

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1. Áreas de estudo

As áreas de estudo descritas abaixo foram escolhidas para as coletas dos peixes por serem importantes no cenário sócio-econômico do estado do Rio de Janeiro, onde os peixes são vendidos para consumo e/ou servem de alimentação para as populações locais de pescadores e de entorno. A figura 5 indica as localizações de cada área.



Figura 1. Mapa mostrando a localização das 5 áreas de estudo do presente trabalho. As tainhas foram coletadas na Lagoa Rodrigo de Freitas, na Praia de Itaipu e na Praia de Ipiranga, enquanto as tilápias foram coletadas na Lagoa de Jacarepaguá, na Lagoa Rodrigo de Freitas e em Silva Jardim, e os acarás foram coletados apenas na Lagoa Rodrigo de Freitas.

### **5.1.1. Lagoa Rodrigo de Freitas**

A Lagoa Rodrigo de Freitas está localizada na zona sul da cidade do Rio de Janeiro – RJ, entre as latitudes 22°57'75" S e 22°58'82" S e as longitudes 43°11'90" O e 43°12'10" O. Compreende uma área de 2,2 Km<sup>2</sup>, aproximadamente apresentando um perímetro de 7,5 Km de extensão, alcançando aproximadamente 11 m de profundidade máxima (Andreato, Marca *et al.*, 1997). Atividades econômicas, como a pesca, turista-hoteleiras e industriais (lavanderias e postos de combustível), são exercidas na região de influência da lagoa (Stefens, 2006). Este local, ao longo desta última década vem se caracterizando por um substancial aumento de problemas de natureza físico-ambiental (Alves, Argento *et al.*, 1998). As principais fontes de contaminação da Lagoa Rodrigo de Freitas são ligações clandestinas de esgoto “in natura” na rede pluvial, despejos, vazamentos ou acidentes em postos de revenda de combustível e serviços que operaram durante décadas sem controle (Bastos, 2006). Um estudo recente feito no Departamento de Oceanografia e Hidrologia da UERJ mostrou que existe uma séria contaminação por metais e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos na Lagoa Rodrigo de Freitas (Loureiro, 2004).

### **5.1.2. Lagoa de Jacarepaguá**

A Baixada de Jacarepaguá, localizada ao sul do município do Rio de Janeiro, está compreendida entre as latitudes 22°55' S e 23°03' S e as longitudes 43°30' W e 43°18' W. É delimitada pelos maciços montanhosos da Tijuca à leste, da Pedra Branca à oeste e pelo Oceano Atlântico ao sul. Sua área total, com aproximadamente 130 Km<sup>2</sup>, é ocupada em parte por um sistema de lagoas: Jacarepaguá-Camorim-Tijuca, com 8,8 Km<sup>2</sup>, Marapendi, com 4,6 Km<sup>2</sup>, e Lagoinha com 0,2 Km<sup>2</sup> (Cedae, 1987). O complexo lagunar da Baixada de Jacarepaguá é caracterizado por lagoas de pequena profundidade, composto por 60% de área com profundidades inferiores a 1 m e 10 % com profundidades entre

5 e 12 m, e é formado por três lagoas principais: Tijuca, Jacarepaguá e Marapendi, e a de Camorim, situada entre as lagoas da Tijuca e de Jacarepaguá (Feema, 1990). Com cerca de 280 Km<sup>2</sup> de área, a bacia hidrográfica do complexo lagunar de Jacarepaguá é composta por diversos rios que descem as vertentes dessas montanhas e deságuam nas lagoas, que por sua vez se ligam ao mar pelo canal da Barra da Tijuca, permitindo a troca de água com o mar (Feema, 1990). A lagoa de Jacarepaguá é a lagoa mais interiorizada do conjunto, e possui uma área de 4,04 Km<sup>2</sup>. Esta lagoa é relativamente rasa com uma profundidade média de 3,32 m, possuindo uma forte vinculação com o continente, pois, recebe aportes fluviais significativos. A influência antrópica próxima a este complexo, como aterros e os desmatamentos, despejo de dejetos, rejeitos industriais, lixo e o aporte de água doce do esgotamento sanitário que vem se ampliando ao longo das últimas décadas, já começou a acarretar problemas como assoreamento, mortandade de peixes, mudança na tonalidade da água, mau cheiro, “explosão” de algas, e enchentes (Pimenta e Marques, 2003).

### **5.1.3. Itaipu**

A região costeira de Itaipu (22°53'14" S, 43°22'48" W) abriga uma pesca artesanal intensiva, estabelecida na área desde o século XVIII, e, atualmente, envolve cerca de 200 pescadores. A área está localizada no Oeste da boca da Baía de Guanabara, e forma uma enseada semi-protegida, protegida por três ilhas costeiras. A massa de água costeira é uma mistura de águas da Baía de Guanabara, contribuições das lagoas de Itaipu-Piratininga e águas costeiras oceânicas, sazonalmente influenciadas pela fraca ressurgência das Águas Centrais do Atlântico Sul (Tubino *et al.*, 2007). As lagoas de Itaipu-Piratininga fazem parte de um dos mais importantes pólos de turismo e lazer do Estado do Rio de Janeiro, na região das praias oceânicas de Niterói, abrangendo os bairros de Itaipu, Piratininga, Camboinhas e Cafubá, representando uma área de 3,5% da área total do município de Niterói, sendo que a Lagoa de Itaipu possui uma área de aproximadamente 1,2 Km<sup>2</sup> e a Lagoa de Piratininga ocupa 3,2 Km<sup>2</sup> (FEEMA, 2007).

