

UMA ABORDAGEM METALÔMICA NA OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE METALOTIONEÍNAS EM BÍLIS DE TILÁPIA: BIOMARCADORES DE EXPOSIÇÃO A METAIS

Aluno: Marcia Carolina Martinho Resende

Orientadora: Tatiana Dillenburg Saint’Pierre

Co-orientadora: Carolina Lyrio Tenório Daussat e Rachel Ann Hauser-Davis

1. Introdução

Metalotioneínas (MTs) são uma classe de proteínas citosólicas de baixo peso molecular e sua estrutura é composta de uma única cadeia de aminoácidos, dos quais 20 são cisteínas, que representam em torno de 30% do total. A abundância dos resíduos de cisteína presentes na estrutura da MT confere à proteína uma alta afinidade por íons metálicos livres, o que faz das MTs proteínas de grande interesse sob o ponto de vista bioquímico.¹ Sua função biológica está relacionada à regulação de metais essenciais e à detoxificação de metais tóxicos. A gama de metais capazes de se ligarem à MT é ampla; a maior parte dos íons metálicos das famílias I-B e II-B da tabela periódica são conhecidos por se ligarem aos grupos cisteína, principalmente Zn, Cu, Cd e Hg, dentre outros.^{2,3}

A associação de metais com diferentes ligantes celulares pode influenciar sua biodisponibilidade dentro da célula. Por exemplo, metais sequestrados por proteínas citosólicas, como MTs, ou estocados nos lisossomos são considerados detoxificados e não mais biodisponíveis a alvos celulares.^{4,5} O papel das MTs está, portanto, relacionado com a função da proteína de redução da toxicidade de metais. Os efeitos tóxicos do Cd e Hg, por exemplo, ocorrem somente quando a capacidade de ligação das MTs é excedida, e então estes metais aparecem associados a proteínas de alto peso molecular no citossol. Então, para desintoxicação do organismo, é necessário que a síntese de MT seja induzida, e esta indução é provocada pelo simples aumento nos níveis de metais no organismo.⁶

A grande influência dos metais em promover a indução de MTs pode variar de acordo com a espécie de organismo, tecido e condições experimentais. A capacidade de indução das MTs é maior nos tecidos que estão envolvidos na captação, acúmulo e excreção, como fígado, rins, brânquias e intestino.^{7,8} Dessa forma, a MT é encontrada em maior quantidade nesses órgãos, o que justifica a escolha dessas matrizes para análises metalômicas. A bÍlis, por ser um fluido produzido pelo fígado, também contém essa proteína, porém em menores concentrações. A bÍlis foi escolhida como matriz principal deste trabalho por ser naturalmente líquida e, portanto, mais simples de se trabalhar em relação ao fígado. Além disso, não há necessidade de sacrificar o animal, já que existe a possibilidade de canulação hepática para sua extração.⁹

As MTs têm sido amplamente utilizadas como biomarcadores de exposição a metais traços, devido a sua potencial função como agente detoxificante. Esse seu papel tem sido estudado e empregado em diferentes espécies de animais aquáticos para a avaliação da contaminação de ecossistemas aquáticos por metais.^{10,11} As características fisiológicas e ecológicas da espécie de tilápia *Oreochromis niloticus* são favoráveis para sua utilização como espécie bioindicadora de exposição a metais. Além disso, o banco de dados de proteínas da tilápia já está quase todo mapeado, o que também justifica a sua escolha como objeto de estudo.¹²

2. Objetivos

Este trabalho teve como objetivo principal a obtenção de um protocolo otimizado de extração de MTs em bÍlis de tilápias. Adicionalmente, os procedimentos de extração foram avaliados através de análises por SEC-HPLC-ICP-MS, a fim de identificar os perfis qualitativos das metalotioneínas, bem como os metais ligados a elas. Também foi utilizada a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida 1-D para análise qualitativa das proteínas presentes nos extratos.

3. Metodologia

As tilápias, já abatidas, obtidas para este trabalho foram adquiridas de um fornecedor. As amostras de bÍlis (aproximadamente 1 mL), foram coletadas por punção direta da vesícula biliar da tilápia e imediatamente armazenadas a -80 °C em frascos *Eppendorf* estéreis até as análises. Para fins de comparação, o procedimento desenvolvido para as amostras de bÍlis foi aplicado também para amostras de fÍgado do mesmo indivíduo. As amostras de fÍgado foram retiradas e armazenadas em tubos *Falcon* a -80 °C e, em seguida, liofilizadas.

3.1. Extração das MTs

Os procedimentos de extração utilizados foram baseados no protocolo de extração de Erk *et al.*¹³ As amostras foram homogeneizadas, na proporção de 1:3 com tampão contendo Tris-HCl 20 mM pH 8,6, PMFS (fenil-metil-sulfonil-fluoreto) 0,5 mM e um reagente redutor (β -mercaptoetanol 0,01%, Ditiotretol (DTT) 0,01% ou Tris-2-carboxietil-fosfina (TCEP) 1%). Em seguida, as amostras foram submetidas à centrifugação (20000 *xg*, a 4 °C), banho-maria por 10 min e nova centrifugação, de acordo com as tabelas abaixo. Foram testados diferentes procedimentos de extração (tabelas 1, 2 e 3) com os três reagentes, β -mercaptoetanol, DTT e TCEP, para que se pudesse avaliar os seguintes parâmetros: tempo de centrifugação, temperatura do banho-maria e reagente redutor.

