [2][3][4]. Diversos estudos também indicam que muitos metais são excretados do fígado para a bÍlis e então liberados para o exterior do corpo[5][6]. Alguns exemplos são o cobre, que é excretado, primariamente, em peixes teleósteos, pela bÍlis [7][8], enquanto outros metais, como o zinco, podem ser excretados pela bÍlis ou pelo intestino [9].

Portanto, é de interesse estudar esta matriz para verificação da possibilidade de uso da mesma como bioindicadora de contaminação ambiental em certos casos. Com relação a proteínas e metaloproteínas, ainda existem poucos estudos sobre peixes em geral. Alguns estudos indicam a presença de metaloproteínas de matriz (MMPs) em diversos tecidos de peixes. Esta metaloproteínas são um grupo de endopeptidases ligadas a íons Ca(II) ou Zn(II) [10] capazes de degradar vários componentes da matriz extracelular e já foram descobertas em uma variedade de espécies incluindo plantas, diversos invertebrados e muitos vertebrados superiores [11] e apesar de estarem localizadas em muitos tecidos a função que exercem no organismo, em muitos casos, ainda não foi elucidada [12]. As MMPs podem ser classificadas de acordo com seus domínios peptídicos, pela especificidade dos substratos com os quais se ligam e por suas sequências de similaridade.

Não existem estudos sobre a presença de MMPs na bÍlis de peixes. Isto demonstra que é interessante a realização de pesquisas mais profundas sobre a bÍlis desses animais, já que isto poderia trazer descobertas interessantes na área ambiental, metaloproteômica e proteômica. Com isto em mente, foi elaborada uma pesquisa com relação ao perfil protéico, e, mais especificamente, de metaloproteínas na bilis retirada de peixes de duas espécies diferentes, tainhas (nome científico: *Mugil liza*) e tilápias (nome científico: *Tilapia rendalli*), provenientes de locais não contaminados (Itaipu, Niterói e Silva Jardim, respectivamente) e contaminados (Praia de Ipiranga e Lagoa Rodrigo de Freitas, respectivamente) no estado do Rio de Janeiro. As figuras 1 e 2 abaixo mostram um indivíduo de cada espécie.



Figura 1 - *Mugil liza*

Figura 2 - *Tilapia rendalli*

## 2. Objetivos

O objetivo deste projeto é obter o perfil protéico e, mais especificamente, de metaloproteínas na bÍlis de duas espécies de peixes comercialmente importantes do estado do Rio de Janeiro, de locais não contaminados (Itaipu, Niterói e Silva Jardim, respectivamente) e compará-los com o perfil de metaloproteínas e proteínas de indivíduos das mesmas espécies proveniente de locais contaminados (Praia de Ipiranga e Lagoa Rodrigo de Freitas, respectivamente).

## 3. Metodologia

A obtenção da matriz foi realizada abrindo-se o peixe pelo poro urogenital e retirando a vesícula biliar por completo, e, em seguida, por intermédio de uma seringa descartável de 3 mL, removendo a bÍlis. Esta matriz foi armazenada em eppendorfs estéreis a  $-80^{\circ}\text{C}$  até análise. A localização da vesícula biliar está ilustrada na figura 3.

