

1

INTRODUÇÃO

O monitoramento ambiental é um processo de coleta de dados, estudo e acompanhamento contínuo e sistemático das variáveis ambientais, com o objetivo de identificar e avaliar - qualitativa e quantitativamente - as condições dos recursos naturais em um determinado momento, assim como as tendências ao longo do tempo. Aliados aos parâmetros físico-químicos do ambiente, a investigação e análise de diversas características dos organismos presentes em determinados ecossistemas vem sendo recomendada nos últimos vinte anos, para fornecer um quadro completo de modificações ocorridas nos diferentes ecossistemas (Marigomez, Soto *et al.*, 2002).

1.1. Biomarcadores

1.1.1. Definição e uso

Biomarcadores são definidos como mensurações de parâmetros em fluidos corporais, células ou tecidos que indicam modificações bioquímicas ou celulares devido à presença de substâncias tóxicas ou como resposta do hospedeiro a estas substâncias (Nrc, 1987).

Esta definição original foi modificada por Adams (Adams, 1990), levando em conta especificamente, os organismos aquáticos, incluindo características de organismos, populações ou comunidades que respondem de maneiras mensuráveis às mudanças no ambiente. Depledge (Depledge, Weeks *et al.*, 1994) acrescentou ainda respostas comportamentais a esta definição, expandindo-a para incluir outras perspectivas comportamentais ecotoxicológicas, como latência e diversidade genética. Três tipos de biomarcadores foram então propostos, em uma tentativa de classificar as respostas dos organismos como marcadores de exposição, efeito e susceptibilidade. Com a crescente identificação de novos biomarcadores, se

tornou aparente que estas três definições se sobrepõem, pois alguns biomarcadores podem ser usados em todos os três casos. Com a visão mais recente relacionada aos biomarcadores, um efeito resultante da exposição a estressores pode ser definido como um evento não-patogênico adaptativo ou como um evento funcional alterado mais sério, dependendo da toxicocinética e do mecanismo de ação do estressor, e os biomarcadores de exposição e efeito podem muitas vezes ser combinadas em uma única classificação, com a susceptibilidade ocorrendo em qualquer estágio (Decaprio, 1997).

O conceito principal da abordagem que utiliza biomarcadores na avaliação de efeitos adversos ou de estresse é baseado na hipótese de que os efeitos destas perturbações são tipicamente manifestados em níveis mais baixos da organização biológica antes de surgirem nos níveis mais altos, como populações, comunidades ou ecossistemas (Adams, 1990). Tais efeitos iniciais são observados primariamente no nível molecular com a indução de sistemas de defesa celular, podendo fornecer respostas a respeito da adaptação ao contaminante após a exposição. Porém, se estes processos de defesa forem falhos podem então surgir danos em níveis mais altos, como danos histológicos ou teciduais. Se estes processos são permanentemente afetados ou alterados durante períodos vulneráveis do desenvolvimento do organismo, a reprodução ou sobrevivência do mesmo podem ser afetadas, eventualmente levando a mudanças na população e, possivelmente, nos níveis de comunidade da organização biológica (Schlenk, 1999). Portanto, efeitos em níveis hierárquicos mais altos são sempre precedidos de mudanças anteriores nos processos biológicos (Figura 1), permitindo o desenvolvimento de sinais reconhecidos como biomarcadores de efeitos em níveis de respostas posteriores (Bayne, Brown *et al.*, 1985).

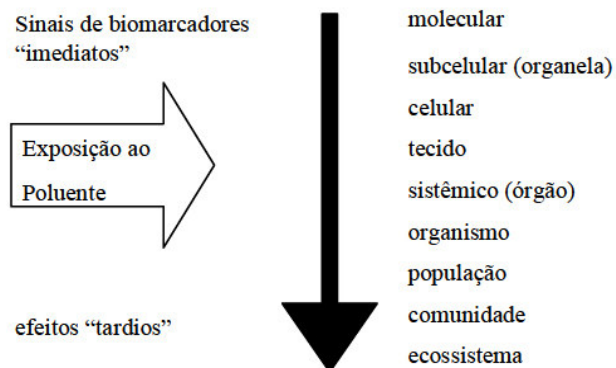


Figura 1. Esquema clássico dos níveis de respostas dos sistemas biológicos frente a poluentes (Bayne, Brown *et al.*, 1985).