A praia de Itaipu é uma tradicional vila de pescadores que encontra-se situada na região oceânica da cidade de Niterói, no estado do Rio de Janeiro, ligada à Lagoa de Itaipu por um canal construído em 1970 (IBAMA, 2000; Weber, 2001). Com a construção do canal, o arco praial original de 3300 m foi dividido em duas praias denominadas Cambinhas e Itaipu (Santos *et al.*, 2004). Os tipos de pesca realizados no local incluem Rede de espera, linha-de-mão, Mergulho, Zangarejo e Arrasto-de-praia (Barroso, 2008).

#### **5.1.4. Praia de Ipiranga**

A Praia de Ipiranga, ou Praia do Limão, está localizada no município de Magé, nas coordenadas 22°43'27" S e 43°10'98" W (Portal Baía de Guanabara, 2008). A produção de pescado é comercializada no local, adquirida por intermediários e destinada a feiras, peixarias e para o CEASA (IBAMA, 2002). Os principais tipos de pesca praticados no local são por rede-de-espera, linha-de-mão, espinhel e curral (Barroso, 2008). Este local é reconhecidamente afetado pela contaminação presente na Baía de Guanabara, que inclui uma contaminação crônica de diversos metais no sedimento, na água e em organismos marinhos (Heizen & Rebello, 1980).

#### **5.1.5. Silva Jardim**

Este local é um local de referência, pois os peixes obtidos desta região são advindos de uma aquicultura que fornece peixes para revenda e consumo humano, com manutenção em condições controladas.

#### **5.2. Coleta de peixes**

Os espécimes de *Tilapia rendalli* (tilápias) foram capturados na Lagoa Rodrigo de Freitas, Lagoa de Jacarepaguá e Silva Jardim. Os dois primeiros são locais reconhecidamente contaminados de acordo com a literatura, e o último, a

área controle, por ser uma piscicultura. Na Lagoa Rodrigo de Freitas e de Jacarepaguá, os animais foram coletados por rede de arrasto, e em Silva Jardim, por aprisionamento em tanques-rede.

Os espécimes de *Mugil liza* (tainhas) foram coletadas em Itaipu, Ipiranga e na Lagoa Rodrigo de Freitas. Esta espécie foi utilizada na análise de elementos-traço, portanto foram escolhidos justamente dois locais reconhecidamente contaminados por metais para confirmar as concentrações altas esperadas de metais na bÍlis desta espécie e poder realizar as análises estatísticas apropriadas. Itaipu, por causa da indústria naval presente no local, apresenta altas concentrações de metais no sedimento e na água (Neto, Crapez *et al.*, 2005), e Ipiranga, na Baía de Guanabara, também é altamente contaminada por metais (De Luca Rebello, Haekel *et al.*, 1986; Perin, Wagener *et al.*, 1997; Carreira, Wagener *et al.*, 2002; Azevedo, Bruning *et al.*, 2004).

Os espécimes de *Geophagus brasiliensis* (acarás) foram coletados paneas na Lagoa Rodrigo de Freitas. Os peixes coletados em campo foram cobertos com gelo até a chegada ao laboratório, em caixas de isopor. O gelo foi utilizado para minimizar a degradação tecidual e manter um ambiente úmido durante o transporte. Algumas amostras coletadas em campo foram imediatamente imersas em nitrogênio líquido ao invés de gelo para transporte ao laboratório.

### 5.3.

#### **Experimento laboratorial de exposição de adultos de *Tilapia rendalli* a quantidade sub-letal de cobre**

No geral, experimentos de exposição laboratorial de organismos a substâncias tóxicas variam de 24 a 96 horas. Estes testes são frequentemente conduzidos utilizando-se o sistema estático, sem renovação de água no decorrer do experimento, pois é mais simples e menos dispendioso quando comparado aos sistemas semi-estático (renovação parcial) ou ao sistema de fluxo contínuo (renovação contínua). O sistema estático é especialmente recomendado quando a substância-teste estudada é comprovadamente estável no ambiente, como o cobre e outros metais (Rand e Petrocelli, 1985).

Tanques de 500 L contendo água desclorificada e com pH em torno de 7,0 foram montados, e cobre, na forma de sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) foi

dissolvido à água, com concentração final do íon cobre de  $2 \text{ mg L}^{-1}$ . Este valor foi escolhido por ser o nível máximo deste elemento verificado em áreas contaminadas da região do Rio de Janeiro onde esta espécie é encontrada (Inea, 2011).

Os animais foram transportados em caixas de transporte com água potável saturada de oxigênio para o laboratório. Os peixes foram aclimatados durante 30 min e então transferidos para os tanques. O experimento realizado foi estático, sem renovação de água, e aeração e filtração constantes, com duração de 96 horas (5 dias). Esta duração foi baseada em experimentos prévios na literatura que indicam que este período é o suficiente para que ocorram modificações proteicas em fígados e outros órgãos de peixes. A alimentação dos animais foi suspensa durante o experimento, para que a bÍlis ficasse mais concentrada, pois peixes que se alimentam recentemente diluem a bÍlis com água, o que leva à baixa concentração de proteínas na mesma. Após as 96 horas, os peixes foram sacrificados por rompimento da coluna vertebral. A bÍlis e o fígado destes animais foram removidos imediatamente e armazenados a  $-80^\circ \text{ C}$  até análise.

#### **5.4. Processamento das amostras**

Ao chegar ao laboratório, os peixes foram sexados quando possível, individualmente medidos, pesados e imediatamente processados.