Para a maioria das aplicações em proteômica, a faixa de concentração de TCEP 5-50 mM oferece excesso molar suficiente para reduzir de forma eficaz ligações dissulfeto de peptÍdeo ou proteína. Por essa razão, a concentração de TCEP utilizada para os procedimentos de extração (1%) foi diferente daquela recomendada para os demais reagentes (0,01%).¹⁴

Tabela 1. Procedimento de extração 1.

Extração	1ª Centrifugação (min)	Banho-maria (°C)	2ª Centrifugação (min)
A	45	60	15
B	60	70	30
C	75	80	45

Tabela 2. Procedimento de extração 2 (variando a temperatura e fixando os tempos).

Extração	1ª Centrifugação (min)	Banho-maria (°C)	2ª Centrifugação (min)
B'	60	50	30
B'	60	60	30
B'	60	70	30
B'	60	80	30
B'	60	90	30

Tabela 3. Procedimento de extração 3 (variando os tempos e fixando a temperatura).

Extração	1ª Centrifugação (min)	Banho-maria (°C)	2ª Centrifugação (min)
A''	45	70	15
B''	60	70	30
C''	75	70	45

3.2 Quantificação das MTs

As MTs foram quantificadas por espectrofotometria em microplaca, após reação de Ellman, utilizando a glutatona reduzida (GSH) como padrão para a curva analítica. De acordo com essa reação, adicionou-se uma mistura de HCl 1,0 mol L⁻¹ e EDTA 4,0 mmol L⁻¹ às amostras e aos pontos da curva. Em seguida, uma mistura de NaCl 2,0 mol L⁻¹ e DTNB 0,43 mol L⁻¹ em 0,2 mol L⁻¹ Na₂PO₄, pH 8,0 foi também adicionada às mesmas soluções. As amostras e os pontos da curva foram deixados por 30 min no escuro e depois foram submetidos à centrifugação (3000 *xg*, a 4 °C por 5 min). A leitura foi feita no equipamento SpectraMax 190, Hamilton, a um comprimento de onda de 412 nm. A concentração de MT foi estimada assumindo a razão molar 1:20 MT/GSH, como descrito por Kagi¹⁵ para peixes.

3.3 Análise em SEC-HPLC-ICP-MS

Os perfis qualitativos das metalotioneínas, bem como os metais ligados a elas, foram analisados pelas técnicas de cromatografia de exclusão por tamanho (SEC) e espectrometria de massas por plasma indutivamente acoplado (ICP-MS).

A cromatografia de exclusão por tamanho (SEC) é uma técnica cromatográfica que separa as moléculas dissolvidas com base no seu peso molecular, bombeando-as por colunas que contêm um recheio de material microporoso. As moléculas grandes eluem primeiro da coluna, já que elas têm maior dificuldade de penetrar nos poros. Já as pequenas penetram mais facilmente na maioria dos poros e, por isso, são eluídas mais tardiamente.

O ICP-MS é uma técnica analítica específica para elementos químicos. Ele pode realizar seletiva monitorização, em tempo real, de um dado elemento associado a um determinado composto eluído de uma coluna cromatográfica. A sua utilização sinérgica com uma prévia separação de proteína de alta resolução oferece uma ferramenta analítica revolucionária na área de proteômica.

Para isso, utilizou-se uma coluna Superdex 75 acoplada ao HPLC hifenado ao ICP-MS. Ela foi equilibrada com água ultra-pura e, em seguida, com Tris-HCl 0,02 mol L⁻¹, pH 7,4, ambos a uma vazão de 0,5 mL min⁻¹. A velocidade da bomba durante a análise foi de 0,70 mL min⁻¹, e os seguintes metais que se ligam a MT foram monitorados online, através dos respectivos isótopos: ²⁰⁸Pb, ⁶⁰Ni, ¹¹⁴Cd, ⁶⁶Zn.

3.4 Quantificação de proteínas totais

As MTs foram quantificadas por espectrofotometria em microplaca, a partir do método de Lowry, utilizando albumina de soro bovino (BSA 2 mg mL⁻¹) como padrão para a curva analítica. De acordo com o método de Lowry, foram adicionados dois reativos (A e B) às amostras e aos pontos da curva. O reativo A é composto de uma mistura de SDS 10%, NaOH 0,8 mol L⁻¹, solução CTC (sulfato de cobre 0,1%, tartarato de sódio e potássio 0,2% e carbonato de sódio 10%) e água ultra-pura. Após a adição do reativo A, esperou-se 10 minutos, e então, se adicionou o reativo B, formado de uma solução de Follin Ciocalteau diluído 5 x. Esperou-se um tempo de 30 min para garantir o término da reação. A leitura foi feita no equipamento SpectraMax 190, Hamilton a um comprimento de onda de 750 nm.

