

BÍLIS DE PEIXE COMO BIOINDICADOR DE CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL ATRAVÉS DE ANÁLISES PROTEÔMICAS

Aluno: Alex Andrade de Lima

Orientadores: Reinaldo Calixto de Campos e Rachel Ann Hauser Davis

Introdução

As técnicas proteômicas podem identificar proteínas alteradas após exposição ambiental a poluentes que podem vir a ser utilizadas como biomarcadores novos. Estas proteínas são biomarcadores mais abrangentes, pois não é necessário nenhum conhecimento prévio a respeito de sua relação com o mecanismo tóxico dos poluentes, e, ao serem validadas, elas podem até ser de importância em estabelecer tais mecanismos¹. Por diversas razões, peixes são úteis na avaliação de contaminação presente no ambiente e sua excreção biliar oferece uma maneira de analisar diversos contaminantes em organismos aquáticos^{2,3}. As bílis de tainha (*Mugil liza*) e tilápia (*Tilapia rendalli*) de locais contaminados (Itaipu, Niterói) e não contaminados (Praia de Ipiranga, Magé) foram analisadas para identificar possíveis biomarcadores de contaminação ambiental.

Objetivos

Caracterizar através de estudos proteômicos a matriz biliar de peixe com intuito de identificar possíveis biomarcadores de contaminação ambiental.

Metodologia

A dosagem das proteínas da matriz foi realizada por Kit da GE Healthcare adaptado para leitor de microplaca.

Para a eletroforese bidimensional, amostras individuais de bílis de *T. rendalli* e *M. liza* foram, após clean-up, solubilizadas em tampão de reidratação contendo uréia 8M, CHAPS 2% (p/v), DTT 1%, azul de bromofenol 0,002%, e tampão IPG 1,0% (na faixa de pH usada) e azul de bromofenol 0,002% (p/v). As amostras foram levadas para reidratação passiva, em bandeja específica, em fitas de focalização isoeletrica Immobiline Dry Strips (GE Healthcare®) por 10-20 hs.. Para as primeiras visualizações das amostras foram usadas fitas de faixa de pH 3-10. A focalização isoeletrica foi realizada em equipamento Ettan IPGPhor 3 (GE Healthcare®). Após a focalização isoeletrica, as fitas eram incubadas sob agitação branda em tampão de equilíbrio (Uréia 6M, glicerol 30% (v/v), SDS 2% (p/v) e Tris-HCl 0,05 M, pH 8,8) por 2 x 15 min, a primeira com DTT (1% p/v) por 20 minutos para redução das proteínas, e a segunda com iodoacetamida (3% p/v) para alquilação. Após este procedimento, as fitas eram transferidas para um gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 15%, seladas com agarose 0,5% (p/v) e submetidas à separação na segunda dimensão no sistema vertical Ruby SE600 da GE Healthcare®. O programa de corrida consistiu em uma primeira etapa de 10mA/gel por 15 minutos, para migração lenta e, portanto, mais eficiente, das proteínas da fita para o gel, e então uma segunda etapa de 40mA/gel por aproximadamente 2 hs ou até o marcador azul chegar a 1 mm do final do gel. A coloração do gel foi feita pelo método de nitrato de prata.

Continuou-se com testes de zimografia com substrato de gelatina, e iniciou-se testes com géis com substrato de caseína. Géis de poliacrilamida de 12,5% contendo 0,5 % de caseína como substrato foram preparados de acordo com o protocolo de Troeberg e Nagase (Troeberg e Nagase, 2003). As amostras foram separadas em condições não-redutoras em um tampão de solubilização de amostra composto de Tris-HCl, pH 6,8 0,5 M, SDS 10% and Bromophenol Blue 0,1%. Após a corrida eletroforética os géis foram lavados 4 vezes por 15 minutos cada vez em Triton X-100 2,5%, para remover o SDS e renaturar as proteínas. Foram

então rapidamente rinsados e água ultra-pura e incubados overnight a 37° C em um tampão contendo Tris pH 7,4 50 mM, CaCl₂.2H₂O 5 mM e ZnCl₂ 1 µM. Após a incubação os géis foram corados com Coomassie Blue G-250 e descorados em solução 30% methanol, 10% ácido acético. As áreas de atividade enzimática foram visualizadas como áreas claras sobre um fundo escuro. Diferentes tempos de incubação foram testados em triplicata para cada espécie. Utilizou-se o método comparativo para avaliar se as proteases presentes na bÍlis de determinada espécie e de determinado local eram as mesmas presentes na outra espécie. Testes com diferentes inibidores de classes específicas de proteases foram realizados, incubando os géis em Transepoxisuccinil-L-leucilamido-L-guanidinobutano (E-64) (20 uM), 1,10 fenantrolina (10 uM), Ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (20 uM) e Fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) (1 uM).

Resultados e discussão

A eletroforese bidimensional foi adequada para separação das proteínas presentes em amostras de bÍlis de *M. liza*. O perfil protéico mostra grande quantidade de proteínas (aproximadamente 500 proteínas por amostra), espalhadas por pH 3-10, porém com maior abundância de proteínas em pH 4-7, e em peso molecular entre 50 e 100 kDa, aproximadamente. Análises por software de imagem sugerem que peixes de local contaminado apresentam diferenças com relação a diversas proteínas.

Com relação à zimografia, foi verificada a existência de diversas bandas de digestão do substrato de caseína, e conseguiu-se determinar, através de testes com inibidores específicos, que família de proteases existem nas bÍlis de tainhas e tilápias. Os ensaios confirmaram a natureza lítica das bandas protéicas e a atividade gelatinolítica, pois inibidores específicos de MMPs excluíram a presença de atividades devido a serino- ou cisteíno-proteases. Algumas bandas de baixo peso-molecular não foram afetadas por estes inibidores, e, portanto, não foram consideradas metaloproteases. Na zimografia por caseína os resultados foram semelhantes. 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 tainhas, em comparação com a bÍlis de tilápias.

Conclusões

Resultados preliminares sugerem que as proteínas presentes na bÍlis de peixes têm grande potencial para se tornarem novos bioindicadores de contaminação ambiental, pois as análises conduzidas demonstraram diferenças entre proteínas da bÍlis de peixes de locais contaminado e controle, porém mais estudos devem ser conduzidos.

Referências

- 1 López-Barea, J. e J. L. Gómez-Ariza. Environmental proteomics and metallomics. *Proteomics* v.6, p.S51-S62. 2006.
2. G. L. Espino, in *Organismo indicadores de la calidad del agua y de la contaminación (bioindicadores)*. , Plaza y Valdes Editores, Mexico, 2000, pp. 17.
- 3 F. Galgani, G. Bocquene, P. Truquet, T. Burgeot, J. F. Chiffolleau and D. Claisse, *Oceanologica Acta*, 1992, **15**, 355.