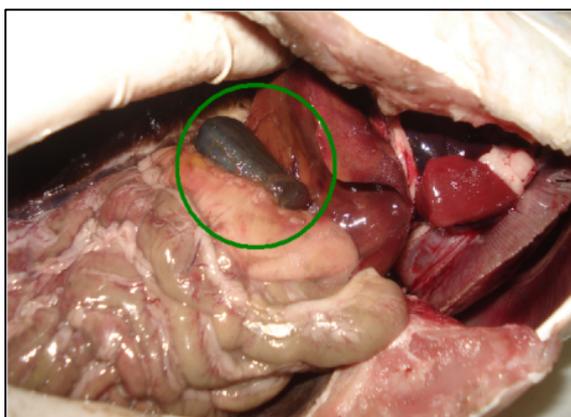


Figura 3 – Localização da vesícula biliar

### 3.1. Limpeza da amostra

A limpeza da matriz para os estudos proteômicos foi realizada testando diversos protocolos. O primeiro consistiu apenas na centrifugação, a  $16000 \times g$  a  $4^{\circ}\text{C}$ , de 1 mL da amostra bruta de bÍlis, utilizando uma centrífuga Biofuge Stratos (Sorvall). O segundo protocolo testados foi a deslipidificação da amostra, centrifugando a amostra a  $16000 \times g$  a  $4^{\circ}\text{C}$  e adicionando logo em seguida 250  $\mu\text{L}$  do agente deslipidificante Cleanascite<sup>TM</sup> HC (Ligo-Chem. Inc.) ao sobrenadante. Em seguida a amostra foi rotacionada por uma hora a  $4^{\circ}\text{C}$ , e, ao final, a amostra foi novamente centrifugada a  $16.000 \times g$  por 10 minutos para remoção das micelas de lipídios. O próximo protocolo do limpeza da amostra foi a remoção de albumina e imunoglobulina G da amostra, já que essas duas proteínas estão presentes em grande quantidade em outros tipos de amostras e causam interferências em diversas análises.

Para isto foram utilizadas colunas cromatográficas de afinidade (GE Healthcare). Um outro protocolo testado foi a precipitação de proteínas por acetonitrila / etanol (ACO / EtOH) de acordo com o método de Osnes e colaboradores [13]. Sucintamente, acetonitrila foi acrescida à amostra de bÍlis em três etapas, onde os volumes de acetonitrila utilizados foram ½, ½ e 3 vezes do volume da amostra na sequência foi feita a agitação e centrifugação da amostra. Para finalizar, foi adicionado etanol 96% (m/v) ao precipitado protéico. Subsequentemente, a amostra foi agitada e centrifugada, evaporada e ressuspendida em 120 µL 1.0 mMol L<sup>-1</sup> de tampão de Borato tetra-hidratado, pH 11.

Os últimos protocolos de limpeza testados focaram na dessalinização da bÍlis, a primeira por diálise utilizando uma membrana de dialise Spectra-Por com corte de massa molecular em 3,5 kDa executada em água deionizada por 24 horas e com várias trocas do tampão neste período, e a segunda por gel-filtração usando colunas Sephadex G-25 (GE Healthcare) com corte de massa molecular em 5 kDa.

Após estas etapas de limpeza, foi possível analisar as amostras por eletroforese uni- e bidimensional e por zimografias.

### 3.2. Dosagem protéica

A dosagem protéica foi feita utilizando e comparando três métodos diferentes: o método do Biureto, do Lowry modificado por Peterson e o kit comercial da GE Healthcare modificado para microplaca.

### 3.3. Eletroforese e Zimografias

A eletroforese em gel de poliacrilamida, em uma dimensão, foi utilizada para a separação de proteínas de acordo com seu peso molecular a partir da aplicação de uma corrente elétrica.

Sabe-se que todas as proteínas possuem carga negativa e positiva. Para todas correrem, no gel, de forma uniforme, sem que haja choques entre moléculas de cargas opostas, foi adicionado um composto de nome Dodecil Sulfato de Sódio, ou SDS, capaz de desnaturá-las e ligar-se a elas atribuindo-lhes carga negativa. O gel é composto basicamente por duas camadas; a primeira é denominada running gel; a segunda é chamada de stacking gel. As duas possuem posições e funções diferentes que serão descritas a seguir. O running gel, ou gel de corrida, é formado por um polímero denominado Poliacrilamida e foi nele que as proteínas se moveram separando-se de acordo com sua massa molecular. A polimerização ocorreu entre duas placas de vidro. O gel atuou como uma rede capaz de prender as proteínas, as mais pesadas e que apresentaram maiores conformações ficaram presas em cima enquanto as menores e menos pesadas encontraram facilidade para passar por entre os poros que estavam acima e acabaram ficando presas embaixo (isso foi visto porque foi utilizada a estrutura vertical da eletroforese). A poliacrilamida surge quando se adiciona Persulfato de Amônio (PSA) à acrilamida e bisacrilamida. Ele quebra homoliticamente uma ligação covalente em cada uma das duas moléculas que formam o polímero, gerando assim, os radicais livres capazes de se unirem e formarem o gel. A figura 4 mostra a fórmula estrutural da poliacrilamida.