O fígado e bÍlis foram removidos de cada um dos organismos. O fígado foi pesado e armazenado logo a seguir. As amostras de bÍlis foram retiradas das vesículas biliares dos peixes utilizando seringas de 3,0 mL. Sua cor e volume foram anotados. Todas as amostras foram imediatamente armazenadas a  $-80^\circ \text{ C}$  (Ultra Freezer CL 120 80 V, Coldlab, SP) em frascos eppendorfs e tubos de polipropileno (Sarsted, Alemanha) estéreis até análise.

Foi criada uma escala de cor para as bÍlis coletadas, onde é possível inferir pela coloração visualizada qual o *status* alimentar aproximado do peixe (ou seja, há aproximadamente quanto tempo o peixe está sem se alimentar). BÍlis de cor mais clara indicam que o peixe se alimentou recentemente, pois ocorreu a diluição da bÍlis dentro da vesícula biliar pela entrada de água durante a alimentação do indivíduo, enquanto a bÍlis mais escura indica maior concentração desta matriz na

vesícula biliar, sugerindo que o indivíduo está há mais tempo sem se alimentar. (fig. 6).



Figura 2. Escala de cor das amostras de bÍlis coletadas ao longo deste trabalho. As bÍlis mais claras indicam que o peixe se alimentou recentemente, enquanto as bÍlis mais escuras indicam que o peixe estÁ sem se alimentar por algum tempo.

### 5.5.

#### **Preparo e anÁlise das amostras para anÁlise de elementos traço por ICP-MS**

As amostras de bÍlis foram descongeladas e 100  $\mu$ L foram imediatamente transferidos para tubos de polipropileno estÁreis. 0,5 mL de HNO<sub>3</sub> (Merck, Alemanha) foram adicionados e os tubos foram deixados em repouso por 12 horas. A digestão ácida foi realizada em banho-maria a 100° C por aproximadamente 2 horas. Após chegarem à temperatura ambiente 200  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram adicionados às amostras, que foram entÁo colocadas em banho-maria a 100° C por mais 2 horas. Após a digestão as amostras foram avolumadas em seus respectivos tubos de polipropileno até 10 mL. As amostras de fÍgado foram preparadas para anÁlise da mesma maneira, pesando-se 1,0 g de cada tecido e

aumentando os volumes de  $\text{HNO}_3$  (3 mL) e  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1 mL) A diluição final foi para 50 mL.

Os elementos cromo (Cr), manganês (Mn), zinco (Zn), chumbo (Pb), níquel (Ni), cobre (Cu) e cádmio (Cd) foram determinados, em triplicata, por ICP-MS, através da média de 5 leituras para cada amostra (Modelo 7500X, Agilent, Japão), após calibração externa com soluções de calibração multielementares obtidas pelas diluições apropriadas de uma solução padrão (Merck IV). Para compensar as interferências de matriz ítrio (Y) foi utilizado como padrão interno. A precisão do procedimento analítico foi verificada utilizando-se brancos das amostras e pela análise em paralelo de material de referência certificado comercial (DORM-2, músculo de peixe-cachorro - dogfish muscle tissue, e DOLT-3, fígado de peixe-cachorro - dogfish liver; National Research Council of Canada), em triplicata. Não existe material de referência certificado de bÍlis de peixe.

## 5.6.

### **Preparo e análise das amostras de metalotioneínas extraídas de bÍlis**

As metalotioneínas foram extraídas da bÍlis dos peixes analisados de acordo com o procedimento de extração térmica de Erk e colaboradores (Erk, Ivankovi *et al.*, 2002), sem a necessidade de *clean-up* prévio. As amostras de bÍlis foram descongeladas e homogeneizadas na proporção de 3:1 em uma solução contendo Tris-HCl 20 mMol  $\text{L}^{-1}$  pH 8,6, PMFS 0,5 mMol  $\text{L}^{-1}$  e  $\beta$ -mercaptoetanol 0,01%. As amostras foram então centrifugadas a 20000 x g por 1 h a 4 °C. Os sobrenadantes foram cuidadosamente removidos, transferidos para outros microtubos identificados e então aquecidos a 70 °C por 10 min. Uma nova centrifugação foi realizada a 20.000 x g por 30 min a 4 °C e os sobrendantes finais contendo as metalotioneínas foram transferidos para outros microtubos e congelados a – 80 °C até análise.

A quantificação do conteúdo de proteína total foi realizada pelo método de Lowry modificado por Peterson (descrito mais à frente), utilizando Albumina Bovina Sérica (BSA - Bovine Serum Albumin) como padrão.

A quantificação de metalotioneína foi realizada por dois métodos:

a) Método espectrofotométrico utilizando a reação de Ellman. As amostras

contendo as metalotioneínas provenientes da extração térmica foram tratados com HCl 1 mol L<sup>-1</sup> contendo EDTA 4 mMol L<sup>-1</sup> e NaCl 2 mol L<sup>-1</sup> contendo 0,43 mM de DTNB tamponado com 0,2 mol L<sup>-1</sup> de fosfato de sódio, pH 8 e então centrifugados à 3000 x g por 5 min. O sobrenadante teve então sua absorvância medida em 412 nm em um leitor de microplacas (VICTOR R<sup>3</sup>, Perkin Elmer) e a concentração de MT foi estimada utilizando uma curva analítica plotada com GSH (glutathiona reduzida), pois, embora este método mensure todos os tióis ácidos solúveis, a glutathiona representa mais de 90 % dos grupos tióis reativos, sendo considerado um padrão adequado. Os níveis de MT foram estimados assumindo a relação de 1 mol MT = 20 mol GSH para peixes (Kagi, 1991).

b) Densitometria em géis unidimensionais de eletroforese, onde foram pipetadas massas crescentes de BSA nos poços (*lanes*) dos géis, utilizadas como curva analítica. As bandas de interesse (metalotioneínas) foram quantificadas contando o número de pixels em software de imagem (Adobe Photoshop®) e plotando na curva analítica.