O estudo e uso de biomarcadores muitas vezes aumenta a possibilidade de identificação de causas de efeitos tóxicos, podendo também fornecer informações a respeito da biodisponibilidade de poluentes e seus potenciais danos ecológicos (Albertsson, Kling *et al.*, 2007). Porém, estes biomarcadores podem variar muito em sua especificidade. Existem, por exemplo, os biomarcadores não-específicos, que podem ser afetados por múltiplos estressores e contaminantes, como certas proteínas, que são induzidas por metais, luz ultravioleta, estresse e hipoxia, dentre outros (Santoro, 2000), e os biomarcadores específicos a determinadas situações e contaminantes, como as metalotioneínas, expressas especificamente em situações de exposição à metais (Langston, Chesman *et al.*, 2002). Existem diversos biomarcadores não-específicos e poucos específicos para a maioria dos contaminantes ambientais.

Em um contexto ambiental, os biomarcadores oferecem a promessa de indicadores sensíveis que demonstram a entrada de substâncias tóxicas no organismo, sua distribuição nos tecidos e os seus efeitos tóxicos em alvos críticos (Mccarthey e Shugart, 1990). No contexto de monitoramento ambiental, marcadores mais específicos são mais interessantes por fornecerem informações mais específicas relacionadas a danos ambientais e seus efeitos adversos (Schlenk, 1999), embora marcadores não-específicos também sejam de interesse. Bons biomarcadores são índices sensíveis tanto da biodisponibilidade de poluentes quanto das respostas biológicas que acontecem nos níveis mais baixos da hierarquia (Van Der Oost, Lopes *et al.*, 1998).

1.1.2.

Peixes como bioindicadores

Por diversos motivos, os peixes têm atraído considerável interesse em estudos sobre respostas biológicas e bioquímicas a contaminantes ambientais (Powers, 1989). Estes organismos são bons modelos para este tipo de estudo, pois vivem em ambientes variados e precisam se adaptar a parâmetros ambientais e a diferentes estresses, que geralmente podem ser facilmente reproduzidos em condições controladas no laboratório, se necessário (Powers, 1989). Além disso, eles possuem papel ecológico importante nas teias tróficas aquáticas, como carreadores de energia a níveis tróficos superiores, e estão expostos a contaminações ambientais a partir de diferentes fontes, como água, alimentação e sedimento. Portanto, os peixes são reconhecidos como bioindicadores de mudanças ambientais, incluindo a contaminação ambiental por diferentes compostos (Fao/Sida, 1983; Aas, Beyer *et al.*, 2000; Espino, 2000). Assim, os estudos da exposição a contaminantes ambientais e as respostas comportamentais, fisiológicas e bioquímicas destes organismos possuem grande relevância. Além disso, os peixes também são importantes elos entre o ambiente, possíveis contaminantes e as populações humanas, através da aquicultura e consumo (Fao/Sida, 1983; Espino, 2000).

Diversos biomarcadores relacionados à contaminação ambiental têm sido estudados em peixes, como enzimas de biotransformação, parâmetros de estresse oxidativo, proteínas relacionadas ao stress, metalotioneínas (MTs), a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE), a atividade dos citocromos P450 (responsáveis pela biotransformação de diversos compostos xenobióticos) (Stegeman, Moore *et al.*, 1992; Van Der Oost, Lopes *et al.*, 1998) e parâmetros morfológicos, hematológicos, histológicos e imunológicos (Van Der Oost, Lopes *et al.*, 1998).