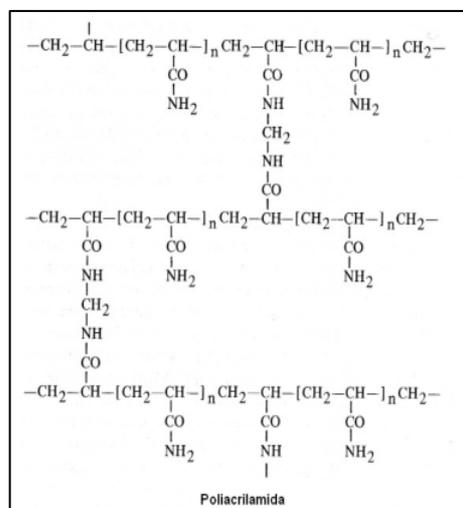


Figura 4 – Fórmula molecular da Poliactilamida

Além do Persulfato de Amônio utiliza-se também o composto TEMED (*N,N,N',N'*-tetrametil-etano-1,2-diamina) para auxiliar na polimerização. É ele quem catalisa a reação, ou seja, ele reduz a energia de ativação, mantém a variação de entalpia envolvida no processo e leva ao mesmo produto final. Por conseguinte, com a menor energia de ativação requerida o tempo para que a reação ocorra se reduz. O running gel é composto por H<sub>2</sub>O, Acrilamida, Bisacrilamida, Tris-HCl pH 8.8, SDS, PSA e TEMED.

O gel de empilhamento (stacking gel) é o último a ser colocado, acima do running gel. Antes que ocorra a polimerização é inserido um pente com espaçamentos apropriados para que em seguida sejam inseridas as amostras. Sua função é de literalmente empilhar todas as proteínas. É também constituído por poliactilamida mas possui poros maiores face ao running gel justamente para permitir que todas as proteínas movam-se por igual independente de sua massa molecular e que empilhem-se em uma faixa estreita do gel. Desejou-se, dessa forma, que as amostras não invadissem os espaços vizinhos gerando uma melhor visualização das bandas que cada uma delas iria produzir. O stacking gel é constituído por acrilamida, bisacrilamida, Tris-HCl pH 6.8, H<sub>2</sub>O, SDS, PSA e TEMED. A figura 5 fornece uma visão geral do esquema do gel. Foram testadas diversas concentrações do running gel, para chegar-se a uma concentração ideal que apresentasse uma boa resolução de separação entre as proteínas das amostras. A figura 5 demonstra um esquema simplificado da montagem dos Géis de poliactilamida em sistema de eletroforese.

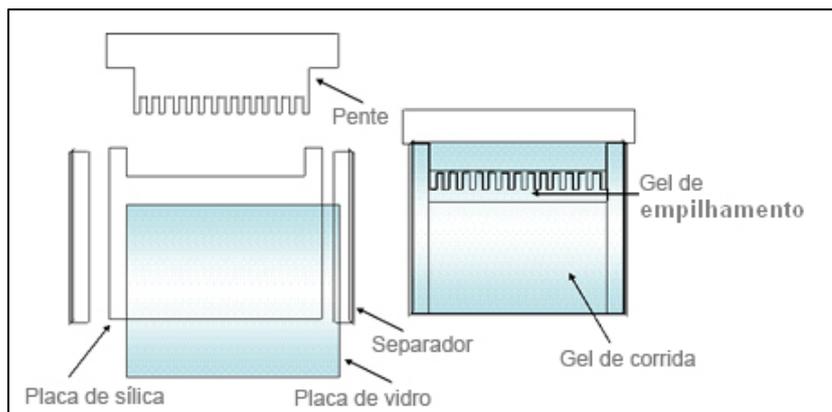


Figura 5 – Esquema da montagem dos géis de poliacrilamida em sistema de eletroforese.

Após preparar os géis, as amostras foram colocadas em seus respectivos poços. A quantidade ideal de proteína para colocação nos géis dói de 20 e 10 mg para *Tilapia rendalli* e *Mugil liza*, respectivamente. As placas de vidro são então inseridas dentro da cuba de eletroforese e por fim a fonte de corrente elétrica é ligada a uma voltagem constante de 110 V.

Depois da primeira separação eletroforética, foi realizada a eletroforese em duas dimensões, que consiste em separar as amostras de acordo com seus pontos isoelétricos (primeira dimensão) e em seguida de acordo com seus pesos moleculares (segunda dimensão). Na primeira dimensão a amostra é colocada em fitas de gradiente denominadas Immobiline DryStrip, que são fitas capazes de absorver todas as proteínas sem alterar suas propriedades e, em seguida, inserida no Ettan IPGphor, um equipamento capaz de separar as proteínas da DryStrip conforme seus pontos isoelétricos. Ao término da primeira dimensão a fita é colocada na parte superior do gel de corrida, substituindo o gel de empilhamento, e essa fita é então vedada com agarose, em seguida a fonte de corrente é ligada em 110 V.

