

ANÁLISES PROTEÔMICAS DE BÍLIS DE PEIXES

Aluno: Alex Andrade de Lima

Orientadores: Reinaldo Calixto de Campos e Rachel Ann Hauser Davis

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]. 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 mecanismos [2]. 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 [3,4]. 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) [5] 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 [6] e apesar de estarem localizadas em muitos tecidos a função que exercem no organismo, em muitos casos, ainda não foi elucidada [7].

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). Assim, iremos caracterizar através de estudos proteômicos a matriz bÍlis de peixe com intuito de identificar possíveis biomarcadores de contaminação ambiental.

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° C até análise. A localização da vesícula biliar está ilustrada na figura 1.

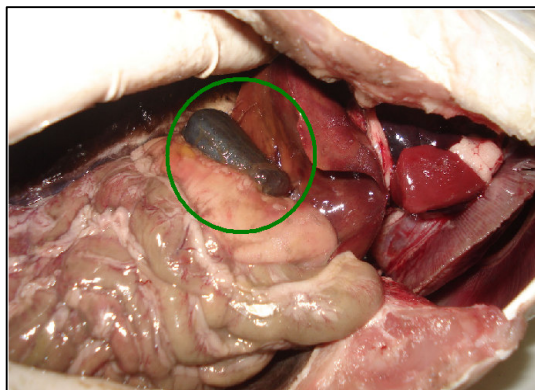


Figura 1 – Localização da vesícula biliar

3.1. Limpeza da amostra

Após os testes iniciais realizados no início do projeto, com relação à purificação e limpeza das amostras biliares, verificou-se que o melhor protocolo de limpeza foi sonicação por 5 minutos, seguido de centrifugação a 16.000 x g por 15 min. Após transferência do sobrenadante para outros tubos, foi realizada a deslipidificação das amostras, seguida de dessalinização por gel-filtração usando colunas Sephadex G-25 (GE Healthcare) com corte de massa molecular em 5 kDa. Os resultados foram adequados para análises por eletroforese uni- e bi-dimensional, e portanto, todas as amostras foram tratadas desta forma.

3.2. Dosagem protéica

Após os testes iniciais realizados no início do projeto, comparando quatro métodos diferentes de dosagem protéica (o método do Biureto, do Lowry modificado por Peterson e o kit comercial da GE Healthcare modificado para micropalaca), verificou-se que o método mais adequado é a dosagem através do Kit da GE Healthcare ® adaptado para leitor de micropalaca, com leitura em comprimento de onda de 480 nm.

3.3. Eletroforese e Zimografias

A eletroforese em gel de poliacrilamida, em uma dimensão, foi utilizada inicialmente para a separação de proteínas apenas de acordo com seu peso molecular.

Os princípios básicos da eletroforese são: todas as proteínas possuem carga negativa e positiva, e para todas correrem em um gel, de forma uniforme, sem que haja choques entre moléculas de cargas opostas, adiciona-se Dodecil Sulfato de Sódio (SDS), que desnatura-as e se liga a elas atribuindo-lhes carga negativa. O gel pode ser composto ou por um gel de empilhamento em conjunto com um gel de corrida, ou apenas por um gel de corrida, dependendo se a corrida eletroforética for uni- ou bi-dimensional, respectivamente. A primeira separa as proteínas apenas por peso molecular, e a segunda por pH e peso molecular. O gel é formado por um polímero (poliacrilamida) e atua como uma rede capaz de prender as proteínas. As mais pesadas ficam presas em cima enquanto as menores e menos pesadas encontraram facilidade para passar por entre os poros e ficando presas embaixo.

Os passos iniciais do projeto tiveram testes preliminares com géis apenas unidimensionais, para separar as proteínas de acordo com o seu peso molecular e obter um perfil protéico vertical. Na segunda etapa a eletroforese bidimensional foi a mais utilizada.

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 isoeétrica 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 isoeétrica foi realizada em equipamento Ettan IPGPhor 3 (GE Healthcare®). Após a focalização isoeétrica, 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.

Como os primeiros resultados demonstraram que o método de coloração por Coomassie Brilliant Blue G-250 não é o ideal para as amostras de bÍlis, por serem amostras muito diluídas, passou-se a utilizar a coloração por prata, mais sensível, como descrito por Heukeshoven e Dernick [8], com pequenas modificações.

O protocolo consiste na 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. Em seguida preserva-se 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 que certas proteases são capazes de digerir estando em condições ótimas de temperatura, quantidade e pH. 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 areas claras sobre um fundo escuro. Diferentes tempos de incubação foram testados em triplicata para cada espécie.

Após as corridas eletroforéticas os géis foram scaneados em um scanner específico, o ImageScanner II (GE Healthcare, Uppsalla, Sweden), com o densitômetro operando em resolução de 300 dpi. O software de análise de imagem Image-Master 2D Platinum 6.0

Software (Genebio, Geneva, Switzerland) foi utilizado para as análises dos géis sua após coloração.

3.4. Testes com inibidores de proteases nas zimografias

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). Ao término da zimografia e sua incubação com os diferentes inibidores, os géis são corados como descrito acima.

4. Resultados e discussão

A eletroforese bidimensional foi adequada para separação das proteínas presentes em amostras de bÍlis de *M. liza*. As amostras de *T. rendalli* degradaram por serem expostas a repetidos ciclos de congelamento e descongelamento, portanto ainda não puderam ser analisadas. 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 (fig. 2). Análises por software de imagem sugerem que peixes de local contaminado apresentam diferenças com relação a diversas proteínas.