Mais recentemente, tem se verificado também a possibilidade do uso da excreção biliar, que oferece uma alternativa na análise de certos contaminantes em organismos marinhos. O metabolismo rápido e a eliminação de diferentes contaminantes por vertebrados podem, às vezes, resultar em baixas concentrações residuais destes contaminantes no músculo e no fígado, que são os tecidos e

órgãos usualmente analisados em estudos de biomonitoramento, e, com isso, a bÍlis pode ser uma alternativa como biomarcador de contaminação ambiental (Galgani, Bocquene *et al.*, 1992). Por exemplo, muitas espécies de peixes de ambientes contaminados com hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) apresentam altas concentrações de metabólitos de HPA na bÍlis (Krahn, Myers *et al.*, 1984; Ariese, Kok *et al.*, 1993; Norris, Camp *et al.*, 2000), e alguns poucos estudos observaram que elementos-traço como o cobre e o zinco também são excretados na bÍlis (Bunton e Frazier, 1994; Dijkstra, Havinga *et al.*, 1996; Handy, 1996; Grosell, Hogstrand *et al.*, 1998), embora esta última informação quase não tenha sido aplicada em um contexto de monitoramento ambiental.

1.2.

Os campos proteômico e metaloproteômico e suas aplicações em estudos de monitoramento ambiental

Na década passada houve um tremendo avanço nos campos “ômicos”. O campo mais conhecido dentre eles é o campo genômico, que analisa as sequências completas de DNA de organismos vivos. Porém, outro campo que passou por grande desenvolvimento e vem se destacando cada vez mais é o campo proteômico. Este campo engloba o estudo do proteoma (conjunto de proteínas de um tecido ou fluido biológico) de organismos, inclusive as variações decorrentes de diferentes situações, fornecendo informações valiosas a respeito dessas variações, suas causas e, possivelmente, suas consequências. Essas variações podem, por exemplo, refletir uma resposta a perturbações biológicas ou a estÍmulos externos, como a contaminação ambiental (Martin e Black, 1996), resultando em diferentes expressões protéicas ou na redistribuição de proteínas específicas dentro de células ou fluidos biológicos (Tyers e Mann, 2003).

As técnicas proteômicas têm permitido um aprofundamento em questões ambientais e biológicas ao permitir o estudo de milhares de proteínas. Até agora, tais técnicas têm beneficiado, primariamente, a pesquisa em espécies bem caracterizadas, como os seres humanos, camundongos e leveduras. Porém, o que

ocorre no laboratório ou em organismos-modelo nem sempre é refletido em situações reais no ambiente (Grosell, Hogstrand *et al.*, 1997). Nesse contexto, estas técnicas são valiosas na identificação de proteínas alteradas após exposição ambiental a poluentes, que podem, possivelmente, vir a ser utilizadas como biomarcadores novos e mais abrangentes, pois não é necessário nenhum conhecimento prévio a respeito de sua relação com o mecanismo tóxico dos poluentes (López-Barea e Gómez-Ariza, 2006).

A área metalômica ou metaloproteômica é um campo relativamente novo se comparada às áreas genômica e proteômica. Este campo estuda as espécies metálicas e metalóides dentro de uma célula, um tecido ou um fluido biológico, focada na exploração da função dos metais associados às proteínas (Szpunar, 2000; 2005; Bertini e Cavallaro, 2008). Por exemplo, genes e proteínas não podem ser sintetizados sem o auxílio de metaloenzimas contendo zinco e outros metais, indicando a importância destes elementos no organismo (Haraguchi, 2004). Este é um campo a ser desenvolvido em conjunto com os campos da genômica e proteômica, pois as bases moleculares de muitos dos processos bioquímicos dependentes de metais ainda não são conhecidos, e os mecanismos pelos quais os metais são percebidos, armazenados ou incorporados como cofatores nas células são também muitas vezes desconhecidos (Simpkins e Williams, 1989; Haraguchi, 2004). Primeiro, porém, é necessário localizar, identificar e quantificar as moléculas que se ligam a metais, para depois analisar o seu papel no organismo (Szokefalvi-Nagy, Bagyinka *et al.*, 1999; Gao, Chen *et al.*, 2003). Algumas metaloproteínas já têm sido utilizadas como biomarcadores de exposição ambiental (López-Barea e Gómez-Ariza, 2006), como, por exemplo, as superóxido dismutases, que são metaloenzimas antioxidantes que se ligam ao cobre, zinco, ferro, manganês e níquel, e que são mais expressas em situação de estresse oxidativo em diversos organismos, inclusive em peixes (Radi e Marcovics, 1988).