Para visualização das proteínas no gel ao final do processo de eletroforese é necessário elaborar a solução de revelação constituída por Coomassie Brilliant Blue G-250, metanol (30% em volume) e ácido acético (10% em volume). O gel é colocado sob agitação durante 1 hora embebido na solução e ao final veria-se as bandas protéicas com uma coloração azul sobre um fundo transparente.

Porém, verificou-se que este método de coloração não foi o ideal, pois não se verificaram bandas ou pontos protéicos muito aparentes. Portanto, passou-se a utilizar a coloração por prata, mais sensível, como descrito por Heukeshoven e Dernick [14], com pequenas modificações. O protocolo consiste nos seguintes passos: Fixação do gel de poliacrilamida em uma solução de etanol, ácido acético e água, por 1 hora ou até 24 horas. Após esta etapa, sensibiliza-se o gel em uma solução de Etanol, Tiosulfato Sódio 5%, Acetato de Sódio e água por 1 hora ou até 24 horas. Em seguida, lava-se o gel 2 vezes por 1 minuto, e se impregna o gel em uma solução de nitrato de prata 2,5% por 1 hora. A revelação do gel é feita com uma solução de Carbonato de sódio, que dura de 4 a 6 minutos, e então se para a reação das proteínas com o nitrato de prata utilizando uma solução de EDTA por mais 1 hora. Se necessário, pode-se preservar o gel em uma solução de etanol e glicerol.

Em seguida foram realizadas zimografias, uma técnica que consiste, resumidamente, em acrescentar ao gel de corrida um substrato capaz de se ligar especificamente a determinada metaloproteína. Estes géis, após otimização do procedimento, possuíam concentração de 12,5% de poliacrilamida. Para elaborar o gel de corrida e de empilhamento foram-se utilizados os mesmos componentes descritos anteriormente e único substrato utilizado no estudo foi a gelatina proveniente de pele suína, obtida da Sigma, em concentração de 0,1% no running gel. Após a corrida eletroforética os géis eram lavados 4 vezes de 15 minutos cada um com Triton X-100 2,5% para remover o SDS e renaturar as proteínas; e em seguida eram lavados com água deionizada e incubados overnight a 37°C em um tampão contendo Tris - 50 mM a pH 7.4 , CaCl<sub>2</sub> . 2H<sub>2</sub>O - 5 mM, ZnCl<sub>2</sub>-1 mM. Após a incubação o gel era corado em uma solução contendo Coomassie Brilliant Blue G-250, metanol (30% em volume) e ácido acético (10% em volume). As áreas com atividade enzimática apareciam como áreas claras sobre um fundo azul.

### 3.4. Testes com inibidores de proteases

Para determinar especificamente quais tipos de proteases são encontradas nas amostras de bÍlis de peixes, foi elaborado um estudo para averiguar o efeito de diferentes tipos de inibidores de proteases sobre as enzimas. Esses ensaios revelaram a natureza das bandas lÍticas de atividade gelatinolÍtica. Foram utilizados como inibidores o EDTA, PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonila), 1,10-Fenantrolina e E-64 que são inibidores específicos de diferentes tipos de proteases. Ao tÉrmino da zimografia e sua incubação com os diferentes inibidores, os Geis são corados com uma solução de Coomassie Brilliant Blue G-250, metanol (30% em volume) e ácido acÉtico (10% em volume).

#### 4. Resultados e discussão

A dosagem protéica realizada pelos métodos do Biureto e de Lowry modificado por Peterson não puderam ser utilizadas, pois retornaram resultados muito discrepantes entre si. Por este motivo, utilizou-se o Kit comercial da GE Healthcare adaptada para microplaca, que retornou resultados coerentes e apresenta melhor reprodutibilidade e repetibilidade. Não foi possível elaborar a dosagem de proteínas até a matriz ser dessalinizada, portanto as etapas de Clean-Up revelaram que a melhor metodologia para a dessalinização foi a que se utilizava colunas cromatográficas com resina Sephadex G-25 de corte em 5 kDa. As outras metodologias não permitiram uma boa separação protéica por eletroforese.

A quantidade de proteínas equivalente a 20 mg para amostras de *Tilapia rendalli* e 10 mg para amostras de *Mugil Liza* foi observada como sendo a combinação que retornou os melhores resultados quando à visualização das bandas e dos spots protéicos na eletroforese e nas zimografias.