Os testes com os inibidores de proteases na zimografia de gelatina confirmaram que as bandas protéicas 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.

Com relação à zimografia de gelatina, 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 (fig. 3). Na zimografia por caseína os resultados foram semelhantes, porém foi verificada presença também de serino-proteases. 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 (fig. 4). Foi observada a prevalência de bandas líticas de alto peso molecular na bÍlis de tainhas, em comparação com a bÍlis de tilápias.

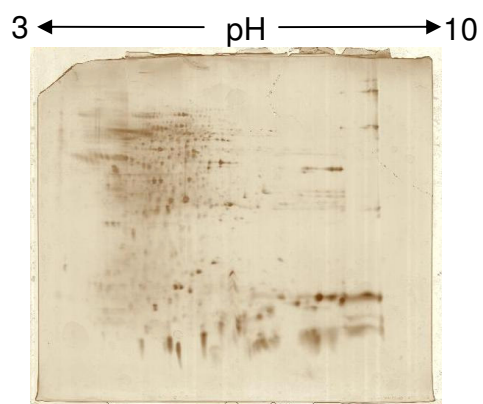


Figura 2. Perfil protéico de amostra de bÍlis de *M. liza*.

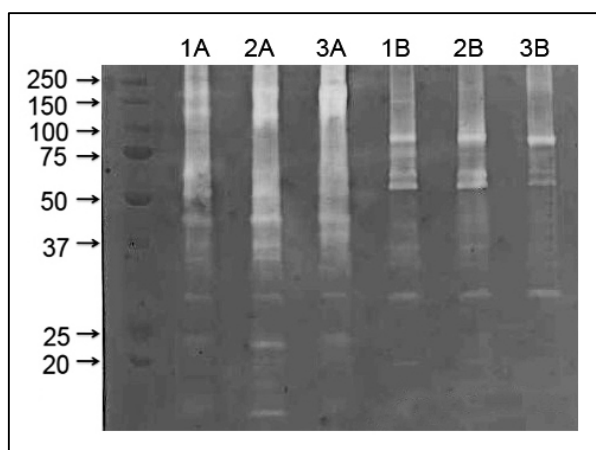


Figura 3. Perfil das metaloproteÍnas. Tainhas: 1A, 2A, 3A/; TilÁpÍas: 1B, 2B, 3B.

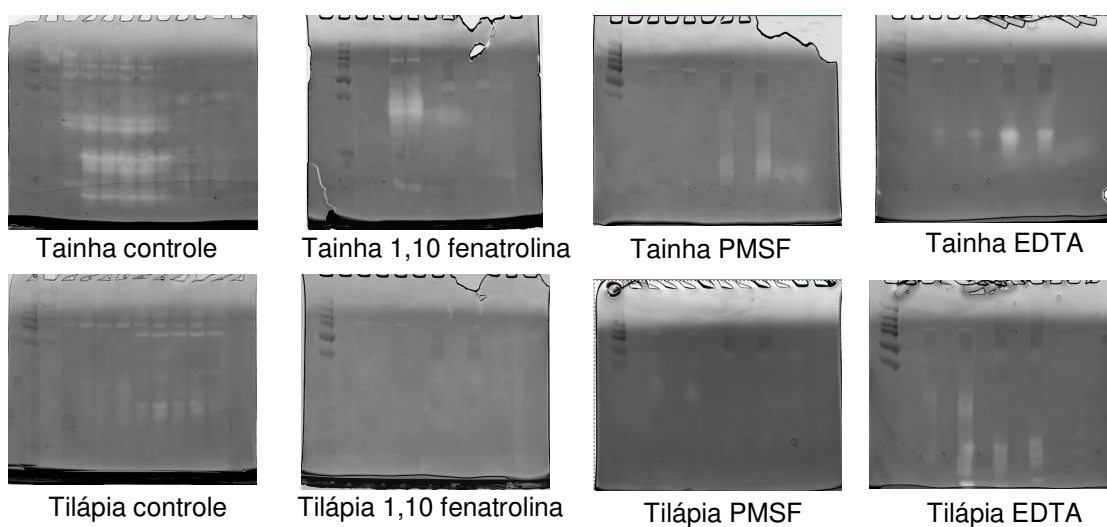


Figura 4. Resultados dos testes de inibição

5. Conclusões

O sucesso das separações eletroforéticas das proteínas presentes em bÍlis de peixe permitiu uma análise mais detalhada desta matriz, com relação à quantidade de proteínas e seu perfil eletroforético. As zimografias conduzidas também tiveram sucesso, indicando que existem proteases com preferência por substratos diferentes, pertencendo à família das MMP e de outras metaloproteases. 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. Análises de expressão comparativa serão o próximo passo para identificar possíveis biomarcadores de contaminação ambiental.

Referências

1. F. Galgani, G. Bocquene, P. Truquet, T. Burgeot, J. F. Chiffolleau and D. Claisse, *Oceanologica Acta*, 1992, 15, 355.
- 2 López-Barea, J. e J. L. Gómez-Ariza. Environmental proteomics and metallomics. *Proteomics* v.6, p.S51-S62. 2006.
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.
- 5 W. Bode and K. Maskos, *Biol. Chem.* , 2003, 384, 863.
- 6 I. Massova, L. P. Kotra, R. Fridman and S. Mobashery, *FASEB J.* , 1998, 12.
- 7 N. C. Rath, W. E. Huff, G. R. Huff, J. M. Balog and H. Xie, *Comparative*
- 8 J. Heukeshoven and R. Dernick, *Electrophoresis*, 1985, 6, 103.