Foram testados dois tipos de separação unidimensional: em géis SDS-PAGE de 15%, seguindo o protocolo de Laemmli (Laemmli, 1970), e em géis 16.5% seguindo o protocolo de Schagger e Von Jagow (1987), que utiliza tricina ao invés de glicina como íon carreador para separar proteínas muito pequenas (< 10 kDa) com maior eficiência. Os géis foram corados com Coomassie Blue G-250 e por prata, de acordo com o protocolo de Heukeshoven and Dernick (Heukeshoven e Dernick, 1985). Três replicatas de cada amostra foram feitas, para assegurar a reprodutibilidade do método. Os pesos moleculares das bandas protéicas foram determinadas utilizando os padrões de peso molecular Precision Plus Protein<sup>TM</sup> Dual Color da Biorad. Os géis foram scaneados utilizando um scanner ImageScanner II (GE Healthcare, Uppsala, Suécia) com o densitômetro operando em uma resolução de 300 dpi. O programa Image-Master 2D Platinum 6.0 (GeneBio, Geneva, Suíça) foi utilizado para as análises de imagem dos géis.

As amostras de MTs foram analisadas também por géis bidimensionais, usando tanto o método de Laemmli (géis 15 % usando tris-glicina) quanto o método de Schagger e Von Jagow (géis 16,5 % usando tris-tricina).

Também foram feitas análises de amostras de MT em LC-ICP-MS: Após a extração térmica as amostras foram injetadas em um LC-ICP-MS (Modelo 7500X, Agilent, Japão) com bomba quaternária, degaseificador e injetor manual

com *loop* de 50  $\mu\text{L}$ . A separação foi feita usando uma coluna de exclusão por tamanho (SEC – size exclusion chromatography) Superdex 75 - GE Healthcare<sup>®</sup>. A vazão foi mantida em 0,70 mL  $\text{min}^{-1}$  e a fase móvel usada foi 0,02 mol  $\text{L}^{-1}$  Tris-HCl pH 7,4. Foram injetadas aproximadamente 500  $\mu\text{g}$  de MT por amostra. As amostras foram injetadas diretamente e os seguintes elementos foram monitorados online:  $^{113}\text{Cd}$ ,  $^{64}\text{Zn}$ ,  $^{202}\text{Pb}$ ,  $^{63}\text{Cu}$  e  $^{208}\text{Hg}$ . Infelizmente não foi possível a análise de padrões de MT neste estudo.

Para fins de comparação também foram preparadas amostras de MT de fígados do local de referência e fígados dos indivíduos de *T. rendalli* expostos ao cobre em experimento laboratorial, da mesma maneira que descrito para a bÍlis.

## 5.7.

### Preparo das amostras de bÍlis para eletroforese 1D e 2D (*Clean-up*)

A proposta inicial do trabalho seria realizar eletroforeses e zimografias utilizando a bÍlis bruta (removida diretamente do peixe sem nenhum tipo de tratamento de limpeza prévia), para evitar ao máximo alterações da amostra com passos de *clean-up*. Porém, as primeiras tentativas de realizar eletroforeses com amostras brutas não tiveram sucesso, já que a matriz estudada contém grandes quantidades de lipídios, ácidos nucléicos e sais biliares, interferindo tanto na quantificação de proteínas quanto nas análises pelos géis. Portanto, sete diferentes protocolos de *clean-up* foram testados, com base em estudos realizados com bÍlis humana (Kristiansen, Bunkenborg *et al.*, 2004; Farina, Dumonceau *et al.*, 2009).

#### 5.7.1.

##### Protocolo 1 – Sonicação seguida de centrifugação

1 mL de bÍlis bruta foi sonicada por 5 minutos e centrifugada a 16.000 x g por 15 minutos a 4 °C, em uma centrífuga para microtubos refrigerada (Modelo Mikro 220R Hettich, Alemanha). O sobrenadante foi então transferido para um novo tubo e armazenado a -80° C até análise.

### 5.7.2.

#### Protocolo 2 – Deslipidificação

Alíquotas de 125  $\mu\text{L}$  de bÍlis bruta foram pipetadas em microtubos de fundo cônico, sonicadas por 5 minutos e centrifugada a 16.000 x g por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante parcialmente purificado foi então transferido para um novo eppendorff. 31,25  $\mu\text{L}$  de Cleanascite™ HC (Ligo-Chem, Inc., Fairfield, NJ), um adsorvente não-iônico utilizado para precipitação de lipídios, gotículas de gordura e detritos celulares foi adicionado à amostra, que foi então submetida a agitação mecânica por 1 hora a 4 °C. Uma centrifugação a 16.000 xg por 2 min foi realizada para remover as micelas de lipídeos e o sobrenadante foi então transferido para um novo tubo e armazenado a -80 °C até análise.