3.5 Eletroforese em Gel

A eletroforese em gel de poliacrilamida em uma dimensão foi utilizada para a separação de proteínas de acordo com seu peso molecular. Essa técnica consiste primeiramente na adição de um agente desnaturante, dodecil sulfato de sódio (SDS), que se liga às proteínas atribuindo-lhes carga negativa. Isso é necessário para que todas as proteínas possuam a mesma carga, e possam então ser separadas apenas de acordo com o seu tamanho. O gel é formado por um polímero (poliacrilamida) que atua como uma rede capaz de reter as

proteínas. As mais pesadas ficam retidas em cima, enquanto as mais leves encontram facilidade para passar por entre os poros e, portanto, percorrem um maior caminho pelo gel.

As proteínas foram submetidas à separação no sistema vertical Ruby SE600 da GE Healthcare®. O programa de corrida consistiu em uma primeira etapa de 10 mA/gel por 15 minutos, para uma migração lenta e portanto, mais eficiente; e então uma segunda etapa de 45 mA/gel por aproximadamente 3 h. O padrão de peso molecular Precision Plus Protein™ Dual Color (Biorad) foi usado para estimativas de peso molecular. Após as corridas eletroforéticas, os géis foram fixados por 30 minutos em solução fixadora (10% ácido acético, 40% etanol), e em seguida, imersos em solução de Coomassie Blue G-250 (8% sulfato de amônio, 0,8% ácido fosfórico, 0,08% Coomassie Blue G-250 e 20% metanol) por 24 horas.

Os géis foram analisados no ImageScanner II (GE Healthcare, Upspsalla, Sweden), com o densitômetro operando em resolução de 300 dpi. O *software* de análise de imagem ImageMaster 2D Platinum 6.0 Sowftare (Genebio, Geneva, Switzerland) foi utilizado para as análises dos géis após sua coloração.

4. Resultados e discussão

Devido ao atraso na entrega do reagente TCEP, apenas a extração e quantificação das MTs (4.1) foram realizadas com esse reagente. As análises em SEC-HPLC-ICP-MS (4.2), a quantificação de proteínas totais (4.3), e a eletroforese em gel (4.4) foram feitas apenas com os reagentes β-mercaptoetanol e DTT.

4.1 Extração e Quantificação das MTs

4.1.1 Procedimento de extração 1 – Extrações A, B e C

A curva analítica de 0 a 1000 μmol L⁻¹ teve R² = 0,9987. As figuras 1 e 2 mostram as respostas obtidas para as extrações de MTs em bÍlis e fÍgado, utilizando os diferentes reagentes propostos.

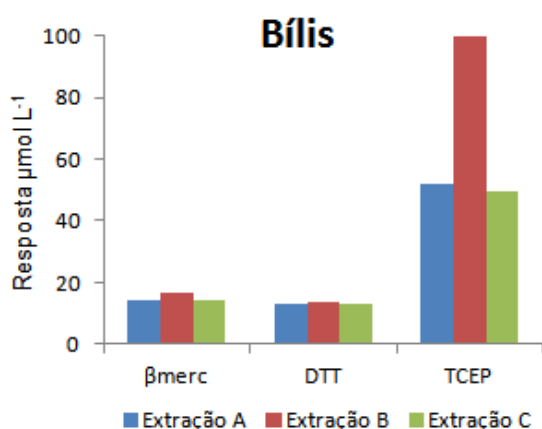


Figura 1: Gráfico de barras – bÍlis

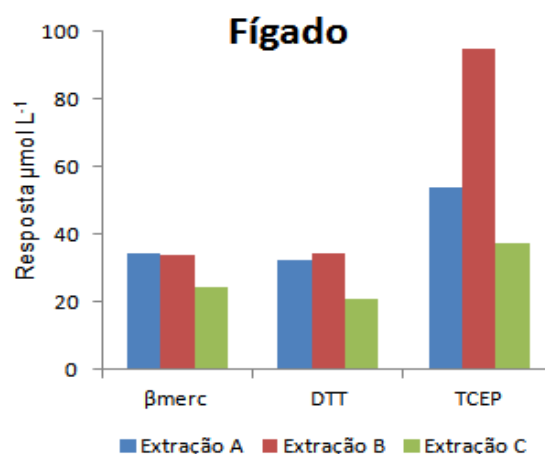


Figura 2: Gráfico de barras - fÍgado

Analisando os gráficos, observa-se que, dos três reagentes, o TCEP foi o que resultou em maiores concentrações de MT, o que indica que ele é o mais adequado para extração dessa proteína, tanto em bÍlis quanto em fÍgado. O reagente TCEP é frequentemente usado como agente redutor de bandas dissulfeto. Comparado a outros dois agentes redutores mais comumente usados (β -mercaptoetanol e DTT), o TCEP tem a vantagem de: (i) ser inodoro, (ii) ter maior poder de redução, (iii) realizar reduções irreversÍveis, (iv) ser mais hidrofÍlico, e (v) ser mais resistente à oxidação pelo ar.¹⁴

Comparando as extrações A (45'/60 °C/15'), B (60'/70 °C/30') e C (75'/80 °C/45') com o reagente TCEP, é possÍvel perceber que a extração B foi aparentemente a mais eficiente, pois resultou em respostas significativamente mais altas do que as extrações A e B.