Para melhor visualização das bandas protéicas na eletroforese em uma e duas dimensões a porcentagem ideal de poliacrilamida se mostrou ser 15%, pois quando utilizou-se porcentagens de 10% e 12.5% a maior parte das proteínas se acumulavam na parte inferior do gel. Ao final dos testes, foram verificadas diferenças no perfil protéico entre as espécies.

Com relação às zimografias, verificou-se que a melhor porcentagem de poliacrilamida no gel foi de 12.5%. Foram verificada diversas bandas onde houve a degradação do substrato por enzimas gelatinolÍticas.

Os testes com os inibidores de proteases confirmaram que as bandas protéicas reveladas na zimografia eram realmente correspondentes a metaloproteínas, pois quando os inibidores específicos para metaloproteínas (EDTA e 1,10-fenantrolina) foram utilizados a maior parte das bandas desapareceram e o gel ficou com uma coloração completamente azul. Por outro lado, quando foram utilizados os inibidores de cisteÍno e serino proteases (E-64 e PMSF, respectivamente) não houve supressão de bandas e o gel continuou exibindo o mesmo perfil de digestão enzimática sobre um fundo azul. Ao final, a análise das zimografias revelou diferenças com relação as metaloproteínas existentes nas diferentes espécies e também entre peixes de mesma espécie porém vindos de locais diferentes.

#### 5. Conclusões

Por meio de análises comparativas concluiu-se, até o presente momento, que existem diferenças na presença de proteínas e metaloproteínas na bÍlis das espécies de peixes *Mugil liza* e *Tilapia rendalli* e também entre peixes da mesma espécie mas oriundos de ambientes diferentes. Isso pode servir de base para novos e mais aprofundados estudos relativos a descoberta das metaloproteínas nessa matriz não só qualitativamente mais quantitativamente possibilitando encontrar de forma específica quais metaloproteínas estão presentes na

amostra. Além disso a metodologia utilizada no presente projecto pode servir de pilar para pesquisas voltadas a análise de contaminação ambiental utilizando a bÍlis como matriz.

### Referências

1. F. Galgani, G. Bocquene, P. Truquet, T. Burgeot, J. F. Chiffolleau and D. Claisse, *Oceanologica Acta*, 1992, 15, 355.
- 2 - M. M. Krahn, D. G. Burrows, W. D. Macleod and D. C. Malins, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 1987, 16, 511.
- 3 - F. Ariese, S. J. Kok, M. Verkaik, C. Gooijer, N. H. Velthorst and J. W. Hofstraat, *Aquatic Toxicology*, 1993, 26, 273.
- 4 - M. F. Kirby, Matthiessen, P., Neall, P., Tylor, T., Allchin, C.R., Kelly, C.A., Maxwell, D.L., Thain, J.E., *Marine Pollution Bulletin*, 1999, 38, 676.
5. Bunton, T. E. and Frazier, J. M., Extrahepatic Tissue Copper Concentrations in White Perch with Hepatic Copper Storage, *Journal of Fish Biology*, 1994, 45, 627-640.
6. Dijkstra, M., Havinga, R., Vonk, R. J. and Kuipers, F., Bile secretion of cadmium, silver, zinc and copper in the rat. Involvement of various transport systems., *Life Sciences*, 1996, 59, 1237-1246.
7. Grosell, M. H., Hogstrand, C. and Wood, C. M., Cu uptake and turnover in both Cu-acclimated and non-acclimated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Aquatic Toxicology*, 1997, 38, 257-276.
8. Grosell, M., O'Donnell, M. J. and Wood, C. M., Hepatic versus gallbladder bile composition: in vivo transport physiology of the gallbladder in rainbow trout, *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 2000, 278, R1674-R1684.
9. Handy, R. D., Dietary exposure to toxic metals in fish. In: *Toxicology of Aquatic Pollution*, Eds. Taylor, E. W., Cambridge University Press., Cambridge, 1996, 29-60.
- 10 - W. Bode and K. Maskos, *Biol. Chem.* , 2003, 384, 863.
- 11 - I. Massova, L. P. Kotra, R. Fridman and S. Mobashery, *FASEB J.* , 1998, 12.
- 12 - N. C. Rath, W. E. Huff, G. R. Huff, J. M. Balog and H. Xie, *Comparative*
- 13 - T. Osnes, O. Sandstad, V. Skar, M. Osnes and P. Kierulf, *Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation*, 1993, 53, 757
- 14 - J. Heukeshoven and R. Dernick, *Electrophoresis*, 1985, 6, 103.