### 5.7.3.

#### Protocolo 3 – Precipitação proteica por acetoneitrila e etanol

Esta precipitação seguiu o protocolo de Osnes e colaboradores (Osnes, Sandstad *et al.*, 1993), onde acetoneitrila grau HPLC (J.T. Baker) foi adicionada a 40  $\mu\text{L}$  de amostra bruta, em 3 passos:  $\frac{1}{2}$ ,  $\frac{1}{2}$  e 3 x o volume da amostra (ou seja, 20  $\mu\text{L}$ , 20  $\mu\text{L}$  e 120  $\mu\text{L}$ ). Após as primeiras duas adições de acetoneitrila, a amostra foi submetida a agitação mecânica por 60 segundos e centrifugada a 1000 x g a 4 °C por 5 minutos. Após a terceira adição, a amostra foi centrifugada por 15 minutos nas mesmas condições. Os sobrenadantes foram então descartados e 120  $\mu\text{L}$  de etanol 96 % (v/v) foram adicionados às amostras. Uma nova centrifugação foi realizada por 15 minutos e, finalmente, os sobrenadantes foram descartados. As amostras foram então evaporadas e o precipitado foi então ressuspenso, inicialmente, em três tampões diferentes, para avaliação de qual seria o melhor a ser utilizado:

- 120  $\mu\text{L}$  1,0 mMol L<sup>-1</sup> de tampão de fosfato de sódio, pH 8.
- 120  $\mu\text{L}$  1,0 mMol L<sup>-1</sup> de tampão de borato tetrahidratado, pH 11.
- 120  $\mu\text{L}$  1,0 mMol L<sup>-1</sup> de tampão de solubilização de eletroforese.

#### **5.7.4.**

#### **Protocolo 4 – Depleção de albumina e imunoglobulina G (IgG)**

Como a albumina e a imunoglobulina G estão presentes em altas quantidades em diversos fluidos biológicos e são considerados grandes interferentes em análises proteômicas, foi decidido testar os efeitos de sua depleção. Foram usadas colunas específicas de depleção destas duas proteínas da bÍlis bruta, com recheio de Sepharose, da GE Healthcare®.

#### **5.7.5.**

#### **Protocolo 5 – Dessalinização por diálise**

Neste protocolo foi utilizada uma membrana de diálise Spectra-Por® com um corte de 3.5 kDa. A diálise foi realizada com água ultra-pura na bÍlis bruta, por um período mínimo de 24 hs, com diversas trocas de água ao longo deste período.

#### **5.7.6.**

#### **Protocolo 6 – Dessalinização por gel-filtração**

Neste caso, primeiramente foi feita a dessalinização da bÍlis bruta por gel-filtração em colunas com recheio Sephadex G-25 (GE Healthcare®) com um corte de 5 kDa. Ao longo do trabalho, verificou-se a possibilidade de utilizar também os concentradores Vivaspin (Sartorius, Reino Unido), com um corte de 5 kDa, que são produtos mais baratos e que dessalinizam e concentram as amostras ao mesmo tempo, evitando posteriores etapas de liofilização.

#### **5.7.7.**

#### **Combinações de protocolos de *Clean-up***

Alguns destes protocolos de *clean-up* foram combinados para verificação de eficiência quali- e quantitativa.

A figura 7 mostra todo o esquema de trabalho destas etapas de *clean-up*.