4.1.2 Procedimento de extração 2 - variando a temperatura e fixando os tempos

Neste procedimento, fixaram-se os tempos de centrifugação para avaliar apenas a influênci da temperatura do banho-maria. Foram escolhidos os tempos de 60' para 1ª centrifugação e 30' para 2ª (tempos da extração B), já que a extração B foi verificada como a melhor dentre as outras. O reagente utilizado foi o TCEP, já que foi concluÍdo pela primeira extração que ele é o mais eficiente dentre os trÊs analisados.

A curva analÍtica de 0 a 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ teve $R^2 = 0,9986$. As figuras 3 e 4 mostram as extrações de MTs obtidas em bÍlis e fÍgado, com as diferentes temperaturas testadas.

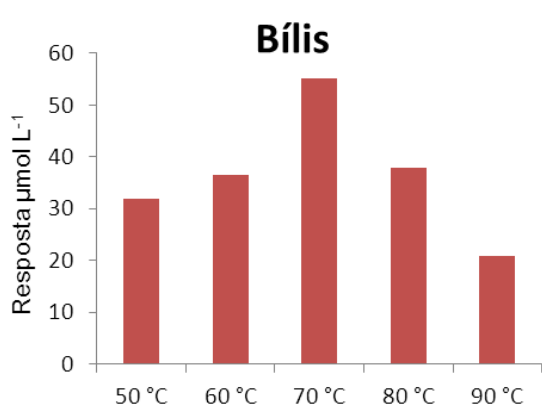


Figura 3: Gráfico de barras – bÍlis

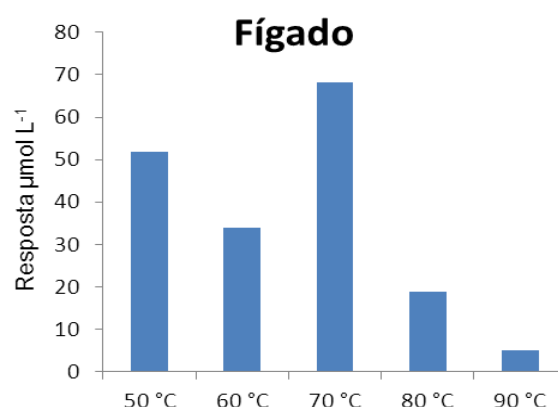


Figura 4: Gráfico de barras - fÍgado

Como pode ser verificado pelos gráficos, que apresentaram um comportamento similar, o perfil de temperaturas assemelha-se a uma superfÍcie gaussiana, com um ponto de máximo, correspondente à temperatura ótima para extração. Uma das razões desse comportamento é que em temperaturas mais elevadas (80 °C, 90 °C), ocorre a desnaturação da metalotioneína, que apesar de ser uma proteÍna termoestável, começa a desnaturar a partir de 70 °C. Portanto, em temperaturas mais elevadas, a extração de MTs é menos eficaz. Em temperaturas mais baixas, a extração tambÊm é pouco eficiente, o que possivelmente indica que a função redutora do reagente TCEP é prejudicada, visto que quanto maior a temperatura,

maior é o número de interações entre as moléculas do reagente redutor e das proteínas que contêm grupamentos tiol.

4.1.3 Procedimento de extração 3 – variando o tempo e fixando a temperatura

No último procedimento de extração de MTs, fixou-se a temperatura do banho-maria para avaliar apenas a influência do tempo de centrifugação. A temperatura utilizada foi 70 °C e o reagente, TCEP, devido aos resultados anteriores.

A curva analítica de 0 a 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ teve $R^2 = 0,9985$. As figuras 5 e 6 mostram as extrações de MTs obtidas em bÍlis e fÍgado, com os diferentes tempos testados.