Portanto, estes dois campos recentemente desenvolvidos, a proteômica e a metaloproteômica, têm mostrado potencial considerável para uso em análises de riscos ecológicos e estudos de biomonitoramento ambiental.

1.2.1.

O uso de biomarcadores em estudos proteômicos ambientais

A proteômica aplicada a estudos ambientais de ecotoxicologia e monitoramento ambiental tem como um de seus objetivos descobrir e identificar novos candidatos a biomarcadores de resposta a contaminantes ambientais (Snape, Maund *et al.*, 2004; Dowling e Sheehan, 2006; López-Barea e Gómez-Ariza, 2006). Estes biomarcadores podem ser um conjunto de genes ou proteínas expressas simultaneamente, que podem, potencialmente, fornecer informações em diversas áreas: (i) caracterizando funções de genes e produtos gênicos com perfis semelhantes ou com mecanismos de regulação em comum (Quackenbush, 2001); (ii) podendo ser usados para classificar compostos com modos de ação semelhantes, analisando suas “impressões digitais” toxicológicas (Snape, Maund *et al.*, 2004; Miracle e Ankley, 2005; Oberemm, Onyon *et al.*, 2005); (iii) podendo indicar diferentes níveis de estresse ao integrar marcadores gerais e específicos em um único ensaio. Com isso, o uso de técnicas proteômicas está se tornando cada vez mais útil na descoberta de tais biomarcadores nos campos da ecotoxicologia (Snape, Maund *et al.*, 2004; Miracle e Ankley, 2005; Samuelsson, Forlin *et al.*, 2006). Tais estudos podem contribuir imensamente para a compreensão das respostas celulares a condições ambientais alteradas.

Diversos estudos já foram conduzidos neste contexto, como o estudo de Bradley e colaboradores (Shepard, Olsson *et al.*, 2000) que procuraram caracterizar as “assinaturas de expressão protéica” em invertebrados marinhos em resposta a mudanças em salinidade e temperatura. Outros estudos interessantes incluem a análise proteômica das respostas a contaminantes ambientais como as bifenilas policloradas e o cobre (Shepard, Olsson *et al.*, 2000; Kimmel e Bradley, 2001) e da resposta ao cádmio em cepas de leveduras. Este último, por exemplo, detectou deficiências no sistema redox da tioredoxina, uma rota potencialmente importante de destoxificação (Vido, Spector *et al.*, 2001), fornecendo novas informações a respeito desse importante contaminante ambiental.

Como muitos perfis protéicos aparentam ser específicos a certos contaminantes e estressores, a probabilidade de se conseguir identificar biomarcadores viáveis é bastante alta (Jellum, Thorsrud *et al.*, 1983; Blom,

Harder *et al.*, 1992; Shepard, Olsson *et al.*, 2000), e pode não ser necessário identificar com total certeza a proteína em questão, pois as suas características e condições específicas nas quais elas ocorrem são mais importantes que a sua identidade (Grosell, Hogstrand *et al.*, 1997). quase não tenha sido aplicada em um contexto de monitoramento ambiental.

1.2.2.