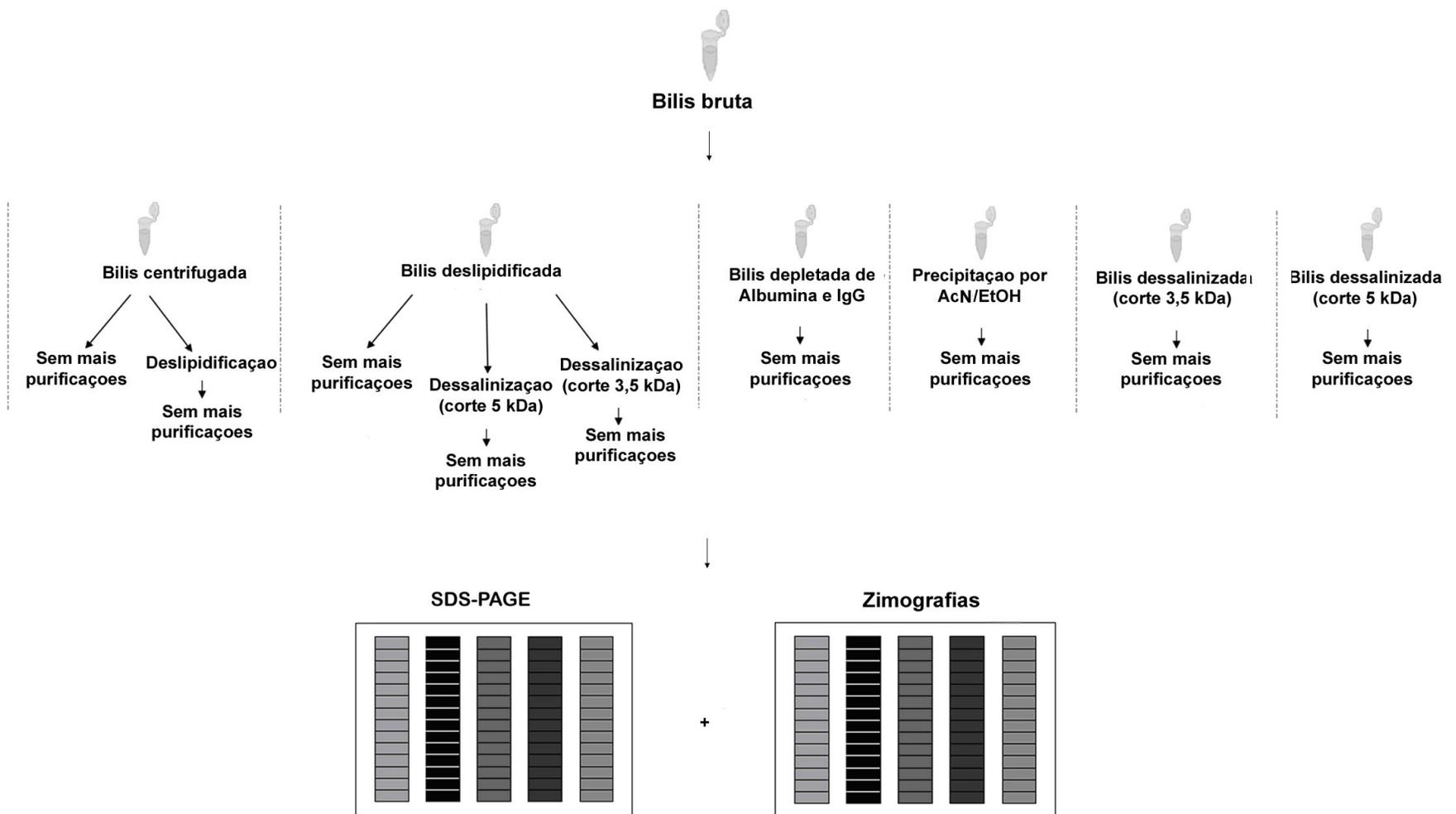


Figura 3. Esquema dos procedimentos de *clean-up* das amostras de bÍlis de peixe.

## 5.8

### Determinação de proteínas totais em bílis de peixe

Interferentes presentes na bílis também resultam em dificuldades de quantificação protéica (Osnes, Sandstad *et al.*, 1993). Portanto, três diferentes métodos de quantificação protéica foram testados, tanto em amostras brutas quanto em amostras purificadas.

#### 5.8.1.

##### Método de Bradford

Este método consiste na determinação de proteínas totais utilizando o corante Coomassie Brilliant Blue G-250. Ele é baseado na interação entre este corante e proteínas com cadeias laterais básicas ou aromáticas. No pH da reação, a interação entre as proteínas de alto peso molecular e o corante desloca o equilíbrio do corante para sua forma aniônica, que absorve em 595 nm (Compton e Jones, 1985).

A curva analítica foi preparada em tubos de ensaio com sucessivas diluições de uma solução de albumina bovina sérica (BSA - Bovine Serum Albumin, Sigma-Aldrich), em uma faixa de 0 a 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

As amostras foram diluídas 100 vezes com água ultra-pura. Em cada tubo (amostras e padrões) foram adicionados 1 mL do reagente de Bradford. Os tubos foram agitados manualmente rapidamente e deixados em descanso por 15 min no escuro e então foi feita a leitura das amostras e da curva analítica em 595 nm, em leitor de microplacas (VICTOR R<sup>3</sup>, Perkin Elmer).

#### 5.8.2.

##### Método de Lowry modificado por Peterson

Este método de dosagem protéica é baseado no procedimento de Petterson (Peterson, 1977), otimizado para microdosagem.

Baseia-se na interação das proteínas com o reagente fenol e cobre em condições alcalinas. A reação colorimétrica envolve uma oxidação, na presença de cobre, e aminoácidos aromáticos por um reagente heteropolifosfato

(fosfotungístico-fosfomolibídico), desenvolvendo uma cor azul que é medida em um colorímetro e comparada com uma curva padrão.

Foi preparada uma solução de sulfato de cobre 0,1 %, tartarato de sódio e potássio 0,2 % e carbonato de sódio 10 % e uma solução de NaOH e SDS, que são misturadas, resultando no “Reativo A”. O “Reativo B”, por sua vez, é uma solução de Follin-Ciocalteau (Sigma-Aldrich) diluída 5x com água ultra-pura.

A curva analítica foi preparada em tubos de ensaio com sucessivas diluições de uma solução de albumina bovina sérica (BSA - Bovine Serum Albumin, Sigma-Aldrich), em uma faixa de 0 a 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Em cada tubo (amostras e padrões) foram adicionados 400  $\mu\text{L}$  do “reativo A”. Os tubos foram agitados manualmente rapidamente e deixados em descanso por 10 min. Adicionou-se então 200  $\mu\text{L}$  do reativo B, agitando novamente. Os tubos foram então deixados descansando por 30 minutos e então foi feita a leitura das amostras e da curva analítica em 750 nm, em leitor de microplacas (VICTOR R<sup>3</sup>, Perkin Elmer).

### **5.8.3. Método utilizando o 2D Quant-Kit (GE Healthcare®)**

O kit comercial 2-D Quant Kit precipita quantitativamente apenas as proteínas das amostras, deixando os interferentes em solução. É baseado na ligação específica de íons de cobre às proteínas. As proteínas precipitadas são ressuspensas em uma solução contendo cobre, e o cobre livre é então quantificado utilizando um agente colorimétrico. A absorvância em 480 nm é inversamente proporcional à concentração de proteínas na solução. O ensaio é linear na faixa de 0 a 50  $\mu\text{g}$  e o volume recomendado de amostra é de 1 a 50  $\mu\text{L}$ .

A curva analítica foi preparada em eppendorfs com sucessivas diluições de uma solução de albumina bovina sérica (BSA - Bovine Serum Albumin, Sigma-Aldrich), em uma faixa de 0 a 50  $\mu\text{g/mL}$ .