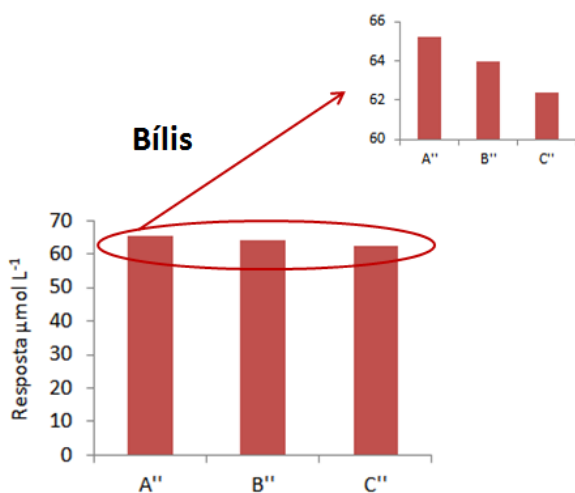


Figura 5: Gráfico de barras– bÍlis

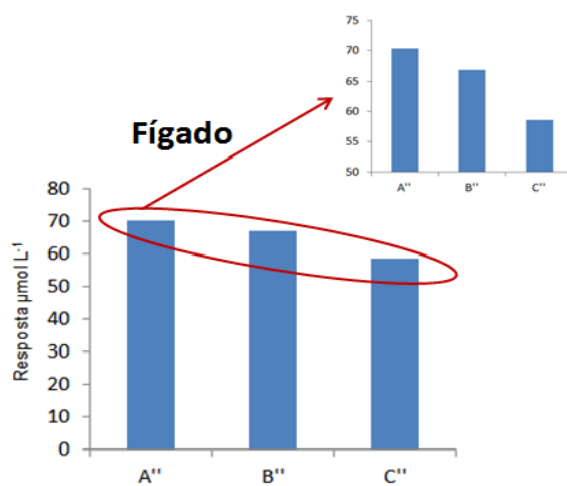


Figura 6: Gráfico de barras - fÍgado

Analisando os gráficos de barras, percebe-se que não há aparente diferença significativa entre as extrações testadas (A'', B'', C''), principalmente na matriz bÍlis. Alterando a escala do eixo vertical do gráfico, têm-se uma visualização mais real dos resultados, que indica que a extração A'' (45'/70 °C/15') resultou em respostas melhores. Esse resultado é bastante satisfatório, visto que a extração A representa o procedimento com os menores tempos de centrifugação, o que significa que a extração de MTs pode ser feita em um tempo mais curto, o que é uma ótima vantagem para experimentos laboratoriais.

Comparando os procedimentos 2 e 3, verifica-se que a temperatura do banho-maria exerce uma influência muito maior para o procedimento de extração de MTs do que os tempos de centrifugação. Ao alterar a temperatura, obtiveram-se resultados bastante divergentes, enquanto que a variação do tempo não implicou em diferenças significativas entre as extrações.

4.2 Análise em SEC-HPLC-ICP-MS

O procedimento de extração 1 (tabela 1), com a matriz bÍlis, foi avaliado através de análises por SEC-HPLC-ICP-MS, para se obter os perfis qualitativos das metaloproteÍnas, bem como os metais mais comumente ligados a elas (Pb, Ni, Cd, Zn).

O resultado da separação de proteÍnas por SEC-HPLC não aparenta diferença significativa entre os procedimentos de extrao, exceto pelo procedimento B, cujos perfis de SEC-HPLC-ICP-MS com o uso dos reagentes β -mercaptoetanol e DTT diferem entre si. Os espectros das extraoes (A, B e C) são mostrados nas figuras 7, 8 e 9.

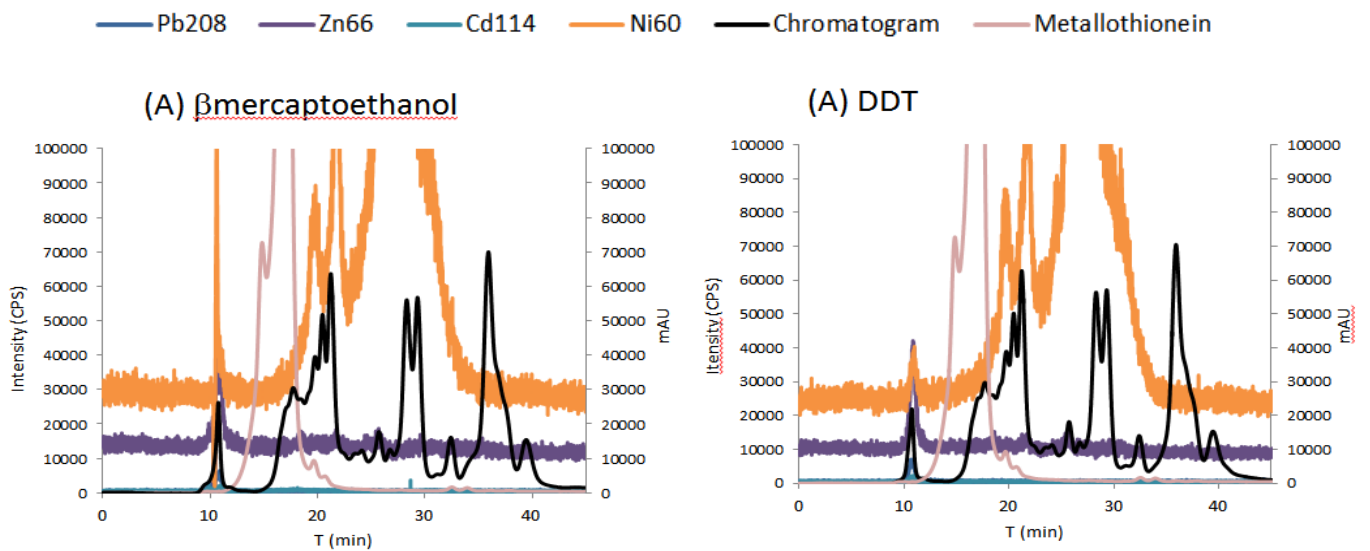


Figura 7: Espectros da extrao A com os reagentes β -mercaptoetanol e DTT.