A aplicação de técnicas proteômicas na identificação de biomarcadores protéicos em peixes

As técnicas proteômicas têm se tornado cada vez mais importantes no estudo da fisiologia de peixes: primeiramente como um método comparativo para analisar a evolução gênica, depois como um modo de realizar análises globais de rotas de sinalização celular envolvidas em mecanismos fisiológicos ligados ao crescimento, reprodução, patologias e estresse (inclusive estresse ligado à contaminações ambientais) e, finalmente, como uma maneira de rapidamente identificar novas proteínas e homólogos de proteínas conhecidas que desempenham papel importante em outros grupos animais (Parrington e Coward, 2002). Diversos estudos neste âmbito já existem; alguns exemplos incluem a análise proteômica da aclimação térmica e osmóticos em uma espécie de gobídeo (*Gillichthys mirabilis*), que verificou diferenças na expressão de diversas proteínas. Neste caso os autores levantaram a hipótese destas proteínas estarem envolvidas na aclimação destes peixes a condições ambientais flutuantes (Kultz e Somero, 1996). Outro estudo interessante investigou os efeitos da falta de alimentação nos perfis protéicos de fígados em trutas em comparação com animais controle, e também foram observadas proteínas diferencialmente expressas neste caso (Martin e Black, 1996). Porém, o potencial de estudos proteômicos em sistemas piscinos ainda não é completamente empregado (Grosell, Hogstrand *et al.*, 1997).

Alguns exemplos de trabalhos mais recentes em relação à peixes incluem exposições de organismos a contaminantes em laboratório e análises utilizando

técnicas ômicas, fornecendo mais informações a respeito dos possíveis modos de ação de certos contaminantes e sugestões a respeito de novos biomarcadores (Larkin, Sabo-Atwood *et al.*, 2003; Koskinen, Pehkonen *et al.*, 2004; Albertsson, Kling *et al.*, 2007). Um estudo interessante analisou a exposição de truta arco-íris a doses subletais de zinco por alguns dias, e verificou a indução da expressão da cadeia beta da proteína C3-1, que possui papel importante na resposta imunológica e função imunoregulatória (Lambris, Lao *et al.*, 1993). Os autores concluíram que a indução desta proteína pelo zinco poderia, então, constituir evidência de que este metal tem um efeito estimulante no sistema immune desta espécie. Outro estudo deste tipo foi realizado expondo a espécie *Paralichthys olivaceus* a cádmio, que também verificou alterações proteômicas, desta vez no tecido branquial dos peixes, onde 18 proteínas apresentaram modificações. Destas 18, foram identificadas a HSP70 e proteínas que se ligam ao cálcio, que, portanto, apresentam potencial para investigação da contaminação por cádmio no ambiente (Grosell, Hogstrand *et al.*, 1997).

A abordagem de análise da expressão proteômica diferencial em situações de campo complexas também tem sido estudada. Esta abordagem pode apontar quais genes, metabólitos ou proteínas são mais interessantes de estudar no laboratório, com base nas respostas encontradas no ambiente real (Albertsson, Kling *et al.*, 2007). Embora ainda existam poucos estudos de campo que utilizem técnicas proteômicas, o interesse neste campo vem aumentando gradativamente e alguns trabalhos recentes já verificaram, por exemplo, diferenças na expressão gênica de peixes amostrados de estuários contaminados e não contaminados no leste da Inglaterra e diferenças metabólicas e protéicas no fígado de linguados com e sem tumores (Simpkins e Williams, 1989; Stentiford, Viant *et al.*, 2005). No estudo relacionado aos fígados, por exemplo, 56 proteínas se mostraram significativamente mais expressas (*up-regulated*) e 20 significativamente menos expressas (*down-regulated*) nos tecidos tumorais, e 12 destas proteínas exibiram o potencial de agir como biomarcadores com relação a lesões neoplásicas. Alguns reconhecidos contaminantes ambientais como as cianotoxinas, especificamente as microcistinas, também já foram estudadas no contexto proteômico em peixes. Um estudo identificou 17 proteínas diferencialmente expressas em fígados de peixes expostos por apenas duas horas a estas toxinas, incluindo proteínas envolvidas em estruturas celulares, na transdução de sinais dentro das células, na regulação de

enzimas e no estresse oxidativo, como as metiltransferases, a β -tubulina e um fator apolipoprotéico, dentre outros. Estas proteínas alteradas corroboraram estudos sobre os efeitos tóxicos da microcistina e seus modos de ação, por exemplo, causando ruptura celular