Em cada tubo (amostras e padrões) foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  do “agente precipitante”. Os eppendorfs foram agitados em vortex rapidamente e incubados em temperatura ambiente por 2 minutos. Adicionou-se então 500  $\mu\text{L}$  do agente co-precipitante, agitando em vortex novamente. Os eppendorfs foram então centrifugados a 10.000 x g e o sobrenadante descartado. Foi adicionado então 100

$\mu\text{L}$  da solução de cobre e 400  $\mu\text{L}$  de água ultra-pura. Os eppendorfs foram novamente agitados em vortex e então foi adicionado 1 mL de reagente de cor a cada eppendorf. Após 20 minutos, foi feita a medida das amostras e da curva analítica em 480 nm, em leitor de microplacas (VICTOR R<sup>3</sup>, Perkin Elmer).

## 5.9. Eletroforese 1D e 2D de amostras de bÍlis de peixe

Para as corridas 1D as amostras limpas e dosadas de bÍlis de tainhas e tilÁpÍas foram homogeneizadas na proporção de 1:1 com o tampão de amostra composto de 10 % SDS (p/v),  $\beta$ -mercaptoetanol 10 mMol L<sup>-1</sup>, 10 % glicerol (v/v), 0,2 mol L<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH 6,8) e 0,05 % azul de bromofenol (p/v), fervidas por 5 minutos e então aplicadas em géis de 12,5 % e 15 %. Para géis grandes as corridas consistiram em uma etapa de 15 min a 15 mA /gel e depois 45 mA por 3 horas ou até a banda azul indicativa da posição das amostras no gel chegar a aproximadamente 1 mm do final do gel, e para géis pequenos as corridas consistiram em uma etapa de 15 min a 10 mA/gel e depois a 35 mA até o final da corrida.

Para as corridas 2D, amostras individuais de bÍlis, após o *clean-up*, foram solubilizadas em tampão de reidratação contendo uréia 8 mMol L<sup>-1</sup>, 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 (Reswelling Tray), em fitas de focalização isoeletrica Immobiline Dry Strips (13 cm) (GE Healthcare®) por 10-20 h. Para as primeiras visualizações das amostras foram usadas fitas de faixa de pH 3-10, e, se necessário, posteriormente, fitas de pH 4-7, para obter maior resolução nas faixas onde se encontram a maior abundância de proteínas. A focalização isoeletrica foi realizada em equipamento Ettan IPGPhor 3 (GE Healthcare®). O programa de focalização utilizado foi o recomendado pela GE Healthcare® para fitas de (a) 13 cm (Géis grandes) e (b) 7 cm (géis pequenos) (Amersham-Biosciences, 2004):

a) Para fitas de 13 cm (pH 3-10):

Passo 1: 300 V por 30 min (passo extra para remover quaisquer sais ainda presentes na amostra)

Passo 2: 500 V por 1:00 h

Passo 3: subida de 500 V até 1000 V por 1:00 h em gradiente linear

Passo 4: subida de 1000 V até 8000 V por 2h30min em gradiente linear

Passo 5: 8000 V por 30min

O total de Vhs para cada corrida usando estas fitas foi de 16650 Vhs.

b) para fitas de 7 cm (pH 3-10):

Passo 1: 300 V por 30 min (passo extra para remover quaisquer sais ainda presentes na amostra)

Passo 2: subida para 100 V por 30 min em gradiente linear

Passo 3: subida de 1000 V até 5000 V por 1:00 h em gradiente linear

Passo 4: 5000 V por 25 min

O total de Vhs para cada corrida usando estas fitas foi de 6500 Vhs.

Após a focalização isoelétrica, as fitas eram incubadas sob agitação branda em tampão de equilíbrio (Uréia 6 mol L<sup>-1</sup>, glicerol 30% (v/v), SDS 2% (p/v) e Tris-HCl 0,05 mol L<sup>-1</sup>, 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 solução de agarose (25 mMol L<sup>-1</sup> Tris base, 192 mMol L<sup>-1</sup> glicina, 0,1% SDS, 0,5% agarose, 0,002% azul de bromofenol) 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 10 mA/gel por 15 minutos, para migração lenta e, portanto, mais eficiente, das proteínas da fita para o gel, e então uma segunda etapa de 45 mA/gel por aproximadamente 3 h ou até o marcador azul chegar a 1 mm do final do gel. Padrões de peso molecular coloridos Precision Plus Protein™ Dual Color (Biorad) foram usados para estimativas de peso molecular.

### 5.9.1.

#### **Coloração e revelação dos géis com Coomassie Blue G-250 e Nitrato de prata**

Para a coloração com Coomassie Blue G-250, após a corrida eletroforética, os géis foram fixados por pelo menos 30 minutos em solução fixadora (10% ácido acético, 40% etanol). Após a fixação, os géis eram 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, seguindo o protocolo de Neuhoff e colaboradores (Neuhoff, Arold *et al.*, 1988).

Os géis revelados com nitrato de prata seguiram o protocolo de Heukeshoven e Dernick (1985), onde os géis são primeiro fixados com ácido acético/etanol, sensibilizados em uma solução de tiosulfato de sódio e etanol, lavados em água ultra-pura, reagidos com nitrato de prata, lavados novamente e então revelados em uma solução de carbonato de sódio/formaldeído. A reação de revelação é então interrompida com EDTA e os géis são então preservados em etanol/glicerol para posterior análise de imagem e espectrometria de massa.

### 5.9.2.

#### **Escaneamento e análise dos géis**

Os géis foram escaneados utilizando-se o programa LabScan v.3.0 (GE Healthcare®) em scanner ImageScanner II com o densitômetro operando em uma resolução de 300 dpi. O software Image-Master 2D Platinum 6.0 (GeneBio, Genebra, Suíça) foi utilizado para análises dos géis.