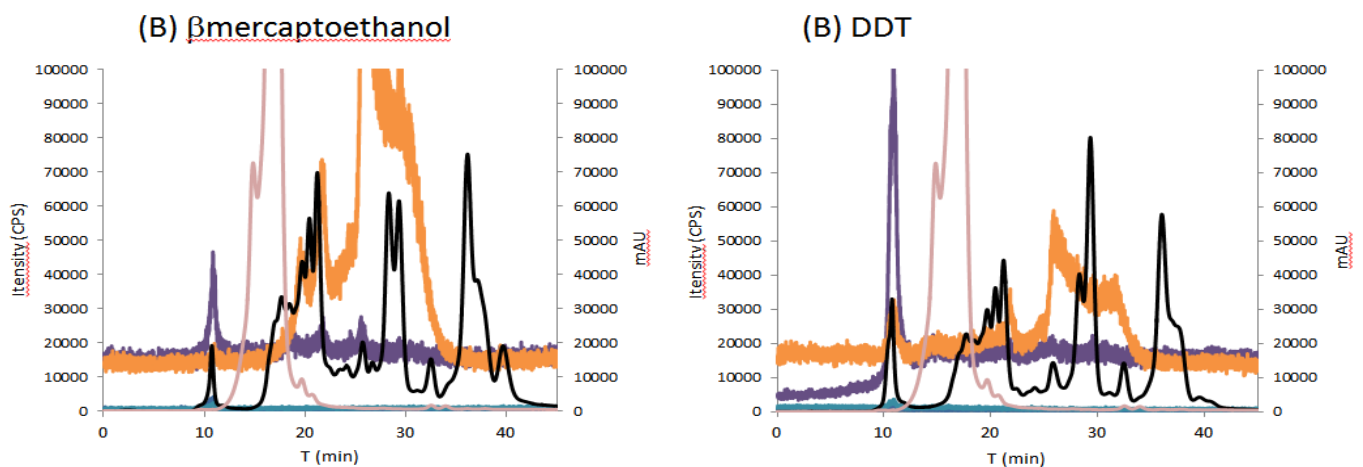


Figura 8: Espectros da extrao B com os reagentes β -mercaptoetanol e DTT.

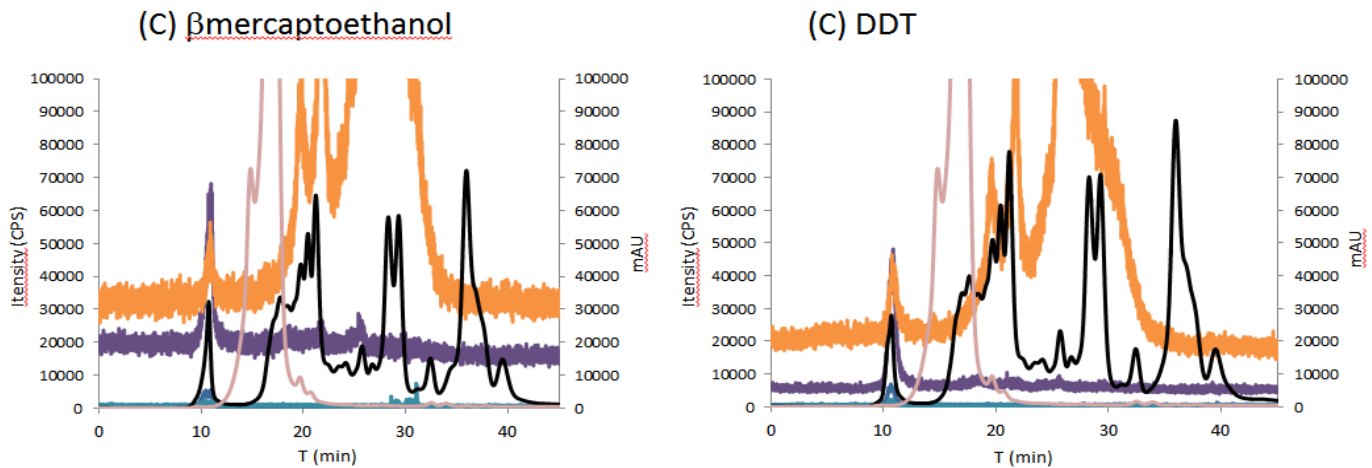


Figura 9: Espectros da extração C com os reagentes β -mercaptoetanol e DTT.

Apesar de não mostrar diferenças marcantes nos espectros dos extratos separados por SEC-HPLC, diferenças entre eles foram detectadas na quantificação espectrofotométrica e na eletroforese em gel 1D. No entanto, devido a esses resultados, outros testes serão conduzidos no laboratório, a fim de especificar melhor a separação, usando outros tipos de colunas, como troca iônica e fase reversa. Nestes últimos casos será possível separar as diferentes isoformas de MT, do qual a SEC-HPLC é incapaz de realizar.

4.3 Quantificação de proteínas totais

O procedimento de extração 1 (tabela 1) foi também avaliado através da eletroforese em gel de poliácridamida 1-D. Para isso, os extratos de bÍlis referentes aos procedimentos A (45'/60 °C/15'), B (60'/70 °C/30') e C (75'/80 °C/45') com os reagentes β -mercaptoetanol e DTT, em duplicata, tiveram suas proteínas totais quantificadas. Os resultados estão apresentados na tabela 4 e figura 10.

Tabela 4. Quantificação de proteínas totais.

Reagente	Extração	Proteína total ($\mu\text{g/mL}$)
β -mercaptoetanol	A	22,68
	B	48,54
	C	43,74
DTT	A	20,91
	B	44,65
	C	33,93

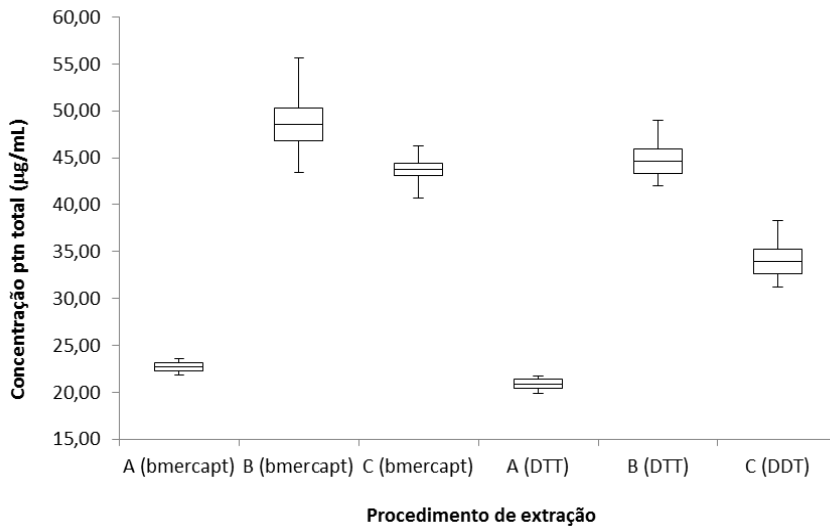


Figura 10: Gráfico Boxplot quantificação total de proteínas.

O gráfico acima apresenta diferenças significativas entre as extrações, uma vez que os resultados destoaram entre si. A extração “A” apresentou menores concentrações de proteínas totais, o que significa que mais proteínas indesejáveis foram eliminadas durante o procedimento de extração de MTs. Além disso, houve um menor desvio padrão em relação à média das replicatas para essa extração, o que enfatiza ainda mais a sua eficiência em relação às outras (B e C).

Não foi possível avaliar a influência do reagente apenas com a quantificação espectrofotométrica, uma vez que os resultados ficaram muito próximos. Esse parâmetro é melhor avaliado com a eletroforese em gel 1-D, a seguir.

4.4 Eletroforese em Gel

Os géis abaixo são referentes às extrações A, B e C, com a matriz biliar e com os reagentes β -mercaptoetanol e DTT.

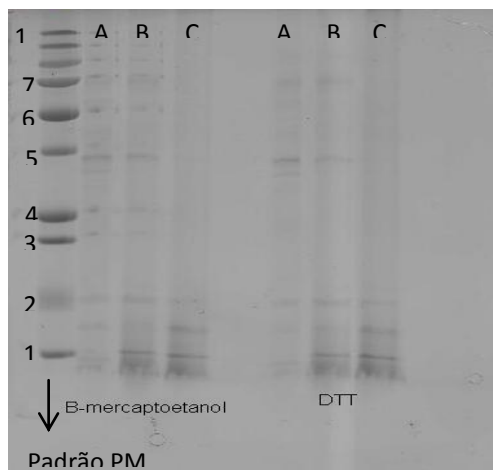


Figura 11: Gel de Eletroforese 1

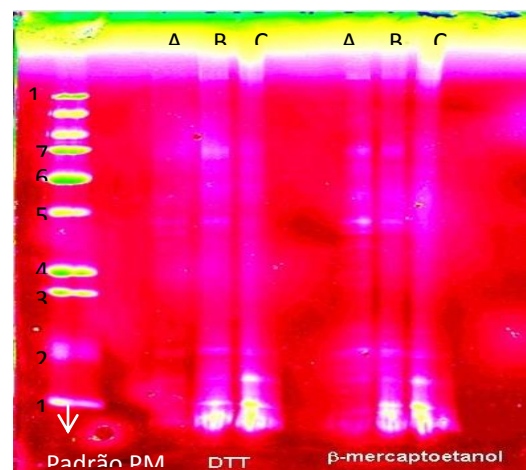


Figura 12: Gel de Eletroforese 2

A MT é uma proteína cujo peso molecular (PM) é em torno de 6 – 7 kDa; logo, a banda de MT está localizada entre as bandas 1 (10 kDa) e 2 (15 kDa). Observando os géis, é possível perceber que todos os extratos realmente contêm a proteína desejada, visto que aparecem bandas nessa faixa. Em ambos os géis, pode-se observar que as extrações com o reagente DTT mostraram-se mais eficientes, visto que atingiram o objetivo de extrair MTs com uma quantidade mínima de outras proteínas. Isso pode ser verificado pelo número de bandas de peso molecular no gel, que é maior nos extratos com o reagente β -mercaptoetanol do que com DTT. Em relação às outras proteínas que se mostraram presentes nos extratos de bÍlis com o reagente DTT, observa-se que seus pesos moleculares encontram-se nas faixas de 10 (banda 1), 15 (banda 2), 37 (banda 5) e 75 (banda 7) kDa.

5. Conclusões

A partir dos resultados, pode-se concluir que as extrações comportaram-se de forma semelhante tanto para matriz bÍlis quanto para fÍgado. Para ambos os casos, foi possível avaliar os diferentes parâmetros testados (tempo de centrifugação, temperatura do banho-maria e reagente redutor), e chegar a uma conclusão sobre o procedimento de extração de MTs mais eficiente:

- ✓ Reagente redutor: TCEP
- ✓ 1º tempo de centrifugação: 45'
- ✓ Temperatura do banho-maria: 70 °C
- ✓ 2º tempo de centrifugação: 15'

O reagente redutor e a temperatura exercem uma maior influência do que o tempo de centrifugação. Isso significa que, para um protocolo otimizado de extração de MTs em bÍlis de tilápia, deve-se escolher o reagente TCEP e a temperatura de 70 °C, mas a escolha de um tempo de centrifugação mais longo não afetará muito os resultados.

Comparando apenas as extrações A (45'/60 °C/15'), B (60'/70 °C/30') e C (75'/80 °C/45') com os reagentes β -mercaptoetanol e DTT (devido ao atraso na entrega do 3º reagente), pode-se concluir que o procedimento A com o reagente DTT mostrou-se mais adequado para a extração de MTs em bÍlis de tilápia.

6. Referências

1. Nordberg M. 1998. Metallothioneins: historical review and state of knowledge. *Talanta* 46: 243–254
2. Noel-Lambot F, Gerday C, Disteche A. 1978. Distribution of Cd, Zn and Cu in liver and gills of the eel *Anguilla anguilla* with special reference to metallothioneins. *Comp. Biochem. Physiol.* 61: 177–187.

3. Linde AR, Sánchez-Galán S, Vallés-Mota P, Garcia-Vázquez E. 2001. Metallothionein as bioindicator of freshwater metal pollution: European eel and brown trout. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 49: 60–63.
4. Olsson PE, Haux C. 1986. Increased hepatic methallothionein content correlates to cadmium accumulation in environmentally exposed perch (*Perca fluviatilis*). *Aquat. Toxicol.* 9: 231-242.
5. Weis JDB, Enslee EC. 1986. Hg- and Cu-induced hepatocellular changes in the mummichog, *Fundulus heteroclitus*. *Environ. Health Perspect.* 65: 167–173.
6. Hogstrand C, Haux, C. 1991. Binding and detoxification of heavy metals in lower vertebrates with reference to metallothionein. *Comparative Biochemistry and Physiology* 100: 137–141.
7. Filipovi V, Raspor B. 2003. Metallothionein and metal levels in cytosol of liver, kidney and brain in relation to growth parameters of *Mullus surmuletus* and *Liza aurata* from the Eastern Adriatic Sea. *Water Research* 37. 13: 3253-3262.
8. Roesijadi G, Robinson, WE. 1994. Metal regulation in aquatic animals: mechanisms of uptake, accumulation and release. *Aquatic Toxicology Molecular Biochemical and Cellular Perspectives.* 387-420.
9. Hauser-Davis RA, Gonçalves, RA, Ziolli, RL, Campos RC. 2012. A Novel report of metallothioneins in fish bile: SDS-PAGE analysis, spectrophotometry quantification and metal speciation characterization by liquid chromatography coupled to ICP-MS. *Aquatic Toxicology* 116-117: 54-60
10. Viarengo A, Burlando B, Dondero F, Marro A, Fabbri R. 1999. Metallothionein as a tool in biomonitoring programs. *Biomarkers* 4: 455–466.
11. Cajaraville MP, Bebianno MJ, Blasco J, Porte C, Saraquete C, Viarengo A. 2000. The use of biomarker to assess the impact of pollution in costal environment of the Iberian Peninsula: a practical approach. *The Science of the Total Environment* 247: 295-311.
12. Pathiratne A, Chandrasekera LWHU, Pathiratne KAS. 2009. Use of biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to assess the impacts of pollution in Bolgoda Lake, an urban water body in Sri Lanka. *Environ Monit Assess* 156:361–375
13. Erk M, Ivankovic D, Raspor B, Pavicic J. 2002. Evaluation of different purification procedures for the electrochemical quantification of mussel metallothioneins. *Talanta* 57: 1211-1218.
14. Getz EB, Xiao M, Chakrabarty T, Cooke R, Selvin PR. 1999. A Comparison between the Sulfhydryl Reductants Tris(2-carboxyethyl)phosphine and Dithiothreitol for Use in Protein Biochemistry. *Analytical Biochemistry* 273: 73-80.
15. Kagi JHR. 1991, Overview of metallothionein. *Methods of Enzymology* 205: 613–626.