Estes estudos conseguiram, portanto, criar um *link* entre os estudos tradicionais e o campo emergente da ecotoxicogenômica/proteômica, demonstrando a utilidade destes tipos de estudo em organismos não-modelo amostrados do ambiente como uma primeira tentativa de caminhar na direção da descoberta de biomarcadores em sentinelas ambientais utilizando abordagens ômicas. Assim, estas abordagens apresentam o potencial de serem aplicadas como métodos rápidos de *screening* para a classificação de doenças e podem, ao final, fornecer um entendimento mecanístico dos efeitos de estressores ambientais na saúde de organismos expostos.

Além disto, estes tipos de estudo também têm sido aplicados em outras áreas interessantes, como na análise de mudanças protéicas ao longo do desenvolvimento de peixes teleósteos (Focant, Vandewalle *et al.*, 2003; Huriaux, Baras *et al.*, 2003; Sveinsdottir, Vilhelmsson *et al.*, 2008), no estudo dos efeitos de diferentes dietas em peixes consumidos por humanos (Martin e Black, 1996; Shepard, Olsson *et al.*, 2000; Vilhelmsson, Martin *et al.*, 2004) e na distinção de filés processados de várias espécies de peixes próximas (Piñeiro, Barros-Velázquez *et al.*, 1999; Liebler, 2002; Baldisserotto, Lopez-Vasquez *et al.*, 2004; Martinez e Friis, 2004), expandindo o conhecimento com relação à diferenciação molecular de táxons animais, servindo como base útil para futuros estudos ecológicos, fisiológicos e genéticos e como verificação das modificações que as proteínas sofrem em alimentos, para utilizá-las como biomarcadores na estimativa da origem e do histórico dos alimentos.

Observando estes diferentes exemplos, é demonstrado que as modificações protéicas podem, portanto, ser marcadores muito úteis na exposição ambiental à contaminantes, e as oportunidades para estudar as modificações protéicas cada vez mais estão se tornando importantes em estudos ecotoxicológicos e de monitoramento ambiental (Piñeiro, Barros-Velázquez *et al.*, 1999; Liebler, 2002; McDonagh, Tyther *et al.*, 2005; McDonagh e Sheehan, 2006).

1.3.

A bÍlis como biomarcador

A bÍlis é uma secreção hepática que tem como papel promover a emulsificação e adsorção de lipídios no intestino via ação de ácidos ou sais biliares. Este fluido também age como meio de excreção para muitas substâncias, tanto endógenas quanto exógenas, do sangue e do fÍgado que não são excretados pelos rins (Grosell, Hogstrand *et al.*, 1997). Estudos ambientais indicam que xenobióticos, como, por exemplo HPA, são excretados do fÍgado para a bÍlis e de lá excretados do organismo (Neves, Oliveira *et al.*, 2007). Verificou-se também que os metabólitos desses compostos também são excretados pela bÍlis (Kammann, 2007). Portanto, esta matriz já é um reconhecido biomarcador de exposição ambiental a HPA.

Alguns estudos indicam que a bÍlis também serve como meio de excreção de metais (Bunton e Frazier, 1994; Dijkstra, Havinga *et al.*, 1996). Em peixes, por exemplo, o cobre é excretado primariamente através da bÍlis (Grosell, Hogstrand *et al.*, 1997; Grosell, O'donnell *et al.*, 2000), enquanto outros elementos, como o zinco, podem ser excretados pela bÍlis ou pelo intestino (Handy, 1996). Porém, curiosamente, existe apenas um estudo a respeito da análise de bÍlis para verificar seu potencial como biomarcador de exposição a metais (Westerlund, Aas *et al.*, 1998).

Estudos proteômicos a respeito da bÍlis são escassos. Alguns estudos com bÍlis humana existem, que identificaram diversas proteínas diferencialmente expressas em pacientes sadios e pacientes apresentando tumores do trato biliar, como colangiocarcinomas, colestase (diminuição ou interrupção do fluxo de bÍlis) e estenose biliar (Chen, Tsai *et al.*, 2008; Farina, Dumonceau *et al.*, 2009). Em outras espécies, porém, não existem relatos a respeito da bÍlis como biomarcador, nem em contexto patológico de identificação de biomarcadores de doenças, nem em contexto ambiental de identificação de proteínas diferencialmente expressas em diferentes situações.

Como os efeitos de alguns contaminantes ambientais levam a mudanças morfológicas em diversos órgãos, especialmente o fÍgado, é postulado que uma

modificação da composição da bÍlis também poderia ser observada (Morozov e Vysotskaya, 2007). Portanto, seria de interesse analisar esta matriz, tanto com relação à presença de metais, que são importantes contaminantes de ecossistemas aquáticos, quanto com relação à caracterização de aspectos proteômicos que poderiam possivelmente identificar proteínas de interesse em um contexto ambiental.

1.4.

Metalotioneínas como biomarcadores de exposição a metais em peixes

Um biomarcador de contaminação ambiental muito utilizado em peixes é a expressão aumentada de metalotioneínas (MT) em ambientes contaminados por metais. As MT são proteínas que se ligam a metais inteiramente através de ligações metal-cisteína (Kagi e Schaffer, 1988). Elas apresentam em torno de 60 aminoácidos, sendo que 30% correspondem a cisteínas, contendo grupamentos sulfidríla, apresentam massa molecular entre 6 e 7 kDa, e são térmicamente estáveis. As MT se ligam a 7 equivalentes de íons metálicos divalentes, formando domínios metal-sulfidríla (Kagi e Schaffer, 1988; Chang et al., 2006; Vergani et al., 2003), e possuem papel na regulação celular de metais metabolicamente importantes como o Cu e o Zn. Elas também se ligam a outros elementos Ib e IIb, portanto apresentando também um papel adicional na redução da toxicidade de outros metais, tais como Ag, Cd e Hg em ambientes contaminados (Livingstone, 1993; Viarengo, Bettella *et al.*, 1997). Este mecanismo da destoxificação ocorre através da ativação transcripcional dos genes MT por metais, resultando em um aumento da síntese destas proteínas e subsequente ligação de metais livres às proteínas (Grosell, Hogstrand *et al.*, 1997). Estas proteínas podem ser identificadas e quantificadas por diferentes métodos, indo de métodos simples, como a espectrofotometria, a técnicas mais complexas como a eletroforese (ex: densitometria utilizando curvas analíticas de padrões proteicos conhecidos analisados em paralelo com amostras a serem quantificadas) e a cromatografia a líquido acoplada a detectores de massa.

A relação entre os níveis de metais no ambiente e as concentrações de MT em tecidos animais tem levado ao uso destas proteínas como biomarcadores no monitoramento de efeitos biológicos resultantes de exposições a metais, especialmente em organismos aquáticos como mexilhões e peixes (Hylland, Haux *et al.*, 1992; Livingstone, 1993; Amiard, Amiard-Triquet *et al.*, 2006). Em estudos de monitoramento ambiental na exposição a metais utilizando peixes, estas proteínas são usualmente analisadas em fígado e músculo (Langston, Chesman *et al.*, 2002; Pathiratne, Chandrasekera *et al.*, 2009). Alguns estudos também verificaram que as MT existem no cérebro, rins e brânquias (Dang, Berntssen *et al.*, 2001; Bouraoui, Banni *et al.*, 2008), e estas proteínas já foram observadas em bÍlis de rato (Mikalsen, Daae *et al.*, 1989; Yamada, Oshima *et al.*, 2010), porém, não existem relatos de MTs em bÍlis em peixes, e existem muito menos estudos relativos à metalotioneÍnas conduzidos no Brasil em comparação com outros paÍses.