No caso dos géis 2D, a análise foi feita por uma combinação de detecção automática dos “spots”, feita pelo software, e detecção manual. Para a determinação da quantidade relativa de cada mancha foi usado o método de normalização do volume. Neste método, o volume de cada *spot* é dividido pelo somatório dos volumes de todos os *spots* detectados no gel e a sua porcentagem em relação ao conjunto total de *spots* corados é calculada.

### 5.10.

#### **Processamento dos spots proteicos para análise por espectrometria de massa**

A digestão dos spots proteicos foi feita baseada no método de Havlis e colaboradores (Havlis, Thomas *et al.*, 2003). Os spots foram selecionados, cortados dos géis com auxílio de uma ponteira de micropipeta e cortados em pedaços menores, de 1 mm<sup>2</sup>. Cada spot foi então transferido para eppendorfs de 500 µL, previamente lavados duas vezes com metanol e água ultra-pura. Nos géis corados com nitrato de prata, há necessidade de prévia descoloração dos spots retirados dos géis. As proteínas foram deixadas no gelo, por 60 min, em solução de bicarbonato de amônio 50 mMol L<sup>-1</sup> contendo 33 ng de tripsina grau sequenciamento modificada (Promega, WI, EUA). As proteínas foram então incubadas a 58° C por 30 min. 1 µL de ácido fórmico a 5% (v/v) foi utilizado para parar a reação. Os peptídeos foram então extraídos do gel com 30 µL com uma solução de ácido fórmico a 5% (v/v)/acetonitrila 50 % e agitados em vortex por 40 segundos. Após a extração, os peptídeos foram transferidos para novos eppendorfs e armazenados a -80° C até análise.

### 5.11.

#### **Análise por MALDI-ToF**

A mistura de peptídeos resultante da digestão trípica foi misturada com 1:1,5 com uma solução saturada de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico em acetonitrila 50 %/Ácido trifluoracético 0,2 %. 1 µL dessa mistura foi então pipetada na placa de MALDI e seco a temperatura ambiente. O método de aquisição utilizado no MALDI-ToF foi o modo de detecção tipo refletor para íons com polaridade positiva. Foram dados tiros de laser sucessivos em diferentes locais da placa contendo as amostras para obter intensidade de sinal adequada. Também foi realizada a digestão trípica do padrão de BSA para verificar a eficiência da digestão. Para calibração do equipamento foram utilizados os seguintes padrões de peptídeos, em uma mistura a 4 pmol L<sup>-1</sup>:

- Angiotensina I
- Somatostatina
- ACTH (clip 1-17)
- ACTH (clip 18-39)
- Angiotensina II
- Bombesina

## **5.12.**

### **Pesquisa bioinformática**

As massas monoisotópicas de cada peptídeo analisado por MALDI-ToF foram obtidas e então inseridas no programa online MASCOT ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)), que permite a identificação de proteínas através de seus mapas peptídicos (PMF – Peptide Mass Fingerprinting).

## **5.13.**

### **Zimografias**

Após otimização da porcentagem dos géis, géis de poliacrilamida de 12,5%, contendo 0,1 % de gelatina 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 mol L<sup>-1</sup>, SDS 10 % e Azul de Bromofenol 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 com água ultra-pura e incubados overnight a 37 °C em um tampão contendo Tris pH 7,4 50 mMol L<sup>-1</sup>, CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 5 mMol L<sup>-1</sup> e ZnCl<sub>2</sub> 1 μMol L<sup>-1</sup>. Após a incubação os géis foram corados com Coomassie Blue G-250 e descorados em solução 30% metanol, 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.

Os efeitos de diferentes inibidores enzimáticos também foram estudados. Para caracterização das proteases, os efeitos de 4 moduladores enzimáticos foram

estudados: EDTA ( $20 \text{ mMol L}^{-1}$ ), 1,10 fenantrolina ( $10 \text{ mMol L}^{-1}$ ), E-64 ( $20 \text{ }\mu\text{Mol L}^{-1}$ ) e PMSF ( $10 \text{ mMol L}^{-1}$ ), testados de acordo com estudos anteriores (Troberg e Nagase, 2003), incluindo estes inibidores nos dois tampões ao longo do processo de zimografia. Foram utilizadas pelo menos 5 amostras independentes de bÍlis para cada espécie.

#### **5.14. Análises estatísticas**

Para a análise estatística referente aos dados de elementos-traço em fÍgado e bÍlis, a normalidade dos dados foi testada utilizando o teste W de Shapiro-Wilkes. Após a verificação da distribuição não-normal dos dados, testes não-paramétricos foram utilizados. O teste de correlação de Spearman foi aplicado para verificar a existência de correlações entre as concentrações de elementos-traço no fÍgado e na bÍlis e o comprimento dos peixes, e também entre as concentrações de elementos-traço do fÍgado e da bÍlis. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Statistica 7 (StatSoft) para Windows. Um método independente, a técnica de Redes Neurais Artificiais (Artificial Neural Networks – ANN), foi utilizado para verificar se as concentrações de elementos-traço em bÍlis poderiam ser utilizadas ao invés das concentrações do fÍgado. Esta análise estatística foi realizada em parceria com a Faculdade de Estatística e Faculdade de Ciências da Computação da Universidade Federal do Pará (UFPA).

Para as análises estatísticas referentes à dosagem de proteínas para os diferentes protocolos de *clean-up* das amostras de bÍlis e quantificação de metalotioneínas, a normalidade dos dados também foi testada utilizando o teste W de Shapiro-Wilkes. Foi conduzido o teste de ANOVA, e as diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .