

ANÁLISE PROTEÔMICA EM BÍLIS DE PEIXES

Aluno: Alex Andrade de Lima

Orientadores: Reinaldo Calixto de Campos e Rachel Ann Hauser Davis

Introdução

Por diversas razões, peixes são úteis na avaliação de contaminação presente no ambiente, e são excelentes modelos para estudos que envolvem bioquímica e fisiologia comparada, sendo então reconhecidos bioindicadores de mudanças ambientais, inclusive de contaminação por substâncias químicas [1] [2] [3]. A excreção biliar oferece uma maneira de analisar diversos contaminantes em organismos aquáticos, e esta matriz tem sido extensivamente utilizada como biomarcador de contaminação ambiental [4]. Devido a isto, foi elaborado um estudo sobre a concentração de metaloproteínas em bÍlis de peixes das espécies tainha (nome científico: *Mugil liza*) e tilápia (nome científico: *Tilapia rendalli*) provenientes de locais contaminados (Itaipu, Niterói) e não contaminados (Praia de Ipiranga, Magé).

Objetivos

Pesquisar a existência de metaloproteínas na bÍlis de uma espécie de peixe vinda de um lugar não contaminado e compará-la com metaloproteínas da mesma espécie proveniente de local contaminado e com metaloproteínas de outra espécie oriunda de local contaminado e não contaminado.

Metodologia

Fez-se uso de técnicas de análise proteômica, especificamente Eletroforese em uma dimensão e duas dimensões e Zimografia em uma dimensão para tal estudo. Utilizou-se o método comparativo para avaliar se as metaloproteínas presentes na bÍlis de determinada espécie e de determinado local eram as mesmas que estavam presentes na outra espécie.

A primeira etapa foi recolher a matriz do estudo, bÍlis dos peixes das espécies tainha e tilápia, de local controle. Para as tainhas, o local controle foi Itaipu, Niterói e o lugar contaminado foi Praia de Ipiranga, Magé. Para as tilápias, foi Silva Jardim e Lagoa Rodrigo de Freitas, respectivamente. O número de peixes coletado foi de 20 de cada local.

Após a remoção da bÍlis, foi necessário elaborar o Clean-Up da matriz para os estudos proteômicos, incluindo, centrifugação, diálise, dessalinização por colunas cromatográficas com recheio de resina Sephadex G-25 Midi-Trap com corte de 5 kDa e remoção de albumina e imunoglobulina por colunas cromatográficas de afinidade.

A dosagem das proteínas da matriz foi testada pelos métodos de Lowry modificado por Peterson, biureto, Bradford e por Kit da GE Healthcare adaptado para leitor de microplacas.

Após estas etapas iniciais foi realizada a eletroforese em uma dimensão para poder separar todas as proteínas que existiam na amostra (matriz após passar pelo clean-up e pela dosagem de proteínas) de acordo com suas massas moleculares e ter uma visão geral de qual a porcentagem de acrilamida e bisacrilamida (base para se elaborar o gel de poli(acrilamida) da eletroforese) seria necessário para visualizar todas as proteínas, senão a maior parte, presente na amostra.

Depois da primeira separação eletroforética, foi feita a eletroforese em duas dimensões que consistia 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 era colocada na Immobiline DryStrip (uma fita capaz de

absorver todas as proteínas sem alterar suas propriedades) e em seguida era inserida no Ettan IPGphor (um equipamento capaz de separar as proteínas da DryStrip conforme seus pontos isoelétricos). Ao término da primeira dimensão a fita era colocada na parte superior do gel de poliacrilamida para iniciar a segunda dimensão.

Com estes dados relativos da eletroforese bidimensional já se podia concluir quais os pesos moleculares da maioria das proteínas das amostras, além de seus pontos isoelétricos.

A última etapa consistiu em elaborar zimografias com substrato de gelatina para poder localizar especificamente metaloproteínas, pois esta é uma técnica específica para estas proteínas. Com esse substrato é possível localizar todas as metaloproteínas existentes na matriz, porém sem classificação por família de proteínas.

Resultados e discussão

As etapas de clean-up da matriz indicaram que a melhor metodologia foi a dessalinização por colunas cromatográficas com recheio de resina Sephadex G-25 Midi-Trap com corte de 5 kDa, pois as outras metodologias não permitiram uma boa separação proteica por eletroforese.

A dosagem proteica não foi possível até a matriz ser dessalinizada. O melhor método para dosagem foi o Kit comercial da GE Healthcare adaptado para leitor de microplacas., por apresentar melhor reprodutibilidade e repetibilidade.

Observou-se que com uma pequena porcentagem (aproximadamente 10%) na etapa de eletroforese, as proteínas se acumulavam na parte de baixo do gel. Por isso, escolheu-se trabalhar com géis de 15% pois as proteínas de baixo peso molecular apresentaram-se abundantes na primeira.

Com relação à zimografia, verificou-se que a melhor porcentagem de gel foi de 12.5%. Foi verificada a existência de diversas bandas de digestão do substrato, porém não é possível classificar quais as famílias de proteínas existentes na matriz apenas com as zimografias de etapa inicial. Portanto, serão realizados testes futuros com inibidores específicos para analisar qual classe de metaloproteases existem.

Finalmente, através deste estudo concluiu-se, até o presente momento, por meio de comparações, que há diferenças na presença de metaloproteínas entre as espécies tilápia e tainha e entre os peixes provenientes de locais controle e contaminado. Além disso, serviu de base para estudos futuros já que a partir da metodologia utilizada e dos resultados obtidos pode-se aprofundar os métodos e descobrir mais especificamente quais as metaloproteínas da amostra, não só qualitativamente mas também quantitativamente.

Conclusões

O estudo permitiu concluir que há metaloproteínas diferentes entre as espécies tilápia e tainha e entre os peixes provenientes de locais controle e contaminado. Além disso, serviu de base para estudos futuros já que a partir da metodologia utilizada e dos resultados obtidos pode-se aprofundar os métodos e descobrir mais especificamente quais as metaloproteínas da amostra, não só qualitativamente mas também quantitativamente.

Referências

- 1 - D. A. Powers, *Science*, 1989, **246**, 352.
- 2 - FAO/SIDA, in FAO/SIDA, 1983, pp. p. 35.
- 3 - G. L. Espino, in *Organismo indicadores de la calidad del agua y de la contaminación (bioindicadores)*. , Plaza y Valdes Editores, Mexico, 2000, pp. 17.
- 4 - F. Galgani, G. Bocquene, P. Truquet, T. Burgeot, J. F. Chiffolleau and D. Claisse, *Oceanologica Acta*, 1992, **15**, 355.