

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO**

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA METALOTIONEÍNA EM DUAS ESPÉCIES DE
PEIXES, *Oreochromis niloticus* E *Prochilodus lineatus***

Thaissa de Melo Galante Coimbra

**SÃO CARLOS
2008**

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA METALOTIONEÍNA EM DUAS ESPÉCIES DE
PEIXES, *Oreochromis niloticus* E *Prochilodus lineatus***

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO**

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA METALOTIONEÍNA EM DUAS ESPÉCIES DE
PEIXES, *Oreochromis niloticus* E *Prochilodus lineatus***

Thaissa de Melo Galante Coimbra

**Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Genética
e Evolução da Universidade Federal de São
Carlos, como parte dos requisitos para
obtenção do Título de Mestre em Genética
e Evolução.**

**Orientadora: Heloísa Sobreiro
Selistre de Araújo.**

**SÃO CARLOS
2008**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

C679ae

Coimbra, Thaisa de Melo Galante.

Análise da expressão da metalotioneína em duas espécies de peixes, *Oreochromis niloticus* e *Prochilodus lineatus* / Thaisa de Melo Galante Coimbra. -- São Carlos : UFSCar, 2008.
76.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2008.

1. Genética. 2. Peixes. 3. Metalotioneína. 4. Expressão gênica. 5. Metais. 6. Zinco. I. Título.

CDD: 575.1 (20^a)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA METALOTIONEÍNA EM DUAS
ESPÉCIES DE PEIXES, *Oreochromis niloticus* E *Prochilodus
lineatus***

Dissertação de Mestrado de Thaissa de Melo Galante Coimbra

Banca Examinadora

Profa. Dra. Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo

Profa. Dra. Maria Célia Bertolini

Profa. Dra. Marisa Narciso Fernandes

.....
.....
.....

Dedico este trabalho ao meu marido, Ricardo
a meus pais, Vânia e Paulo
a minha avó Telma e tia Raquel
pelo apoio e torcida durante os momentos difíceis.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela vida e chance de chegar até aqui.

Agradeço grandemente ao meu dedicado marido, Ricardo, pelo total apoio e incentivo nos caminhos que escolhi traçar. Que com todo o seu amor e carinho se manteve ao meu lado sempre.

Agradeço aos meus pais, Vânia e Paulo, e aos meus irmãos, Raphael e Leandro, pelo respeito, e compreensão quanto aos passos que resolvi trilhar. Sobretudo, agradeço as palavras de incentivo de minha mãe, que não me deixaram desistir em momentos difíceis.

Agradeço à minha avó, Telma e a minha tia, Raquel pelo apoio incondicional e amor dedicado que tanto foram importantes para alcançar qualquer objetivo.

Agradeço aos amigos do peito, Vivian, Ricieri, Eliel, Alex, Gustavo, Elisandra e Marina, pelo apoio moral e deliciosos churrascos. Também por estarem ao meu lado incondicionalmente, como amigos verdadeiros.

Agradeço ainda aos queridos amigos D. Marta, S. Espedito, D. Ede e S. Alcides por toda a ajuda e torcida que tiveram por mim.

Agradeço às amigas que fiz aqui em São Carlos, companheiras da labuta diária do Laboratório, Carmen Lúcia, Milena e Rita de Cássia, pelos momentos de distração e superação durante o desenvolvimento do Mestrado.

Agradeço aos importantes amigos que conquistei no laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular, Beth, Márcia, Raquel, Mônica, Cláudio, Zé Roberto, Carol Martins, Aline, Rafael, Juliana, Kelly, Uliana, André, Ana, Sabrina e Gisele, por toda a ajuda, incentivo e força em momentos bons e também nos estressantes!

Agradeço a Cléo e a Débora, com quem eu pude contar para dar início ao meu trabalho com metalotioneína.

Agradeço à Regiane e à Greissi, secretárias do programa do PPG-GEV pela paciência e diversas ajudas nos assuntos burocráticos.

Agradeço a colaboração da Profa. Dra. Marisa Narciso Fernandes, do Laboratório de Zoologia e Bioquímica Comparativa, por acreditar neste trabalho.

Agradeço ao Departamento de Tecnologia de Informação da Empresa SAS Brasil, que tão gentilmente me cedeu o computador para elaboração desta tese.

Agradeço à CAPES, pela concessão da bolsa e à Fapesp, pelo financiamento do projeto.

Agradeço em especial à minha orientadora, Profa. Dra. Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo, pela confiança, apoio e orientação. Agradeço a oportunidade de realizar este trabalho.

Por fim, agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste Mestrado.

Muito obrigada!

"Há pessoas que transformam o Sol numa simples mancha amarela
mas há aquelas que fazem de uma simples mancha amarela o próprio Sol"

Pablo Picasso

RESUMO

A metalotioneína (MT) é uma proteína não enzimática, com a propriedade de ligação a metais. Ela é usada como bioindicador de poluição de ambientes expostos a metais através da avaliação de sua expressão em diferentes espécies de peixes. A tilápia é um modelo animal comumente utilizado em estudos toxicológicos e algumas de suas espécies têm a seqüência de MT conhecida. Neste trabalho foi utilizada a espécie *Oreochromis niloticus* na padronização dos ensaios de expressão dessa molécula. Já a espécie *Prochilodus lineatus* é amplamente distribuída nas Bacias Brasileiras e tem sido estudada quanto ao acúmulo, mortalidade e toxicidade frente a metais, porém nada se sabia sobre a estrutura gênica da metalotioneína destes peixes. Com o objetivo de avaliar a seqüência gênica da metalotioneína em *O. niloticus* e em *P. lineatus*, indivíduos destas espécies receberam injeções intraperitoneais de cloreto de zinco, em doses crescentes de 1 a 8 mg/Kg, durante 4 dias. Através de ensaios de amplificação gênica foi possível obter as seqüências da MT de ambas as espécies. Por PCR em tempo real também se pôde avaliar um aumento da expressão do RNA mensageiro da metalotioneína de até 4 vezes para *O. niloticus* e cerca de 35 vezes para *P. lineatus*, quando comparados a indivíduos não expostos a metais. A diferença da expressão foi estatisticamente significativa nos experimentos com as duas espécies. Os resultados permitem considerar a alta conservação da estrutura gênica da metalotioneína importante para estudos com espécies diferentes, permitindo a sua utilização para estudos ambientais, além de confirmar a análise da expressão gênica dessa molécula como boa ferramenta nos estudos de monitoramento de poluição de ambientes aquáticos.

Palavras-chave: Metalotioneína, expressão gênica, *Oreochromis niloticus*, *Prochilodus lineatus*, metais, zinco.

ABSTRACT

Metallothioneins (MT) are non enzymatic proteins with with metal-binding ability. It has been used as a biomarker for environmental pollution by the analysis of its expression in several fish species. The *tilapia* is a commonly used model in studies of animal toxicology and some of these species have a well characterized MT sequence. Here, the *Oreochromis niloticus* specie was used in the standardization of the MT expression assay. The *Prochilodus lineatus* species is widely distributed in the Brazilian's Basins that has been studied regarding growth, illness and the toxicity of metals. However the MT DNA sequence from this species has not been described. The aim of this project was the analysis of the MT DNA in both species, *O. niloticus* and *P. lineatus*. For that, individuals from these species received intraperitoneal injections of zinc chloride, in increasing doses of 1 to 8 mg/kg for 4 days.. After this time, animals were killed and total RNA was isolated from the liver and used in an RT-PCR with primers designed accordingly to MT coding regions of fish MT deposited at www.ncbi.nlm.nih.gov. DNA sequencing confirmed the highly conserved MT sequence for both species. For quantitative analysis, cDNA was used in a similar real-time PCR with the same primers plus the fluorophore Syber Green. The $ZnCl_2$ treatment increased MT mRNA expression about 4 times for *O. niloticus* and almost 35 times for *P. lineatus* when compared with subjects that were not exposed to the metal. This difference was statistically significant in the experiments for both species. The results indicate the high conservation of the MT gene structure, that allow the use of MT in environmental research..

Keywords: Metallothionein, gene expression, *Oreochromis niloticus*, *Prochilodus lineatus*, metals, zinc.

Lista de Figuras

Figura 1 Estrutura cristalográfica da MT	16
Figura 2 Representação estrutural da molécula de MT	18
Figura 3 Alinhamento de MTs de diferentes organismos	19
Figura 4 Modelo de indução da expressão do gene da MT	21
Figura 5 Região de regulação do gene da MT humana	22
Figura 6 Exemplar de tilápia (<i>Oreochromis niloticus</i>)	29
Figura 7 Exemplar de curimbatá (<i>Prochilodus lineatus</i>)	30
Figura 8 Alinhamento de MTs de diferentes espécies de peixes	33
Figura 9 RNA total extraído de fígado de tilápia	47
Figura 10 Amplificação do cDNA da MT de <i>O. niloticus</i>	48
Figura 11 Alinhamento da seqüência de <i>O. niloticus</i> com <i>O. mossambicus</i>	49
Figura 12 PCR quantitativo da MT de tilápia	50
Figura 13 PCR quantitativo para GAPDH de tilápia	51
Figura 14 Diagrama de caixas e suíças dos resultados de qPCR de tilápia	52
Figura 15 SDS-PAGE dos extratos de proteína de tilápia	53
Figura 16 <i>Western Blotting</i> com amostras de tilápia	54
Figura 17 Ensaio de imunoprecipitação com tilápia	54
Figura 18 Alinhamento da MT de <i>O. niloticus</i> com as MTs humana e de coelho	55
Figura 19 Análise das preparações de RNA total de curimbatá	55
Figura 20 Amplificação do cDNA da MT de curimbatá	56
Figura 21 Alinhamento da MT de <i>P. lineatus</i> com seqüências do GeneBank	57
Figura 22 PCR quantitativo da MT de curimbatá	58
Figura 23 PCR quantitativo de GAPDH de curimbatá	59
Figura 24 Diagrama de caixas e suíças dos resultados de qPCR de curimbatá	60
Figura 25 SDS-PAGE dos extratos proteicos de fígado de <i>P. lineatus</i>	61
Figura 26 <i>Western Blotting</i> para detecção da MT de <i>P. lineatus</i>	61
Figura 27 Alinhamento da MT de <i>P. lineatus</i> com as MTs humana e de coelho	62

Lista de Tabelas

Tabela 1 Seqüência de <i>primers</i> para análise da MT	33
Tabela 2 Seqüência de <i>primers</i> de GAPDH para controle endógeno	33
Tabela 3 Expressão da MT de tilápia por qPCR	50
Tabela 4 Análise descritiva da expressão da MT de tilápia	51
Tabela 5 Expressão da MT de curimatá por qPCR	58
Tabela 6 Análise descritiva da expressão da MT de curimatá	59

Lista de Abreviatura

ABREVIATURA	DESCRIÇÃO
AP-1	“Activator protein 1”
AP-2	“Activator protein 2”
ARE	“Antioxidant response elements”
BCA	Ácido Bicincrônico
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indoil-fosfato de p-toluidina
BSA	Soro albumina bovina
cDNA	DNA complementar
Ct	“Threshold cycle”
Da	Daltons
DNA	Ácido desoxidoribonucléico
DEPC	Dietilpirocarbonato
D.O.	Densidade óptica
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GIF	“Growth inhibitory factor”
GRE	“Glucocorticoid response elements”
HEPES	Ácido Etanosulfônico 4-2 Hidroxietil Piperazina-1
IgG	Imunoglobulina G
InRs	Regiões iniciadoras
IPTG	Isopropil-β-D- tiogalactopiranosídeo
LB	Meio de cultura de bactérias (Luria Bertani)
MOPS	Ácido 3-N Mofolino Propanosulfônico
MRE	“Metal regulatory elements”
mRNA	RNA mensageiro
MT	Metalotioneína
MTF-I	“Metal transcriptions factor I”
MTFL	“Major late transcription factor”
nm	Nanômetros (10^{-9} m)
NBT	Cloreto de “nitroblue” tetrazóilo
pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
ROS	“Reactive oxigen species”
rpm	Rotações por minutos
S	Enxofre
SDS	Duodecil sulfato de sódio ou lauril sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS
TBS	Solução tamponada com NaCl e Tris
TFIID	“Transcription factor II D”
UA	Unidades Arbitrárias

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 Regulação Gênica da MT	19
1.2 Funções da MT	23
1.3 Importância do zinco	26
1.4 A MT como Biomarcador Ambiental	27
1.5 A MT e os Peixes	29
2. OBJETIVOS	31
3. MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1 Animais	32
3.2 Primers	32
3.3 Equipamentos	34
3.4 Métodos	35
3.4.1 Animais	35
3.4.2 Extração de RNA	36
3.4.3 Produção de cDNA	36
3.4.4 PCR convencional	37
3.4.5 PCR quantitativo	38
3.4.6 Clonagem	39
3.4.7 Isolamento de DNA plasmidial	40
3.4.8 Reação de Digestão	41
3.4.9 Extração de Proteína	42
3.4.10 <i>Western Blotting</i> (Imunodeteção)	42
3.4.11 Imunoprecipitação	44
4. RESULTADOS	46
4.1 <i>Oreochromis niloticus</i>	46
4.1.1 PCR quantitativo	49
4.1.2 Tentativas de Clonagem	52
4.1.3 Identificação proteica da MT	53
4.2 <i>Prochilodus lineatus</i>	55
4.2.1 PCR quantitativo	57
4.2.2 Tentativas de Clonagem	60
4.2.3 Identificação proteica da MT	60
5. DISCUSSÃO	63
6. CONCLUSÕES	68
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

1. INTRODUÇÃO

A metalotioneína (MT) foi primeiramente estudada em 1957 por MARGOSHES e VALLEE, que a identificaram no córtex renal equino associada ao metal cádmio.

Essa proteína tem sido largamente estudada por sua peculiar propriedade de ligação a metais (ROESIJADI, 1996; IOACHIM *et al.*, 1999; CARVALHO *et al.*, 2004; VERGANI *et al.*, 2007). Sabe-se que ela é uma proteína intracelular, sem atividade enzimática, que possui pequena massa molecular, em geral entre 6 e 7 kDa (REN *et al.*, 2006; THIRUMOORTHY *et al.*, 2006). É composta por 61 ou 62 aminoácidos, dependendo do tecido de origem, dos quais 20 são resíduos de cisteína (Cys). A Cys é um aminoácido polar neutro, que possui um grupo tiol (-SH) na sua cadeia lateral, que está possivelmente envolvido em ligações denominadas pontes de dissulfeto (-S-S), podendo inclusive formar uma ligação cruzada covalente com outros resíduos de cisteína. As cisteínas presentes na MT estão envolvidas na coordenação de metais e são consideradas essenciais para a estrutura e função desta proteína (ROESIJADI *et al.*, 1996). A MT é também isenta de aminoácidos aromáticos (KAGI; SCHAFFER, 1988). A figura 1 traz uma estrutura cristalográfica da metalotioneína.

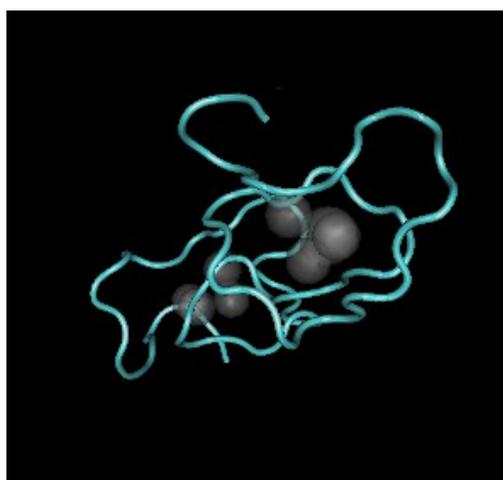


Figura 1 Estrutura cristalográfica da MT-2 de *Rattus rattus*. A estrutura linear é a molécula da metalotioneína e as esferas são metais. Fonte: www.ncbi.nlm.nih.gov.

A MT é localizada principalmente no citoplasma das células, mas ainda pode ser visualizada no núcleo e nos lisossomos após exposição a metais pesados (CAJARAVILLE *et al.*, 2000; COYLE *et al.*, 2002). Sua localização intracelular é também dependente do estágio de desenvolvimento tecidual, sendo encontrada no núcleo de células parenquimais de fetos e recém nascidos, mas são primeiramente citoplasmáticas em fígado adulto (HAQ *et al.*, 2003). A MT já foi também localizada no espaço intermembrânico de mitocôndrias ou mesmo dentro desta organela quando em condições anormais de excesso de cobre na célula (YE *et al.*, 2001).

As MTs compõem uma família de proteínas divididas nas classes MT-1, MT-2, MT-3 e MT-4 com múltiplas isoformas em cada classe (THIRUMOORTHY *et al.*, 2007). As MT-1 e MT-2 são expressas constitutivamente em todos os tipos celulares, porém em intensidades variáveis e sendo mais notáveis no fígado de mamíferos, que é um dos primeiros sítios de produção desta proteína, principalmente durante a reprodução e desenvolvimento (SCUDIERO *et al.*, 1997); a MT-3 está relacionada à inibição do crescimento neuronal e é expressa em neurônios glutaminérgicos; já a MT-4 está presente em epitélios estratificados de revestimento em mamíferos (HAQ *et al.*, 2003). As metalotioneínas 1 e 2 são as mais estudadas pela sua ampla distribuição e por serem mais responsivas a estímulos indutores de sua expressão (MILES *et al.*, 2000; COYLE *et al.*, 2002; HAQ *et al.*, 2003).

Múltiplas isoformas da MT também têm sido documentadas em peixes e em diversos organismos, e as diferentes isoformas não respondem igualmente aos diferentes metais (SCHMITT *et al.*, 2007). Sabe-se ainda que nem todas as isoformas estão presentes em todos os organismos. Por exemplo em peixes, duas isoformas da MT são encontradas nas espécies *Chionomadraco hamatus* e *Cyprinus carpio*, e apenas uma isoforma tem sido documentada em *Carassus auratus* e na *Tilapia mossambica* (REN *et al.*, 2006).

A proteína MT pode ser encontrada na forma de Apo-MT, uma forma livre de metais, porém a forma mais comum é a associada a metais (DUNCAN; STILLMAN, 2006). Os aminoácidos desta proteína formam dois domínios globulares, que são denominados domínio α , na região carboxiterminal, e domínio β , região aminoterminal. O dobramento da proteína nestes dois domínios se deve à presença dos resíduos de Cys, em que o domínio α possui 11 cisteínas, que podem se ligar a até 4 átomos bivalentes, como o zinco, ou seis monovalentes, enquanto o domínio β apresenta 9 cisteínas, que se ligam a até 3 átomos bivalentes (Figura 2).

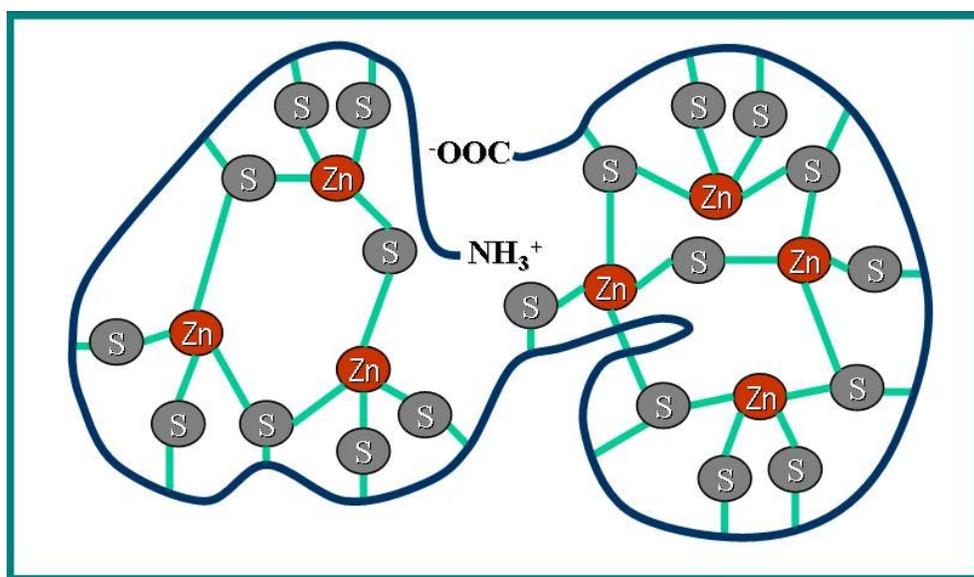


Figura 2 Representação estrutural da molécula de metalotioneína, adaptada de FISCHER; DAVIE (1998). Destaque dos domínios α , na porção carboxiterminal, com 11 Cys e 4 átomos de zinco, e β , na porção aminoterminal, com 9 Cys e 3 átomos de zinco.

A ligação de metais a esta proteína é responsável pela sua conformação final, sendo que a composição metálica é determinante da resistência da metalotioneína à degradação, que parece ser realizada principalmente por catepsinas (KLAASSEN *et al.*, 1994; HAQ *et al.*, 2003). Segundo KLAASSEN e colaboradores (1994) a degradação da MT depende da liberação dos metais a ela ligados, sendo a forma apo-MT mais rapidamente degradada do que as formas

MT-4 (HAQ *et al.*, 2003, THIRUMOORTHY *et al.*, 2007). Em camundongos, os genes da MT estão localizados no cromossomo 8 e há uma cópia de cada gene (MT-1, MT-2, MT-3 e MT4) (HAQ *et al.*, 2003).

Os principais estudos sobre a indução da expressão da MT relacionam-se aos tipos 1 e 2 (BOURDINEAUD *et al.*, 2006; REN *et al.*, 2006; WERNER *et al.*, 2008). A regulação da biossíntese da metalotioneína ocorre primeiramente a nível transcricional por alguns agentes, incluindo metais, radicais livres, hormônios, fatores de crescimento e promotores de tumores (VERGANI *et al.*, 2007). O gene codificador da MT é um exemplo de como um único gene pode ser regulado por muitos circuitos diferentes. A região de regulação do gene da MT contém elementos reguladores no promotor bem como no *enhancer* (LEWIN, 2001). Assim sendo, variados fenômenos podem induzir a expressão da MT.

A indução da expressão da metalotioneína deve-se ao estímulo de elementos regulatórios encontrados em cis (anterior à seqüência codificante do mRNA) aos genes respectivos. Os promotores dos genes da MT-1 e MT-2 contêm regiões de TATA *boxes* e Iniciadoras (InRs), que recrutam o fator de transcrição TFIID, que é expresso constitutivamente, como parte de um complexo para a transcrição basal destes genes (MILES *et al.*, 2000; HAQ *et al.*, 2003).

Outros elementos adicionais, porém necessários também para a expressão basal da MT, são os elementos regulatórios associados a metais, MRE (*Metal Regulatory Elements*). Tais elementos atuam em conjunto ao fator de transcrição responsivo ao zinco, MTF-I (*Metal Transcriptions Factor 1*). Este fator de transcrição foi descrito em 1988 por WESTIN e SCHAFFNER como uma proteína de ligação a MRE que requer elevados níveis de zinco para se ligar ao DNA. O MTF-I é expresso ubiquamente e é essencial tanto na expressão basal quanto na expressão induzida da metalotioneína. Tal fator é encontrado deslocado do citoplasma para o

núcleo em situações de estresse celular, como hipóxia ou condições oxidativas, ou ainda na exposição a metais. Quando no núcleo, este fator de transcrição se liga ao MRE no promotor da MT e regula a transcrição gênica dela por interação com componentes da RNA polimerase II na maquinaria transcricional, direta ou indiretamente. Esta associação do MTF-I ao MRE requer a ligação de zinco a este fator de transcrição (figura 4) (HAQ *et al.*, 2003; BOURDINEAUD *et al.*, 2006).

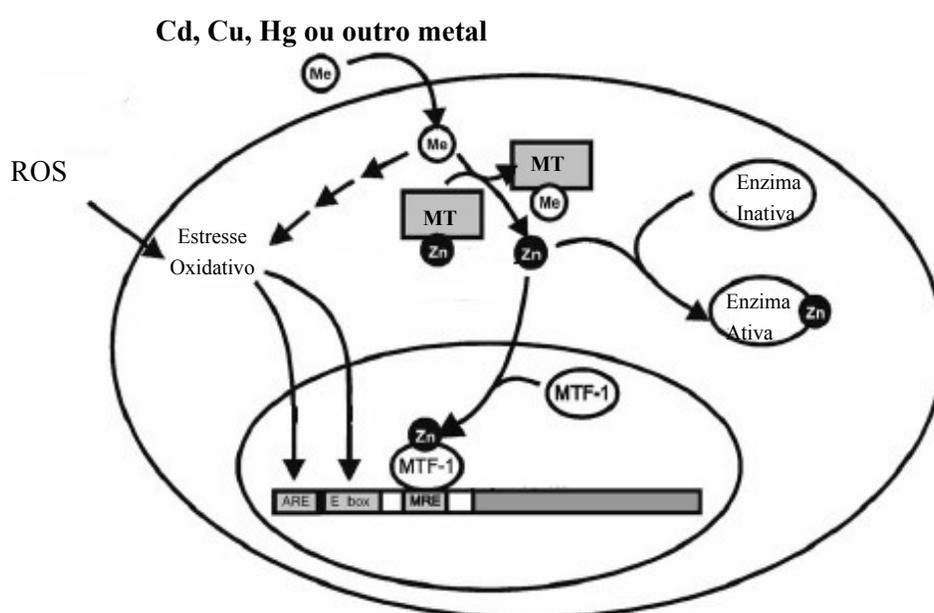


Figura 4 Modelo para indução da expressão do gene da metalotioneína (baseado em HAQ *et al.*, 2003). Esquema celular com o núcleo contendo gene de resposta a metais. MT indica a metalotioneína, que libera zinco ao se ligar a outro metal. ARE é o elemento de resposta a antioxidante, MTF-1 é o fator de transcrição de metais 1, MRE é o elemento de resposta a metais, ROS indica as espécies reativas de oxigênio.

Assim, temos que a expressão da metalotioneína depende, em grande parte, da presença de quantidades essenciais de zinco na célula. Os MREs estão presentes em diferentes isoformas, de MREa até MREg, no promotor da metalotioneína (MILES *et al.*, 2000; HAQ *et al.*, 2003).

É sugerido que os metais de transição também ativam a expressão da MT por um mecanismo independente da interação do MTF-I com o DNA. O cádmio, por exemplo, é altamente redox-ativado em comparação ao zinco, e induz o estresse oxidativo, que pode ativar o

gene da MT diretamente pela estimulação de seqüências específicas conhecidas como MTFL (*Major Late Transcription Factor*, ou Fator principal de transcrição tardia). Os MTFs estão presentes junto a elementos de resposta antioxidante (ARE – *Antioxidant Response Elements*), formando um complexo promotor MTFL/ARE. O estresse oxidativo ocasionado pela presença de metais também pode ativar o gene da MT indiretamente pelo aumento do zinco livre, já que a MT, bem como outras proteínas, libera zinco em condições redox pela oxidação dos tiois, que é responsável pela coordenação da ligação de zinco (MILES *et al.*, 2000; COYLE, 2001; HAQ *et al.*, 2003).

Hormônios glicocorticóides podem também induzir a expressão da metalotioneína independentemente de outras seqüências regulatórias. Há no gene da MT elementos de resposta a glicocorticóides, os GREs (*Glucocorticoid Response Elements*), os quais também são responsivos a citocinas. Cada GRE pode independentemente mediar resposta transcricional a glicocorticóides endógenos, como hidrocortisona (HAQ *et al.*, 2003).

Também as regiões do tipo GC Box e seqüências realçadoras (*enhancers*) basais, que são responsivas à ligação das proteínas ativadoras 1 (AP1 - *Activator Protein 1*) e 2 (AP2) são encontrados no promotor do gene da MT, principalmente da MT-2 (MILES *et al.*, 2000).

A figura 5 traz representados os diversos pontos de regulação do gene da metalotioneína.

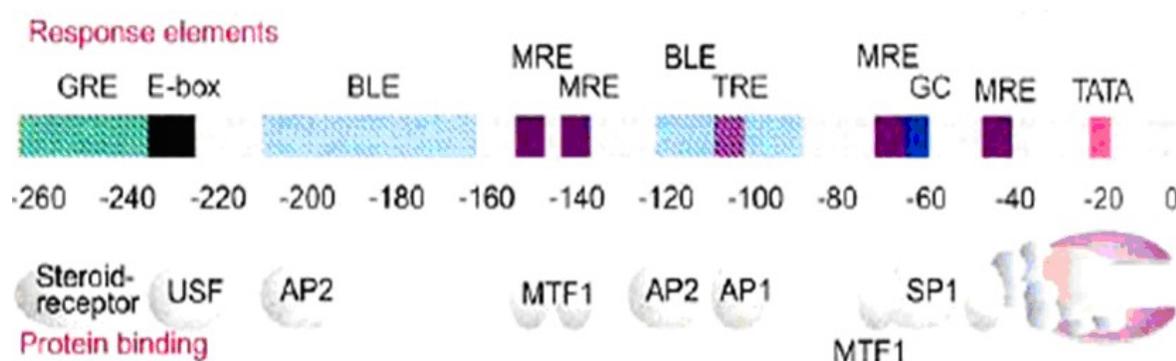


Figura 5 Região de regulação do gene da metalotioneína humana, com elementos reguladores tanto no promotor como no *enhancer* (LEWIN, 2001). O promotor tem elementos para indução por metais (MRE) e o *enhancer* traz elemento de resposta a glicocorticóides (GRE). BLE é elemento de nível basal e o TRE é uma seqüência consensual presente em diversos *enhancers* e confere resposta a forbol-ésteres. Os elementos promotores são apresentados acima do mapa e as proteínas que se ligam a eles estão indicadas a baixo.

Sabe-se ainda que a indução de mudanças na organização da cromatina também altera a expressão da metalotioneína. A metilação do DNA está associada a uma baixa expressão desta proteína. Porém apenas a metilação do DNA não pode reprimir sua expressão, pois é preciso a participação de outros fatores de inibição. A repressão da transcrição pode ser por mecanismos tais como a inibição da ligação de fatores positivos ao promotor, pelo recrutamento de co-repressores transcricionais ou pela alteração da estrutura da cromatina em que os nucleossomos inibidores são posicionados no promotor (HAQ *et al.*, 2003).

Estudos têm demonstrado que o promotor do gene da MT de peixes apresentam seqüências regulatórias semelhantes à de mamíferos (VIARENGO *et al.*, 2007).

Eventos pós-transcricionais têm se mostrado de grande importância na determinação dos níveis protéicos da MT. Percebe-se em alguns trabalhos que a expressão do gene não é necessariamente indicada pela concentração da proteína tecidual e que a relação entre o mRNA e a proteína é dependente do metal e do tecido analisado (SCUDIERO *et al.*, 1997; VASCONCELOS *et al.*, 2002; VERGANI *et al.*, 2007).

1.2 Funções da MT

Uma propriedade importante das metalotioneína é o seu alto conteúdo de resíduos de cisteínas (cerca de 30%), que lhe confere a capacidade de ligação a um número variado de íons metálicos de transição, essenciais e não essenciais (KAGI; SCHAFFER, 1988). Assim sendo, tem-se conferido a esta proteína prováveis funções protetoras, incluindo papel importante na regulação e metabolismo dos metais essenciais, como zinco e cobre, na desintoxicação de metais

pesados, como cádmio e mercúrio (CHAN, 1994), além de estar relacionada à proteção tecidual contra o estresse oxidativo (MILES *et al.*, 2000; KNAPEN *et al.*, 2007; WERNER *et al.*, 2008).

No entanto, uma função única que envolva todas as diferentes isoformas dessa proteína ainda não foi descrita. Sabe-se que a MT-3 foi inicialmente descrita como um fator de inibição do crescimento neuronal, denominado de GIF (*Growth Inhibitory Factor*), e que ela está expressa em diversas formas de danos do sistema nervoso central, acreditando-se inclusive que estaria relacionada a doenças degenerativas como o mal de *Alzheimer* (SIMPKINS, 2000). SENS e colaboradores em 2001, utilizando-se de anticorpos monoclonais específicos para a MT-3, indicaram a presença desta isoforma também em tecido renal e prostático, bem como em neoplasias derivadas desses órgãos e em carcinomas mamários. Já a expressão da MT-4 foi observada em epitélios estratificados, como o da mucosa bucal. Nestes tecidos essa isoforma foi detectada nas camadas mais superficiais, o que indica uma provável associação da MT-4 com a diferenciação epitelial (QUAIFE *et al.*, 1994).

A grande maioria dos estudos sobre as funções das metalotioneínas está relacionada às duas formas mais comuns, MT-1 e MT-2, que são mais amplamente distribuídas pelos diferentes tecidos, além de serem mais responsivas aos estímulos indutores de sua expressão (MILES *et al.*, 2000; COYLE *et al.*, 2002; HAQ *et al.*, 2003).

As funções fisiológicas da metalotioneína ainda não foram totalmente identificadas, mas é geralmente aceito que ela esteja principalmente envolvidas na regulação homeostática de zinco e do cobre (KNAPEN *et al.*, 2007). Essa proteína tem papel potencial como doador de metal para metaloproteínas, tendo então a habilidade de ativar proteínas que necessitam de zinco ou cobre, como por exemplo as enzimas álcool desidrogenase e fosfatase alcalina (ROESIJADI, 1996). Quando há aumento das concentrações de zinco disponíveis, ocorre a indução da síntese da MT

por ação do zinco sobre fatores de transcrição dependentes deste metal e consequente aumento da concentração da MT, Já em baixas concentrações do zinco nas células, este é liberado da proteína, que estará exposta à degradação, diminuindo no entanto sua concentração (MARET, 2000; MAFRA; COZZOLINO, 2004).

Apesar das ligações a metais serem estáveis, essas ligações são dinâmicas com rápidas mudanças de metais inter e intra proteína (ROESIJADI, 1996). Sabe-se que a intensidade de ligação da MT aos metais de transição é variável, tendo por exemplo, o cobre uma maior afinidade seguido pelo cádmio e pelo zinco (MILES *et al.*, 2000; COYLE *et al.*, 2002), o que ocasiona um deslocamento do zinco na presença de outros metais. A ligação da MT aos metais pesados reduz os seus efeitos tóxicos no citosol, sobre proteínas e nos processos enzimáticos (OLSVIK *et al.*, 2001). Em organismos não expostos a metais pesados, a MT liga-se primeiramente ao zinco e secundariamente ao cobre (SABER; PISKIN, 2003). A indução da MT por outros metais é proposta como uma via que resulta no aumento dos níveis de zinco livre intracelularmente (ROESIJADI, 1996).

O papel da metalotioneína na proteção contra danos causados por agentes oxidativos tem sido também estudado (VIARENGO *et al.*, 1999; SAMSON *et al.*, 2001). A MT é tratada como “lixreira” para o metabolismo de moléculas de oxigênio reativas, denominadas ROS (*Reactive Oxygen Species*), particularmente o radical hidroxila. As ROS são produzidas continuamente durante o metabolismo aeróbico normal e podem se tornar nocivas em situações de desequilíbrio com antioxidantes endógenos ou podem induzir danos no DNA. Acredita-se que a MT, quando exposta a ambiente celular oxidante, libera os átomos aos quais está ligada, como o zinco, e forme pontes dissulfeto intramoleculares, diminuindo o dano potencial dos radicais livres carregados negativamente (ROMERO-ISART; VASAK, 2002). É provável que a proteção

conferida pela metalotioneína nesse caso ocorra mais pela liberação do zinco do que propriamente pela neutralização dos compostos tóxicos (COYLE *et al.*, 2001).

Diante de todas essas funções propostas, muitos trabalhos têm envolvido a metalotioneína. Ela tem sido estudada em quadros neoplásicos, devido à sua atuação na biodisponibilidade de zinco, que interage com diversos fatores envolvidos no processo apoptótico e de proliferação celular (CHERIAN *et al.*, 2003; THIRUMOORTHY *et al.*, 2007). Também, graças à sua propriedade de ligação a metais e proteção ao estresse oxidativo, a MT tem sido amplamente utilizada no biomonitoramento de poluição ambiental, através do estudo de sua expressão principalmente em tecidos de peixes (ROESIJADI, 1996; SCHLENK *et al.*, 1997; VIARENGO *et al.*, 1999; CARVALHO *et al.*, 2004; SCHMITT *et al.*, 2007).

1.3 Importância do Zinco

O zinco é um metal essencial, necessário na manutenção das funções celulares normais tanto para plantas como animais, porém em concentrações elevadas pode-se tornar extremamente tóxico a tais organismos (CARVALHO *et al.*, 2004), causando danos como morte celular, diminuição do crescimento e/ou proliferação celular (MONTEIRO, 2000; MAZON *et al.*, 2002).

O zinco participa de muitas reações do metabolismo celular, incluindo processos como função imune, defesa antioxidante, co-fator de enzimas, crescimento e desenvolvimento (MAFRA; COZZOLINO, 2004). A presença desse metal em altas concentrações nas células pode interferir com outros processos metalo-dependentes ou inibir proteínas. A metalotioneína ligada ao zinco age como marcador bioquímico que controla a concentração desse metal. A MT tem

sido considerada a principal proteína relacionada à regulação da biodisponibilidade do zinco no ambiente intracelular, recebendo e doando zinco a outros componentes celulares (SUHY *et al.*, 1999). Altas concentrações de zinco induzem a síntese da MT por meio da ação desse metal sobre fatores de transcrição dependentes de zinco, como o MTF-I (KLAASSEN *et al.*, 1994; MARET, 2000; KOURY; DONANGELO, 2003; MAFRA; COZZOLINO, 2004).

Quando em excesso no organismo o zinco interfere no metabolismo de outros metais como o cobre e o ferro. Doses excessivas desse metal podem causar problemas pulmonares, gastrointestinais, febre, calafrios, sonolência, náusea, desidratação e descoordenação muscular em humanos. Para os peixes, o excesso de zinco pode afetar a secreção mucosa produzida pelas brânquias e assim obstruir o espaço interlamelar, bloqueando o movimento respiratório (ROCHA *et al.*, 1985).

Alguns trabalhos têm elucidado que, quando comparado a outros metais, o zinco apresenta um maior potencial de indução da expressão gênica da metalotioneína (CHAN, 1994; KNAPEN *et al.*, 2007). O Zn^{2+} é um íon estável, que possui orbital d¹⁰ completo, o que impossibilita sua participação em reações de óxido-redução, mas permite que ele seja acceptor de elétrons. Assim, o zinco funciona como co-fator em reações que necessitam de um íon redox estável (FERNANDES; MAFRA, 2005).

1.4 A MT como Biomarcador Ambiental

Percebe-se que cada vez mais os níveis de contaminação de ambientes, sobretudo aquáticos, têm aumentado grandemente com a influência da ação humana (CAJARAVILLE *et*

al., 2000), podendo citar como exemplo, o desenvolvimento industrial e o uso de pesticidas na agricultura como alguns responsáveis pelo aumento inclusive no nível de metais pesados nas águas (McCLAIN *et al.*, 2003). Para analisar o quanto um ambiente está contaminado, são feitos estudos utilizando-se principalmente peixes, já que eles constituem um indicador muito útil do real estado de pureza do ambiente ao qual pertence (ROCHA *et al.*, 1985).

Com relação à mensuração da concentração de metais em água ou sedimento, uma série de métodos e biomarcadores têm sido propostos e extensivamente testados (OLSVKI *et al.*, 2001; McCLAIN *et al.*, 2002; WOO *et al.*, 2006; KNAPEN *et al.*, 2007; SCHMITT *et al.*, 2007). A caracterização do acúmulo de metais em diferentes órgãos tem provado ser uma medida representativa de exposição e é usado no monitoramento desses metais. Porém a MT tem se mostrado como um dos mais importantes marcadores usados nos programas de biomonitoramento para caracterizar a contaminação de ambientes por metais (KNAPEN *et al.*, 2007). Tem sido demonstrado que a concentração da MT aumenta significativamente em tecidos de uma ampla variedade de espécies aquáticas, tanto em estudos laboratoriais como em estudos de campo (BOURDINEAUD *et al.*, 2006; KNAPEN *et al.*, 2007).

Recentes trabalhos têm utilizado técnicas como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em Tempo Real para avaliar os níveis da expressão gênica da MT sob diferentes cenários de exposição a metais, indicando que a expressão gênica da MT é um sensível e eficiente biomarcador para avaliar os efeitos biológicos cumulativos da exposição a metais (VERGANI *et al.*, 2007; KNAPEN *et al.*, 2007; WERNER *et al.*, 2008).

No entanto, alguns estudos indicaram que os níveis da proteína e os níveis de mRNA da MT não são claramente associados (VASCONCELOS *et al.*, 2002; VERGANI *et al.*, 2007) e então seria interessante a mensuração de ambos no biomonitoramento de ambientes aquáticos.

Pesquisas laboratoriais sugerem que a quantificação dos níveis de mRNA da MT seja um indicador mais sensível das alterações ambientais nos estudos de biomonitoramento (KNAPEN *et al.*, 2007; WERNER *et al.*, 2008).

1.5 A MT e os Peixes

Com a descoberta da metalotioneína em espécies aquáticas, estudos de sua indução e ligação a metais foram propostos como candidatos ao monitoramento bioquímico de poluição por metais em ambientes aquáticos (ROESIJADI, 1996). Dentre os animais aquáticos, os peixes são os mais estudados para esse fim (LINDE *et al.*, 2001; SAMSON *et al.*, 2001; CARVALHO *et al.*, 2004; CHAN *et al.*, 2003), embora estudos com moluscos também sejam realizados (CERATTO *et al.*, 2001; BOURDINEAUD *et al.*, 2006).

A tilápia (*Oreochromis niloticus*) (figura 6) é um modelo animal comumente utilizado em estudos toxicológicos. É resistente a doenças causadas por vírus, bactérias e parasitas e considerada uma espécie resistente à poluição e ideal para o biomonitoramento ambiental de poluição aquática, pela análise da concentração de metais e pela expressão do gene da MT nos seus tecidos (CHAN, 1994; CHEUNG *et al.*, 2005).



Figura 6 Exemplar de tilápia (*Oreochromis niloticus*).

Também o curimbatá vem sendo utilizado em estudos toxicológicos. São animais que vivem em baixa alcalinidade, em águas pobres em íons e apresentam tolerância a mudanças no pH e temperatura da água. Além disso, o curimbatá tem importância comercial e ambiental, sendo uma espécie nacional de larga distribuição pelas Bacias Hidrográficas Brasileiras (CARVALHO *et al.*, 2004). A espécie *Prochilodus lineatus* (figura 7) possui uma distribuição mais restrita ao Sudeste brasileiro.



Figura 7 Exemplar de curimbatá (*Prochilodus lineatus*).

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivos:

Desenvolver uma metodologia para análise da expressão da metalotioneína utilizando-se a espécie *Oreochromis niloticus* (tilápia), visando a padronização de um estudo aplicável a outras espécies.

Aplicar a metodologia desenvolvida, a partir da tilápia, em *Prochilodus lineatus* (curimatá), que não possui informação sobre o gene da sua metalotioneína. Assim, permitindo a utilização de uma nova espécie nos estudos de biomonitoramento.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados exemplares jovens de tilápia (*O. niloticus*) e de curimatá (*P. lineatus*), fornecidos pela Estação de Hidrobiologia e Piscicultura, da Usina de Furnas, Furnas-MG. Os animais foram transportados até o Laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparativa do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFSCar, onde foram aclimatados às condições laboratoriais ($25 \pm 1^\circ\text{C}$; pH 7,0).

3.2 PRIMERS

Os *primers* utilizados foram desenhados a partir de pesquisa no GenBank. No site do NCBI (National Center for Biotechnology Information) foi realizada uma busca com as palavras-chave “metallothionein and fish” no campo “search protein”, obtendo-se assim uma lista de artigos relacionados, dos quais foram selecionados os mais pertinentes, ou seja, estudos realizados em peixes e que continham seqüências completas de aminoácidos. As seqüências foram alinhadas pelo programa Multalin Online (figura 8), de onde obteve-se uma seqüência consenso. Também foi realizada uma pesquisa com a seqüência nucleotídica desta proteína, selecionando aqueles trabalhos que apresentavam a seqüência do cDNA e/ou mRNA e que

estavam isentas de íntrons. Para orientar a construção dos *primers* o programa GeneRunner foi utilizado.

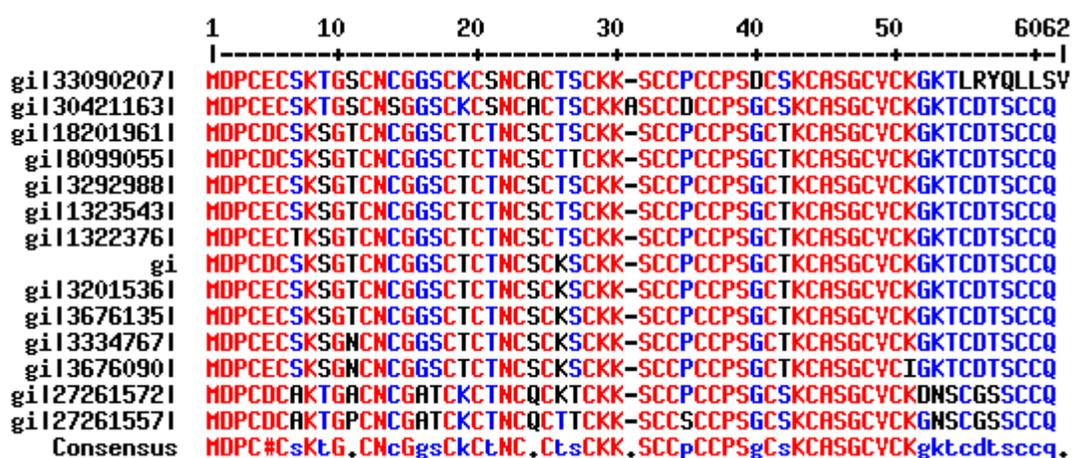


Figura 8 Alinhamento de MTs de peixes. gi|33090207| MT B de *Salvelinus alpinus*; gi|30421163| MT A de *Salvelinus alpinus*; gi|18201961| MTB CHIHA MT B; gi|8099055| MT *Dicentrarchus labrax*; gi|3292988| MT *Pagothenia borchgrevinki*; gi|1323543| MT *Trematomus bernacchii*; gi|1322376| MT *Chaenocephalus aceratus*; gi|3201536| MT I *Notothenia coriiceps*; gi|3676135| MT *Chionodraco rastrorpinosus*; gi|3334767| MT *Parachaenichthys charcoti*; gi|3676090| MT *Chaenocephalus aceratus*; gi|27261572| de *Carassius cuvieri*; gi|27261557| *Carassius cuvieri*.

Assim, construiu-se o *primer Forward* com base na seqüência inicial consenso da MT. Os *primers* Adaptador poli-T e o Adaptador foram desenhados a partir de *primers* presentes na literatura (SCUDIERO *et al.*, 1997; KNAPEN *et al.*, 2005). Estes *primers* estão indicados na tabela 1.

<i>Primers</i>	
Adaptador poli-T	5'CGGAGATCTCCAATGTGATGGGAATTCTTTTTTTTTTTTTTTTTT3'
Adaptador	5'CGGAGATCTCCAATGTGATGGGAATTC3'
Forward	5'ATGGAYCCITGYGAI TG3'

Tabela 1. Seqüências dos *primers* para análise do gene da metalotioneína.

Para o controle endógeno utilizou-se *primers Forward* e *Reverse* para GAPDH, com as seqüências listadas na tabela 2.

<i>Primers</i>	
GAPDH Forward	5'GATGCTGGTGCTGAGTATGTCG3'
GAPDH Reverse	5'GTGGTGCAGGATGCATTGCTGA 3'

Tabela 2. Seqüências dos *primers* de GAPDH para controle endógeno.

3.3 EQUIPAMENTOS

Para extração do RNA total foi utilizado o Homogenizador Power Gen1000 (Fisher Scientific) e a Centrífuga Refrigerada (Eppendorf). Para analisar a qualidade e pureza do RNA total obtido, as amostras foram avaliadas no Espectrofotômetro Ultrospec 2000 UV/Visible Spectrophotometer (Pharmacia Biotech) e resolvidas em gel de agarose 1% com formaldeído em cuba de eletroforese Horizon®58.

Para amplificação pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizou-se o Termociclador Gene Amp PCR System 2400 (Perkin Elmer). Correu-se gel de Agarose 1% com o resultado da PCR e este gel foi analisado e fotografado no White/2 UV Transilluminator – UVP (Kodak Digital Science 1D).

A PCR em Tempo Real foi desenvolvida no Termociclador Rotor Gene RG3000 (Corbett Research), com o software para do programa Rotor Gene 6.

Também foi utilizado o homogenizador descrito anteriormente para a extração de proteínas. A SC 210^a Speed Vac®Plus (Thermo Savant) foi utilizada nos ensaios com a proteína para secar ou concentrar as amostras.

As imagens referentes aos géis de poliacrilamida e às membranas de imunodeteção presentes nesse trabalho foram documentadas com a ajuda do *scanner* (ScanJet Hewlet Packard) e da câmera Kodak DS 120.

3.4 MÉTODOS

3.4.1 Animais

Os animais vindos da Estação de Furnas foram aclimatizados nos tanques do laboratório e durante 15 dias foram observados quanto à anormalidades no comportamento, ausência de escamas ou qualquer outra alteração que indicasse alguma patologia.

Para realização dos experimentos com tilápia (*O. niloticus*) foram separados em aquários cinco animais para compor o grupo tratado (T) e cinco para compor o grupo controle (C). Já para os experimentos com curimatá (*P. lineatus*), o número foi de treze animais para cada grupo, formando também um grupo controle (C) e outro tratado (T).

Para ambas as espécies os grupos tratados receberam injeções intraperitoniais de cloreto de zinco ($ZnCl_2$) em concentrações crescentes, ou seja, no primeiro dia eles receberam uma dose de 1mg/Kg (1mg de Zn^{2+} por kg de peixe), no segundo dia 2mg/kg, no terceiro 4mg/kg e no quarto 8mg/kg. No quinto dia os animais foram sacrificados por secção da medula (CHAN *et al.*, 1989). Foi considerado um peso médio dos animais de 100g.

Os grupos controles dessas espécies também receberam injeções intraperitoniais, porém contendo NaCl (1,1%) na intenção de submeter os animais às mesmas condições de estresse que os dos grupos tratados.

O fígado dos animais foi separado para as análises posteriores, sendo armazenado em tubo de criogenia e colocado em nitrogênio líquido. Posteriormente este tecido foi congelado à temperatura de $-80^{\circ}C$.

3.4.2 Extração de RNA

Dos tecidos congelados foi extraído o RNA total usando o reagente Trizol. Os tecidos foram homogeneizados em Trizol e centrifugados por 10 minutos a 12000 rpm a 4°C. Ao sobrenadante foi acrescentado clorofórmio e deixado à temperatura ambiente por 2 minutos. As amostras foram centrifugadas e a fase aquosa obtida foi transferida para um novo microtubo. Acrescentou-se isopropanol e novamente centrifugou-se as amostras. O precipitado formado foi lavado com etanol 75% e ressuspensionado em 70µl de água tratada com DEPC 1% (Dietilpirocarbonato) (livre de RNase).

Para verificar a qualidade e a pureza do RNA extraído, as amostras foram diluídas 100x em água tratada com DEPC 1% para leitura no espectrofotômetro, em absorvâncias de 260 e 280nm. Foram consideradas as amostras que continham a razão $A_{260}/A_{280} \geq 1,65$. As amostras também foram resolvidas em Gel de Agarose 1% para RNA (0,3g de agarose, 3ml de MOPS 10X, 25,5ml de água com DEPC e 2,7ml de formaldeído 37%), utilizando tampão MOPS 1X (Ácido 3-N Morfolino Propanosulfônico) para a corrida.

3.4.3 Produção do cDNA

Usando o kit da Promega, M-MLV Reverse Transcriptase, 2µg de RNA total foram adicionados em um microtubo com mais 1µl do *primer* Adaptador poli-T e completado com água com DEPC para um volume final de 14µl. Aqueceu-se o microtubo a 70°C por 5 minutos, seguido de resfriamento em gelo imediatamente após este tempo. Foi acrescentado ao tubo o

Tampão 5x do kit, dNTPs (10mM) e a transcriptase reversa. Incubou-se esta reação por 60 minutos à 37°C. O cDNA foi armazenado a -20°C.

Também foi produzido cDNA de todas as amostras utilizando-se o *primer* poli-T, para a realização dos controles endógenos.

3.4.4 PCR Convencional

Foi feita a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) a partir do cDNA produzido de ambas as espécies, tilápia e curimatá. Para tanto, colocou-se 1,0µl de DNA molde com dNTPs, *primers* Forward e Adaptador, cloreto de magnésio (50mM), Taq DNA Polimerase (Fermentas) e mais o tampão 10x com KCl (Fermentas). A reação foi colocada no Termociclador a 94°C por 5 minutos, com 30 ciclos (94°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto), e 10 minutos a 72°C.

O produto da reação foi analisado em gel de agarose 1%, visto sob a luz UV do Transiluminador e fotografado. Utilizou-se padrão Low DNA Mass Ladder (Invitrogen). Para cada uma das espécies foi selecionada a banda mais expressiva, que foi recortada do gel para tratamento de purificação com o kit Perfect Gel Cleanup (Eppendorf) para o posterior sequenciamento. O fragmento retirado do gel foi colocado em microtubo e pesado. A ele foi adicionado tampão de ligação do kit e incubado por 5 minutos a 50°C para dissolução do gel. Foi adicionado isopropanol e a amostra foi colocada em coluna com tubo coletor. Centrifugou-se e acrescentaram-se 750µl de tampão de lavagem. Depois de centrifugar novamente a coluna foi

colocada em novo tubo e à ela foi adicionado tampão de eluição. A solução final foi lida em espectrofotômetro com absorvância de 260nm.

Uma alíquota da solução foi enviada ao Laboratório de Cristalografia do Departamento de Biofísica da USP – Campus São Carlos, para a realização do sequenciamento do fragmento.

Os resultados obtidos a partir do sequenciamento foram analisados pelo site do NCBI, através do programa “Blast” – *Basic Local alignment sequence tool* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>), para comparação com as seqüências depositadas no GenBank, para confirmação da seqüência encontrada.

3.4.5 PCR quantitativo

Para realização da PCR em tempo real ou PCR quantitativo (qPCR) com o kit *Quantimix Easy SYG Kit*, da Biotools, foi utilizado 1µl do cDNA produzido, juntamente com 2µl de cada *primer* (Forward e Adaptador), 20µl da solução do kit e completada a reação com água com DEPC para um volume final de 42µl, correspondendo à duplicata de 20µl para cada microtubo.

A reação foi colocada no Termociclador Rotor Gene a 94°C por 5 minutos, com 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto.

Foram verificadas a fluorescência emitida e a curva de *melting* para avaliar a qualidade e pureza do resultado obtido na amplificação. Os produtos das reações foram também observados em gel de agarose 1% e o padrão utilizado foi o *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen).

O *software* do programa Rotor Gene forneceu os valores de Ct (*Threshold Cycle*), que foram utilizados para análises estatísticas. As análises foram realizadas através de métodos

descritivos e pelo teste T (*Student*), pelo *software* SAS Interprise GUIDE. A utilização de uma abordagem paramétrica se dá pelo fato de suposições básicas deste tipo de abordagem não serem violadas (ZAR, 1999), ou seja, os dados foram considerados independentes, normais e homocedásticos (com variância constante).

3.4.6 Clonagem

Visando conseguir a seqüência mais completa do RNA mensageiro da metalotioneína, foram realizados ensaios de clonagem. Para preparação de células competentes foi colocado em um tubo falcon 10ml de meio LB (Luria Bertani) (Sigma USA) juntamente com células da linhagem de DH5- α . Em outros dois tubos foram colocados, além do meio e das células, antibióticos ampicilina (50mg/ml) e canamicina (30mg/ml) respectivamente usados como controles. Estes falcons foram incubados a 37°C por toda noite (cerca de 16h) sem agitação.

Mantendo a esterilidade da cultura trabalhando em fluxo laminar, foi retirada uma alíquota de 1ml do Falcon contendo apenas o meio com as células, para se medir a DO 600nm que deveria estar entre 0,4 e 0,6. A amostra foi centrifugada a 5000 rpm por 10 minutos em centrífuga refrigerada. Ressuspendeu-se o precipitado em 3ml de cloreto de cálcio (CaCl₂) 50mM estéril. Incubou-se em gelo por 30 minutos, voltando a centrifugar em seguida, sob as mesmas condições anteriores. O precipitado foi novamente ressuspendido em 600 μ l de CaCl₂ 50mM e transferido para um microtubo que foi mantido em isopor com gelo a 4°C por no mínimo 24h.

Foi feita uma PCR convencional para amostras de tilápia e de curimatá e posteriormente visualizadas em gel de agarose 1,0%, do qual as bandas de interesse foram purificadas pelo kit

Perfectprep Gel Cleanup. Foi realizada uma etapa de adenilação, em que ao DNA purificado foi acrescentado tampão (KCl), dATP e a Taq polimerase e mantida a 72°C por 30 minutos.

Todo o produto adenilado foi utilizado para a reação de ligação. Esta reação dependeu do vetor utilizado, já que foram testados diferentes kits como o TOPO TA Cloning® Kits (Invitrogen), Clone Jet™ PCR Cloning kit (Fermentas), InsTA Clone PCR Product Cloning kit (Fermentas) e o pGEM® T Easy Vector Systems (Promega). No geral acrescentou-se ao produto adenilado o vetor, o tampão correspondente de cada kit e mais a T4 DNA Ligase (exceto para o TOPO).

A reação de transformação foi feita utilizando-se a reação de ligação misturada com 100µl das células competentes e colocada em gelo por 30 minutos. Foi realizado um choque térmico, para que as células permitissem a entrada do vetor, de 30 segundos a 42°C e resfriando em gelo imediatamente. Acrescentou-se ainda 500µl de meio LB e colocou-se em agitação a 37°C pelo período de 1h. Plaqueou-se esta solução em placas contendo antibiótico canamicina (30mg/ml), IPTG e X-Gal (40mg/ml). As placas foram colocadas em estufa a 37°C por 16h.

3.4.7 Isolamento de DNA plasmidial

O isolamento do DNA plasmidial foi realizado através de ensaio por Lise Alcalina e pelo kit da Eppendorf.

Para realização da Lise Alcalina, incubou-se 10ml de meio LB com material de uma colônia mais 10µl do antibiótico canamicina (30mg/ml), deixando por cerca de 16h a 37°C. Separou-se uma alíquota de 900µl desta que foi acrescida de 100µl de glicerol para fazer solução

estoque. Centrifugou-se 1,5ml de células por 20 segundos, ressuspensando o precipitado obtido em 100µl de GTE (Glicose 50mM, Tris-HCl 25mM e EDTA 10mM, pH8,0) por 5 minutos a temperatura ambiente. Acrescentou-se em seguida solução de lise (200µl de NaOH 1N, 100µl de SDS 10% e 700µl de água estéril) por 5 minutos em gelo. Adicionaram-se 150µl de acetato de potássio 5M (Acetato de potássio 5M, ácido acético glacial e água estéril, pH4,8) e deixou-se por mais 5 minutos no gelo. Em seguida, centrifugou-se e transferiu-se o sobrenadante para novo tubo, adicionando 800µl de etanol 95% por 2 minutos a temperatura ambiente. Novamente centrifugou-se e o precipitado obtido foi lavado com etanol 70%. Por fim, o precipitado foi ressuspensado em 30µl de água estéril e estocado. Para verificação deste ensaio foi feito gel de agarose 1,0%.

A minipreparação pelo kit da Eppendorf foi realizada seguindo o protocolo do fabricante e também foi resolvida em gel de agarose 1,0%.

3.4.8 Reação de Digestão

O sucesso da clonagem foi verificado por reação de digestão para verificar a ocorrência de inserção do cDNA de interesse ao plasmídeo. Foi acrescentado ao plasmídeo, a enzima *Eco* RI (Invitrogen), RNase, água estéril e tampão React 3 10X (Invitrogen). Esta reação foi colocada em banho-maria a 37°C por 2h. Fez-se gel de agarose 1,0% para analisar esta reação, com padrão Low DNA Mass Ladder (Invitrogen).

3.4.9 Extração de Proteína

Para extração de proteína dos tecidos armazenados a -80°C , preparou-se tampão Hepes (Hepes 10mM pH7,1 acrescido de 0,25% de Triton X-100). Os tecidos colocados em microtubos com este tampão foram homogeneizados utilizando-se o mesmo homogenizador dos ensaios de extração do RNA. Os extratos obtidos foram armazenados a -20°C .

A concentração de proteína foi determinada através do kit *BCA™ Protein Assay Kit* (Pierce) Este kit é uma formulação baseada no método do ácido bicinrônico (BCA) para a detecção colorimétrica e quantificação de proteína total (SMITH *et al.*, 1985). Uma série de diluições de soroalbumina bovina (BSA) de concentração conhecida ($25\mu\text{g/ml}$ a $2.000\mu\text{g/ml}$) foi preparada e testada juntamente com as amostras de concentração desconhecida, de acordo com as instruções do fabricante. A reação produzida por este método exibe uma forte absorbância em 562nm que é linear com as concentrações protéicas crescentes em um intervalo de 20 a $2000\mu\text{g/ml}$. Desta forma, após a leitura da absorbância de todas as reações, a concentração protéica das amostras purificadas foi determinada a partir da curva padrão construída através das diluições de BSA.

3.4.10 *Western Blotting* (Imunodeteção)

Para os ensaios de imunodeteção da metalotioneína as amostras de proteína foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE, LAEMMLI, 1970). Tais amostras foram aplicadas em um gel de empilhamento de 5% de

poliacrilamida sendo resolvidas em um gel de tricina 16% de acrilamida/bisacrilamida, já que a proteína metalotioneína apresenta baixa massa molecular de cerca de 6kDa. Secou-se as amostras em Speed Vac®Plus, ressuspendendo-as em 15µl de água estéril e foi adicionado o tampão da amostra desnaturante contendo β-mercaptoetanol (Tris-HCl 125mM pH 6,8, SDS 4%, 0,025% azul de bromofenol, glicerol 20%, 0,1M β-mercaptoetanol). Essas amostras foram colocadas em banho seco a 100°C por 10 minutos e em seguida aplicadas ao gel e submetidas à eletroforese com uma corrente elétrica de 25mA e 110V, por aproximadamente 1,5h. Foi utilizado o marcador pré-corado BenchMark™Prestained Protein Ladder (Invitrogen). Como controle positivo foi utilizada a metalotioneína de fígado de coelho (Sigma – Aldrich, catálogo M5267).

Em seguida, as amostras corridas no gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose 0,2 micron 20x20 cm (Sigma-Aldrich), através do sistema de transferência semi-seca Trans-Blot®SD Semi-Dry transfer (Bio Rad), usando tampão de transferência Tris-HCl 48mM, glicina 39mM, metanol 20% pH 9,0 durante 1 hora a 20V. Após a transferência, as membranas foram incubadas em solução de bloqueio (leite desnatado 5%, Tween 20 0,5% em TBS 1X) durante 16 horas. Após esse período, a membrana foi lavada com TBS 1X (NaCl 1,4M, KCl 27mM, NaHPO₄ 100mM, KH₂PO₄, pH7,3) com Tween 20, por 3 vezes durante 15 minutos e incubada por 2 horas com o anticorpo primário policlonal anti-metalotioneína humana (Santa Cruz) na concentração 1:1000. Depois lavou-se a membrana por mais 3X de 15 minutos cada com TBS 1X com Tween 20 e incubou-se por mais 2 horas com o anticorpo anti-IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina (Santa Cruz). Foi repetida a fase de lavagem e a membrana foi revelada utilizando solução contendo o substrato cromogênico, BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indoilo-fosfato de p-toluidina) na presença de NBT (cloreto de nitroblue tetrazólico). A revelação foi interrompida por lavagem da membrana com água.

Para confirmar a eficiência da transferência, o gel de poliacrilamida foi corado com 0,25% de *Comassie Blue* R-250 (Sigma) dissolvido em 50% de isopropanol e 10% de ácido acético e a membrana de nitrocelulose foi corada com *Ponceau* 0,5% (m/v) em ácido acético 0,1% (v/v). As bandas referentes à proteína de interesse foram marcadas e a membrana descorada com ácido acético 0,1% (v/v) e o gel de poliacrilamida com 10% de ácido acético e 10% de metanol .

As amostras de proteína também foram submetidas a eletroforeses com gel de tricina sendo as bandas protéicas reveladas após a corrida incubando os géis em solução corante de 0,25%(v/v) de *Comassie Blue* R-250 (Sigma, USA) dissolvido em 50% (v/v) de isopropanol e 10% (v/v) de ácido acético durante 30 minutos e depois na solução descorante de 10% (v/v) de ácido acético e 10%(v/v) de metanol.

3.4.11 Imunoprecipitação

A imunoprecipitação foi utilizada como um ensaio mais sensível para a detecção da metalotioneína. Para tanto foi utilizada uma alíquota de 80µg de proteína e esta foi incubada com 1µl do anticorpo anti-metalotioneína humana concentrado. A mistura contendo a proteína com o anticorpo foi colocada em microtubo em um isopor com gelo e deixada em agitação por 1h. Posteriormente este isopor foi colocado a 4°C por aproximadamente 16h.

Após a incubação, foi adicionados 20µl da proteína AG-agarose e a mistura incubada por 2h coberta por gelo sob suave agitação. Centrifugou-se por 10 minutos a 12000rpm a 4°C. Retirou-se o sobrenadante e lavou-se o precipitado com tampão de lise (50mM de Tris-HCl pH7,4, 150mM de NaCl, 1,5mM de MgCl₂, 1,5mM de EDTA, 1% de Triton X-100 e 10% de

Glicerol) por 2X. Acrescentou-se 50µl de tampão da amostra com β-mercaptoetanol, e a amostra foi aquecida por 3 minutos a 90°C.

Repetiram-se os procedimentos do *Western Blotting*. Antes de correr a eletroforese, centrifugou-se em alta velocidade (13000rpm) por 5 minutos para retirar a partícula de AG-agarose.

O anticorpo secundário utilizado para este ensaio foi o anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (Sigma). Para a etapa de revelação foi necessária a permanência em sala escura. Foram utilizadas as soluções do kit Chemiluminescent Peroxidase Substrate (Sigma) para preparação da membrana. Esta foi envolvida em parafilm e colocada na placa para revelação (Amersham). Sobre a membrana foi colocado o HyperfilmTMECL (Amersham) e esperou-se 1 minuto para a sensibilização do filme. Este filme foi revelado passando primeiro na solução reveladora (Kodak Dental), em água, depois na solução fixadora (Kodak Dental) e novamente em água, deixando-se secar posteriormente.

4. RESULTADOS

Os animais utilizados para os experimentos não apresentavam anormalidades no comportamento, ausência de escamas ou qualquer alteração que pudesse indicar alguma patologia.

Os grupos controle e tratado da espécie *O. niloticus*, constavam inicialmente de cinco animais cada. Durante o desenvolvimento do experimento dois animais morreram, devido ao estresse da manipulação. Como o interesse do estudo com o grupo da tilápia foi como um experimento para otimização da metodologia, não se mostrou necessária a repetição do experimento com outros animais. Assim, as análises foram realizadas com três animais do grupo controle e cinco do grupo tratado.

Sabendo da possibilidade de se perder alguns animais na realização dos experimentos, para os ensaios com a espécie *P. lineatus* utilizou-se um número maior de indivíduos para que ao final houvesse ao menos dez animais de cada grupo. Assim, dos treze animais iniciais para cada grupo, utilizamos para as análises dez deles, visto que três de cada grupo morreram durante o desenvolver do procedimento experimental.

4.1 *Oreochromis niloticus*

O RNA total obtido foi verificado quanto a sua qualidade em gel de agarose 1% para RNA e a sua absorvância lida a 260 e 280nm. Com os valores das absorvâncias foi determinada a razão A260/A280 e todos os valores obtidos estavam a cima de 1,65 como é o indicado para se

ter uma amostra de boa qualidade, indicando maior teor de ácido nucléico do que proteína. A resolução em gel mostrou a presença de bandas indicando o RNA ribossomal, não apresentou DNA genômico, e por isso foi considerado de boa qualidade para realização dos experimentos (figura 9).

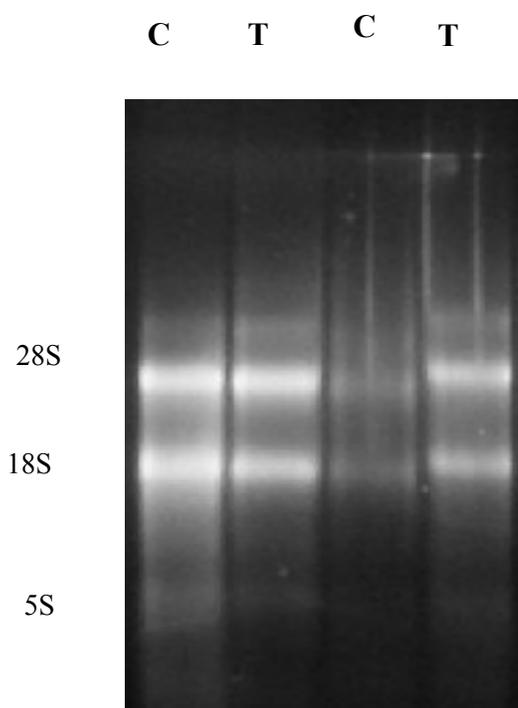


Figura 9 RNA total extraído de fígado de tilápia, resolvido em gel de agarose 1% para RNA, com amostras da extração dos grupos controle (C) e tratado (T).

A partir do RNA total foi realizada a produção de cDNA, molécula que é mais estável que o RNA, e por isso facilita sua manipulação nos ensaios realizados. Com esse cDNA então foi possível realizar o experimento de PCR amplificando apenas as seqüências de interesse, no caso a metalotioneína, graças à utilização dos *primers* específicos. Os resultados obtidos com a PCR foram resolvidos em gel de agarose 1% e estão apresentados na figura 10.

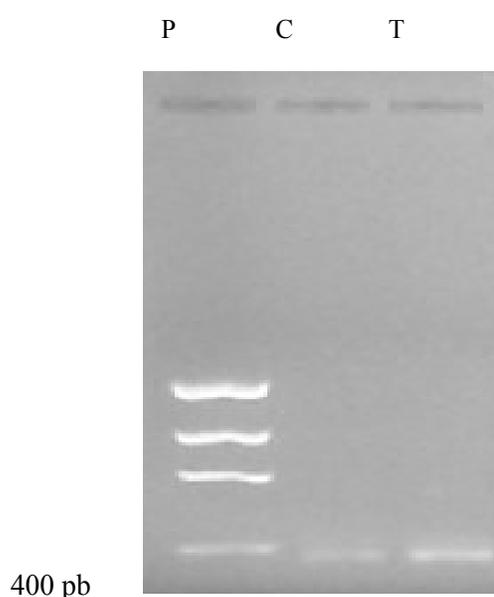


Figura 10: Amplificação do cDNA da metalotioneína de *O. niloticus*. Resultado representativo de eletroforese em gel de agarose 1%. P = padrão, C = controle, T = tratado. Bandas à aproximadamente 400 pares de bases.

O tamanho do fragmento encontrado (400pb) foi maior do que o fragmento traduzido da MT presente na literatura. Porém, o *primer* Adaptador se liga na região 3' UTR, ou seja, na porção 3' não transcrita, e espera-se que o fragmento obtido pela PCR contenha parte desta região, e por isso, seja maior.

Foi realizada em seguida a purificação das bandas dos géis e mandadas para sequenciamentos no Laboratório de Cristalografia do Departamento de Biofísica da USP, Campus São Carlos. As seqüências de nucleotídeos obtidas, que estão mostradas abaixo, foram analisadas utilizando-se a ferramenta Blast do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) o que nos garantiu que as bandas obtidas realmente se tratavam da metalotioneína, já que a seqüência apresentou 94% de similaridade com a seqüência do mRNA de *O. mossambicus*, outra espécie de tilápia.

Seqüenciamento de aminoácidos correspondentes ao N-terminal da metalotioneína:

NPPPPKXXXXGPEDELRRCTCTKCSCKSCKKSCCDCCPSGCSKCASGCVCKGKTCDT
SCCQ&

Pelo programa GeneRunner a seqüência de nucleotídeo obtida foi traduzida em aminoácidos e foi feito o alinhamento dessa seqüência com a seqüência da MT de *O. mossambicus* presente no GenBank, mostrando grande similaridade entre as elas (figura 11).

	1	10	20	30	40	50	60	63																																																					
	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----																																																												
<i>O. mossambicus</i>	N	D	P	C	E	C	A	K	T	G	T	C	N	C	G	-	G	S	C	S	T	K	C	S	C	K	S	C	K	S	C	C	D	C	C	P	S	G	C	S	K	C	A	S	G	C	V	C	K	G	K	T	C	D	T	S	C	C	Q		
<i>O. niloticus</i>	N	P	P	P	K	K	X	X	X	X	G	P	E	D	E	L	R	R	C	T	C	T	K	C	S	C	K	S	C	K	S	C	C	D	C	C	P	S	G	C	S	K	C	A	S	G	C	V	C	K	G	K	T	C	D	T	S	C	C	Q	
Consensus	.	.	n	d	P	c	e	a	k	t	G	p	c	#	c	e	.	r	r	C	s	C	T	K	C	S	C	K	S	C	K	S	C	C	D	C	C	P	S	G	C	S	K	C	A	S	G	C	V	C	K	G	K	T	C	D	T	S	C	C	Q

Figura 11: Alinhamento das seqüências traduzidas da metalotioneína das espécies *O. mossambicus*, presente no GenBank, e *O. niloticus*, obtida a partir do sequenciamento.

Como pôde-se observar a extremidade N-terminal da seqüência obtida não foi totalmente resolvida, e os Xs indicam aminoácidos que não foram seqüenciados, que é o sítio de ligação do *primer* Forward. Por essa razão, foram feitas tentativas de clonagem, visando um melhor sequenciamento da MT.

4.1.1 PCR quantitativo

As análises quantitativas da expressão da metalotioneína foram feitas pela metodologia de PCR em tempo real, onde foram obtidos os valores de Ct em duplicata e calculada a média desses valores para cada indivíduo, como mostrado na tabela 3 (média dos Cts). Na tabela também estão indicadas as médias de Cts do gene normalizador GAPDH. Os demais valores presentes nessas tabelas são os cálculos para se chegar aos valores de expressão de cada indivíduo (UA, unidades

arbitrárias). O produto da qPCR de tilápia foi resolvido em gel de agarose 1%, mostrado na figura 12 para determinação da sua massa molecular, que era coincidente com a esperada de 400pb. A figura 13 apresenta a expressão do gene de GAPDH nos mesmos tecidos, usada para normalização dos dados.

Planilha - Tilápia							
Controle GAPDH		Controle MT		DCt	DDCt	UA	Média S 1.101667
	Média Cts		Média Cts				
C1 Til GAPDH	20.96	C1 Til	21.66	0.7	-0.4016667	1.3210331	
C2 Til GAPDH	19.325	C2 Til	20.845	1.52	0.4183333	0.7482886	
C3 Til GAPDH	19.595	C3 Til	20.68	1.085	-0.0166667	1.0116194	
Tratado GAPDH							
Tratado GAPDH		Tratado MT		DCt	DDCt	UA	
	Média Ct		Média Ct				
T1 Til GAPDH	23.435	T1 Til	15.705	-7.73	-8.8316667	455.61349	
T2 Til GAPDH	18.08	T2 Til	17.175	-0.905	-2.0066667	4.0185267	
T3 Til GAPDH	18.26	T3 Til	15.32	-2.94	-4.0416667	16.468836	
T4 Til GAPDH	19.14	T4 Til	17.38	-1.76	-2.8616667	7.2685453	
T5 Til GAPDH	17.89	T5 Til	17.64	-0.25	-1.3516667	2.5520678	

Tabela 3: Análise da expressão da metalotioneína de *O. niloticus* pelo PCR em tempo real. A média dos Cts indica a média entre os valores da duplicata. O DCt, ou delta Ct, é a média de Ct da metalotioneína (MT) – (menos) a média de Ct do GAPDH. A Média S é a média dos valores de DCt dos controles. O DDCt (delta delta Ct) é o valor do DCt – (menos) a Média S. O UA, é o valor da expressão da MT em cada indivíduo e é calculado por 2^{-DDCt} .

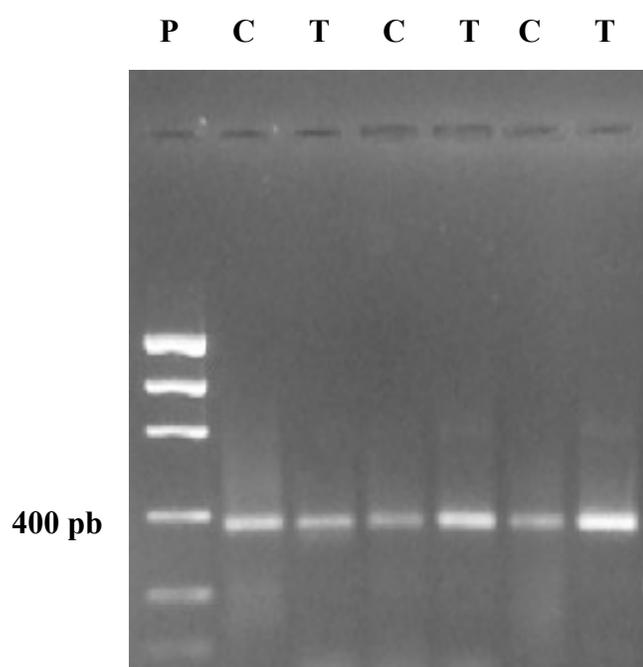


Figura 12 PCR quantitativo da MT de tilápia, resolvido em gel de agarose 1%. P: padrão *Low DNA Mass Ladder*, C: animais do grupo controle, T: animais do grupo tratado.

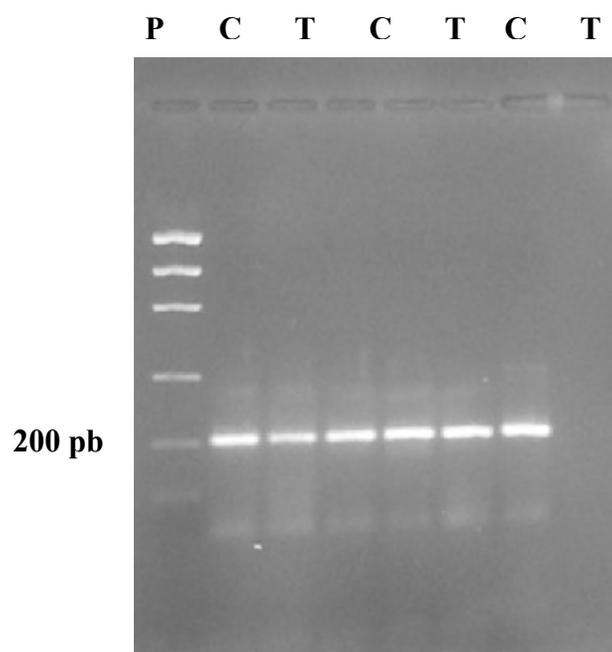


Figura 13 PCR quantitativo para GAPDH de tilápia, resolvido em gel de agarose 1%. P: padrão *Low DNA Mass Ladder*, C: animais do grupo controle, T: animais do grupo tratado.

Os testes estatísticos para análise dos dados de PCR quantitativo utilizaram o programa estatístico SAS Interprise Guide. Para as análises com os dados referentes à espécie *O. niloticus* os valores extremos de expressão da MT foram excluídos. As análises descritivas para esta espécie estão indicadas na tabela 4 e na figura 14. Foi feito o Teste T para verificar se a diferença entre os grupos controle e tratado era significativa. A hipótese para o Teste T foi de igualdade entre os grupos, e com 95% de confiança o teste indicou que a diferença entre os grupos é significativa, sendo o valor de $T = -2,56$, ou seja, o módulo do valor de T sendo maior do que 2,0 rejeita-se a hipótese de igualdade.

TILÁPIA	Grupo C	Grupo T
N	3	3
Média	1,027	4,613
Mediana	1,0116	4,018
Variância	0,08219	5,826
Desvio Padrão	0,2867	2,414

Tabela 4: Análise descritiva dos valores da expressão da MT (UAs) de tilápia.

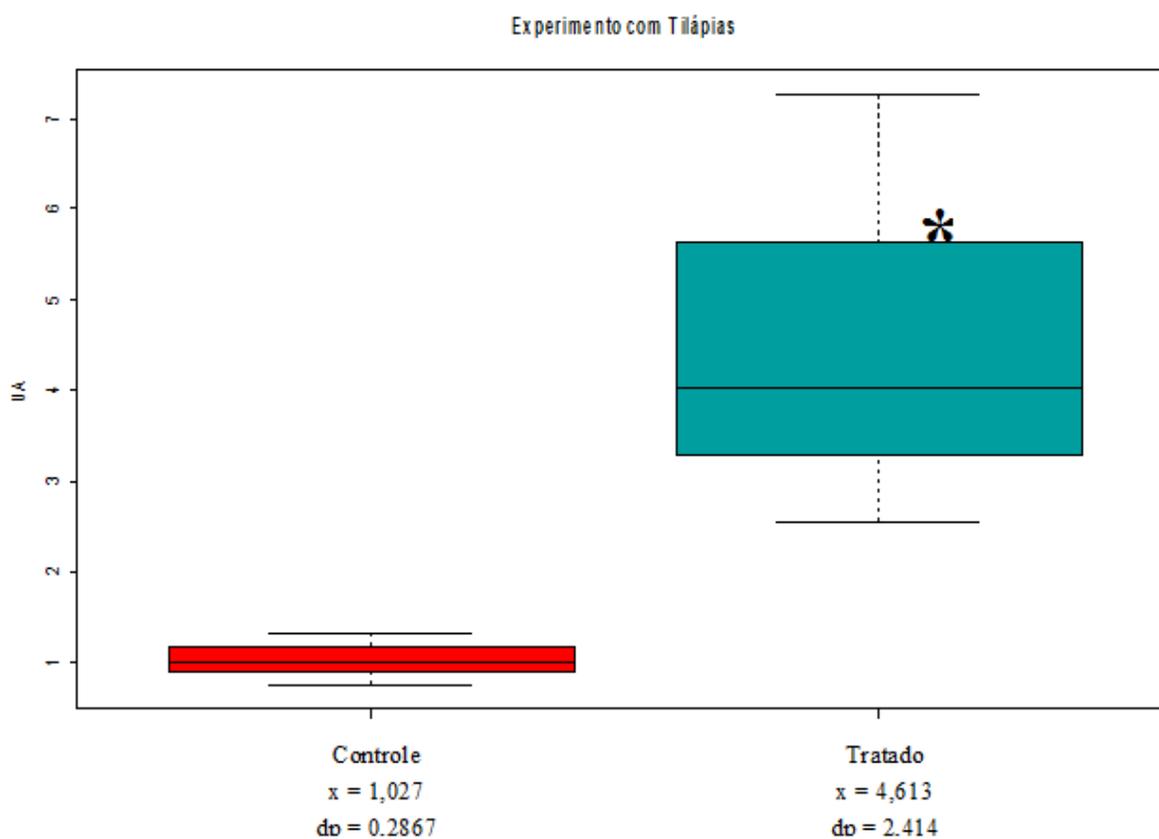


Figura 14 Diagrama de caixas e suíças representando os resultados de expressão da MT nos grupos controle e tratado de tilápia. Os valores da média (x) e desvio padrão (dp) estão apresentados. O * representa diferença estatisticamente significativa, com valor de $t=-2,56$.

4.1.2 Tentativas de Clonagem

Quanto aos ensaios de clonagem da MT de tilápia, apenas foram obtidas colônias brancas quando se utilizou o kit do Topo. Ao realizar a minipreparação foram observadas em gel de agarose 1% bandas correspondentes aos plasmídeos, porém quando feita a digestão e resolvida em gel não se observou o inserto correspondente à sequência da metalotioneína.

4.1.3 Identificação protéica da MT

A análise da expressão proteica da metalotioneína envolveu sua extração por homogenização com tampão Hepes e posterior quantificação do extrato proteico por BCA. Foram utilizados 80 μ g de proteína de cada extrato para os ensaios de SDS-PAGE, mostrando uma grande quantidade de proteínas (figura 15).

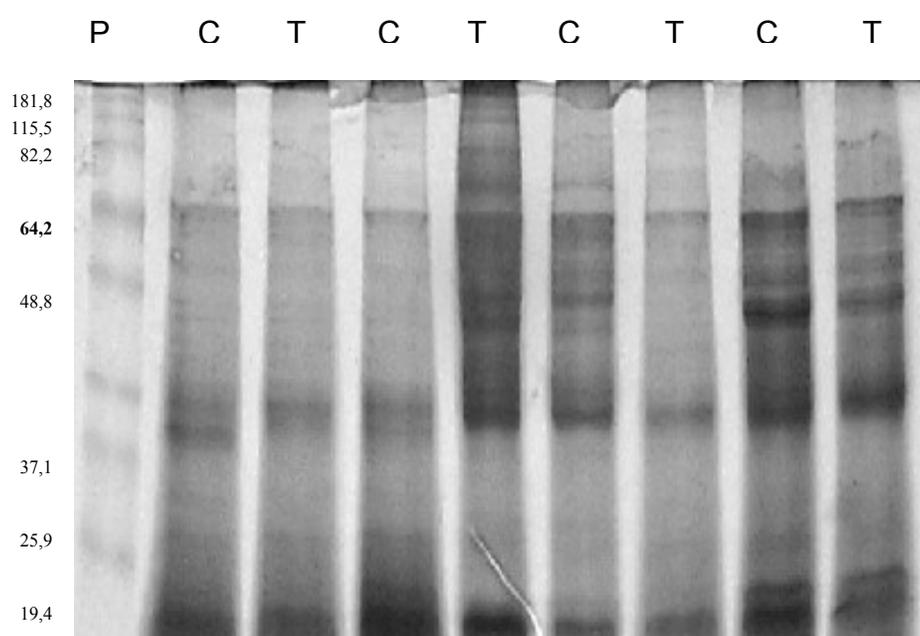


Figura 15 SDS-PAGE dos extratos protéicos do fígado de tilápia. Gel de Tricina com 16% de Acrilamida/Bisacrilamida. Corado com *Comassie Blue*. P: padrão de proteína pré-corado (kDa), C: animais do grupo Controle de tilápia, T: animais do grupo Tratado da tilápia.

O *Western Blotting* apresentou resultado, porém não o esperado. Abaixo, a figura 16 mostra a membrana de Nitrocelulose após incubação com os dois anticorpos e corada com Tampão de Fosfatase alcalina, com BCiP e NBT. As bandas apresentadas se encontram com maior massa do que o esperado, estando na altura de aproximadamente 70kDa, quando era esperado que estivessem entre 6 e 7 kDa.

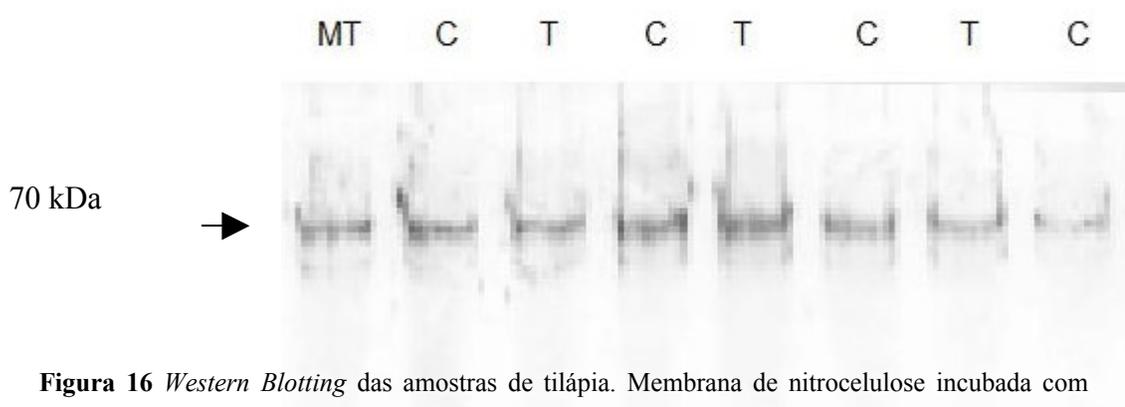


Figura 16 *Western Blotting* das amostras de tilápia. Membrana de nitrocelulose incubada com anti-MT humana e com anti-IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina. MT: metalotioneína purificada (Sigma-Aldrich), C: grupos controles da tilápia, T: grupos tratados da tilápia.

Um método de maior sensibilidade, a imunoprecipitação, também foi realizado. O anticorpo usado para esse ensaio foi o anti-IgG de coelho conjugado com a Peroxidase. Foi revelado no escuro e o resultado mostrou a presença de bandas, porém também de alta massa molecular, não indicando ser a MT (figura 17).

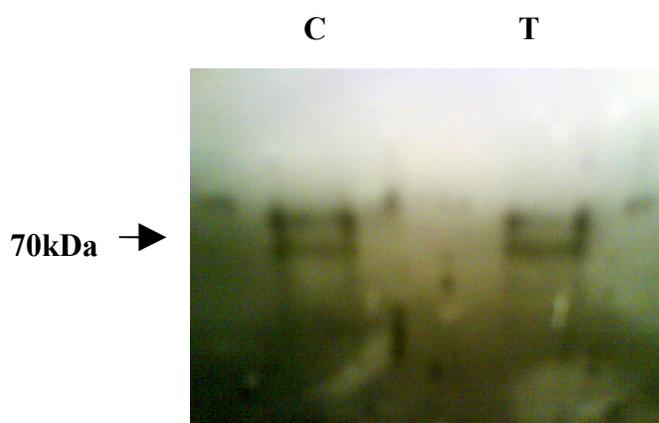


Figura 17 Ensaio de imunoprecipitação com tilápia. C: controle, T: tratado.

Apesar da conservação da MT e da similaridade entre as MTs humana, de coelho (controle positivo usado) e de peixes (figura 18) é possível que as diferenças existentes possam ser uma explicação para o resultado negativo do *Western Blotting*, justificando o não reconhecimento da MT de peixe pelo anticorpo anti-MT humana.

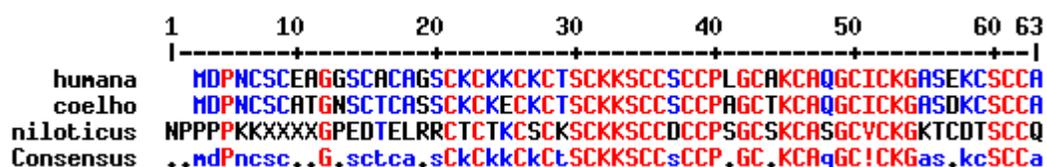


Figura 18 Alinhamento da MT de *O. niloticus* com as MTs humana e de coelho.

4.2 *Prochilodus lineatus*

Os experimentos realizados com o curimatá (*P. lineatus*), foram os mesmos realizados com a tilápia. O RNA total foi verificado quanto a sua qualidade em gel de agarose 1% com formaldeído para RNA e a sua absorbância lida a 260 e 280nm. Foi calculada uma razão A260/A280 com as absorbâncias e todos os valores obtidos estavam a cima de 1,65 como é o indicado. A resolução em gel mostrou a presença de bandas indicativas de RNA ribossomal e a ausência de DNA genômico detectável (figura 19).

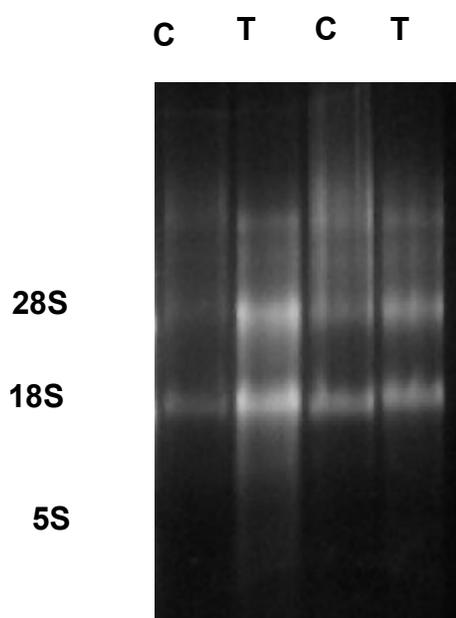


Figura 19 Análise das preparações de RNA total em gel de agarose 1% para RNA, com amostras da extração dos grupos controle (C) e tratado (T) de curimatá.

O cDNA foi sintetizado a partir do RNA total e utilizado na realização do experimento de PCR, usando os mesmos *primers* que para os experimentos com tilápia. Os resultados da PCR foram resolvidos em gel de agarose 1% e estão apresentados na figura 20.

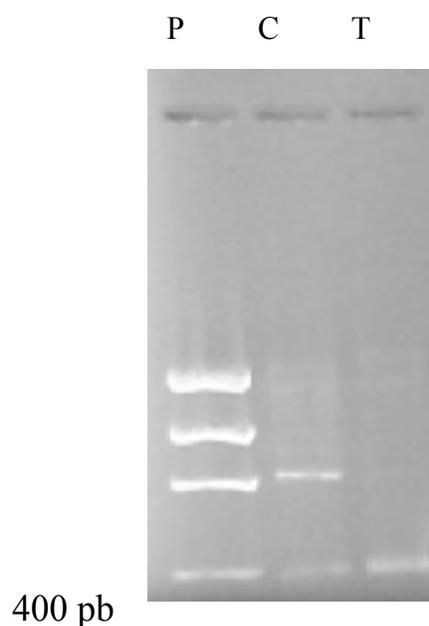


Figura 20 Amplificação do cDNA da MT de curimbatá, resolvida em gel de agarose 1% do produto de PCR das amostras de cDNA, obtido a partir de extração de RNA total de amostras de fígado de *P. lineatus*. P = padrão, C = controle, T = tratado. Banda a aproximadamente 400 pares de bases.

As bandas próximas a 400 pares de bases foram recortadas do gel e mandadas para o sequenciamento na USP. Assim como da tilápia, a seqüência obtida de curimbatá foi maior do que a seqüência traduzida da MT, devido ao fato do *primer* Adaptador se ligar na posição 3' UTR e a seqüência que se obteve conter uma grande porção de seqüência que não é traduzida. A seqüência de nucleotídeos obtida também foi comparada com as seqüências do GenBank e apresentou 80% de similaridade com as seqüências da metalotioneína de *Trematomus bernacchii*.

Seqüenciamento dos aminoácidos correspondentes ao N-terminal da MT de curimbatá:

XYRHLXYLSLSNCTNCTCKCCPCCPSSCSKASGCVCGKTCDS SCSVTP

A tradução de nucleotídeos para aminoácidos também foi feita pelo GeneRunner, seguida do alinhamento com seqüências da MT de outros peixes, o *Trematomus bernacchii* e *O. mossambicus*, conforme mostra a figura 21. A seqüência obtida não está completamente resolvida, e por isso a tentativa de clonagem, mas mesmo assim consegue-se observar uma manutenção das posições do aminoácido Cys, que é uma característica marcante da metalotioneína.

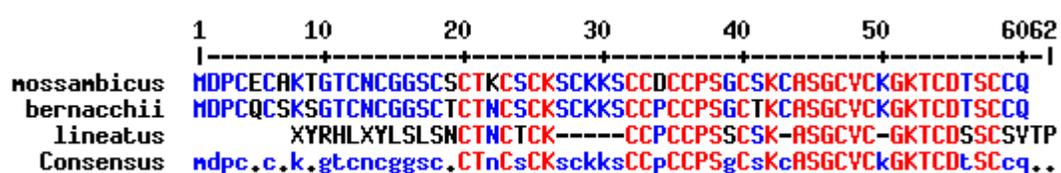


Figura 21 Alinhamento das seqüências traduzidas da metalotioneína das espécies *O. mossambicus* e *Trematomus bernacchii*, presentes no GenBank, e *P. lineatus*, obtida a partir do sequenciamento.

4.2.1 PCR quantitativo

Sabendo-se que a metalotioneína corresponde à banda encontrada na PCR, fez-se os ensaios de PCR em tempo real com os mesmos *primers* da convencional, para poder quantificar a expressão da MT nos dois grupos de curimatá. Os valores obtidos e cálculos feitos para se chegar à expressão estão indicados na tabela 5, inclusive os valores do gene normalizador GAPDH. A figura 22 mostra o qPCR para o gene da MT de curimatá e a figura 23 apresenta o qPCR do gene GAPDH para os mesmos tecidos.

Planilha - Curimbata						
Controle GAPDH	Controle MT		DCt	DDCt	UA	Média S
	Média Ct	Média Ct				7.0145
C1 Cur GAPDH	14.555	C1 Cur	19.88	5.325	-1.6895	3.225449
C2 Cur GAPDH	15.08	C2 Cur	19.355	4.275	-2.7395	6.6783884
C3 Cur GAPDH	14.495	C3 Cur	24.52	10.025	3.0105	0.1240935
C4 Cur GAPDH	17.23	C4 Cur	25.4	8.17	8.17	0.003472
C5 Cur GAPDH	15.215	C5 Cur	23.88	8.665	8.665	0.0024636
C6 Cur GAPDH	17.32	C6 Cur	23.535	6.215	6.215	0.0134617
C7 Cur GAPDH	14.68	C7 Cur	22.05	7.37	7.37	0.0060452
C8 Cur GAPDH	14.81	C8 Cur	21.585	6.775	6.775	0.0091311
C9 Cur GAPDH	14.09	C9 Cur	22.885	8.795	8.795	0.0022513
C10 Cur GAPDH	16.035	C10 Cur	20.565	4.53	4.53	0.0432847
Tratado GAPDH	Tratado MT		DCt	DDCt	UA	
	Média Ct	Média Ct				
T1 Cur GAPDH	14.87	T1 Cur	21.085	6.215	-0.7995	1.7404978
T2 Cur GAPDH	16.44	T2 Cur	22.25	5.81	-1.2045	2.3045739
T3 Cur GAPDH	14.68	T3 Cur	21.975	7.295	0.2805	0.8233056
T4 Cur GAPDH	16.26	T4 Cur	21.39	5.13	-1.8845	3.6922494
T5 Cur GAPDH	15.64	T5 Cur	21.12	5.48	-1.5345	2.8968802
T6 Cur GAPDH	18.595	T6 Cur	23.59	4.995	4.995	0.0313585
T7 Cur GAPDH	14.81	T7 Cur	16.85	2.04	2.04	0.2431637
T8 Cur GAPDH	14.915	T8 Cur	18.525	3.61	3.61	0.0818996
T9 Cur GAPDH	16.61	T9 Cur	21.505	4.895	4.895	0.0336092
T10 Cur GAPDH	17.995	T10 Cur	21.76	3.765	3.765	0.0735567

Tabela 5 Análise da expressão da metalotioneína de *P. lineatus* pelo PCR em tempo real. A média dos Cts indica a média entre os valores da duplicata. O DCt, ou delta Ct, é a média de Ct da metalotioneína (MT) – (menos) a média de Ct do GAPDH. A Média S é a média dos valores de DCt dos controles. O DDCt (delta delta Ct) é o valor do DCt – (menos) a Média S. O UA, é o valor da expressão da MT em cada indivíduo e é calculado por 2^{-DDCt} .

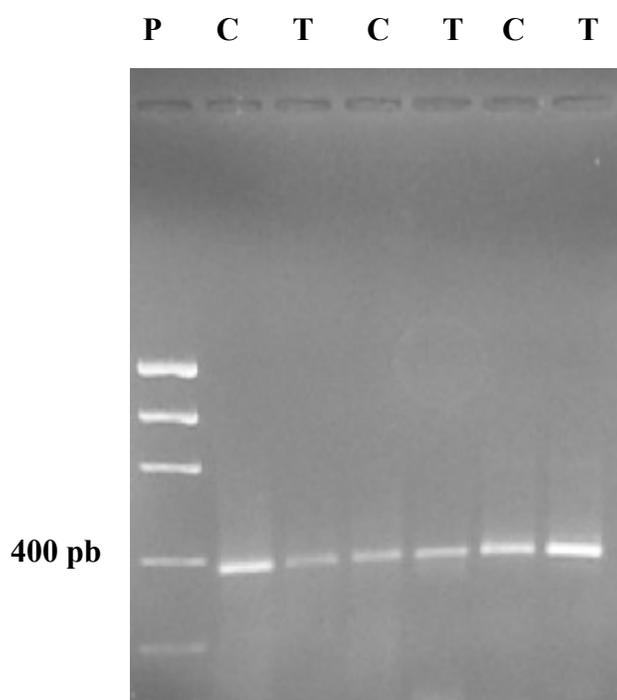


Figura 22 PCR quantitativo com MT de curimbata, resolvido em gel de agarose 1%. P: padrão *Low DNA Mass Ladder*, C: animais do grupo controle, T: animais do grupo tratado.

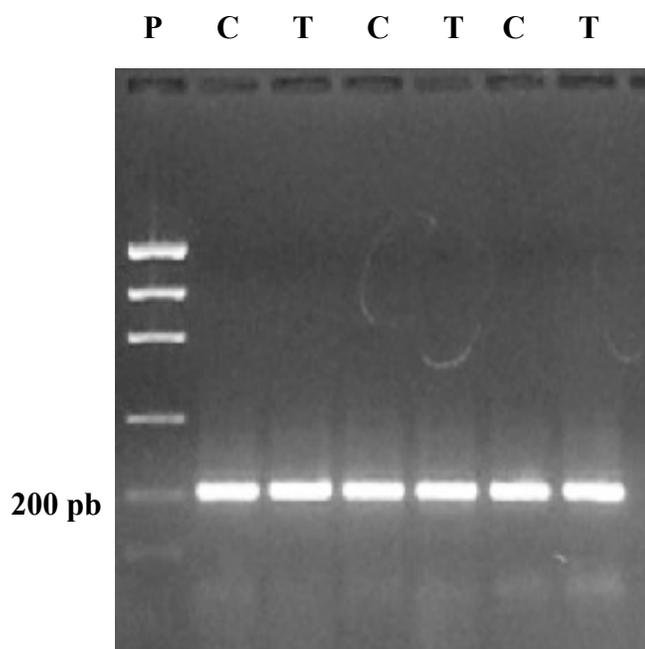


Figura 23 PCR quantitativo de GAPDH de curimatá, resolvido em gel de agarose 1%.
P: padrão *Low*, C: animais do grupo controle, T: animais do grupo tratado.

Os testes estatísticos para analisar os dados obtidos com PCR quantitativo, foi utilizando o programa estatístico SAS Interprise Guide. As análises descritivas para esta espécie mostraram haver dois pontos muito extremos em relação à maioria dos valores do grupo controle. Com a rejeição desses pontos os resultados obtidos estão indicados na tabela 6 e representados na figura 24. Foi feito o Teste T para verificação da significância da diferença entre os grupos C e T, e com 95% de confiança a diferença é significativa. O valor de t foi -2,24, portanto seu módulo foi maior que 2 rejeitando a hipótese de igualdade dos grupos.

CURIMBATÁ	Grupo C	Grupo T
N	8	10
Média	0,0255	0,9143
Mediana	0,0076	0,2432
Variância	0,0018	1,245
Desvio Padrão	0,042	1,12

Tabela 6 Análise descritiva dos valores da expressão da MT (UAs) de curimatá.

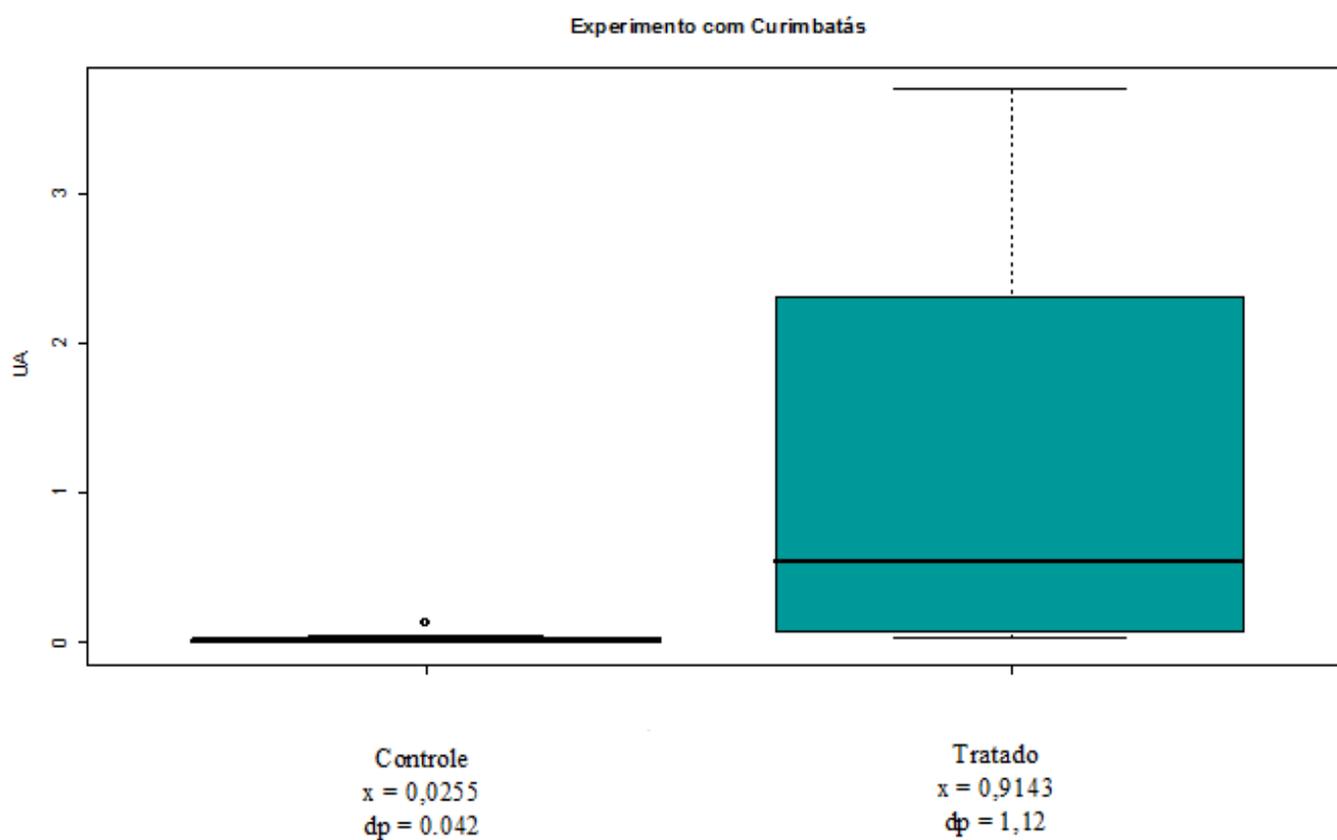


Figura 24 Diagrama de caixas e suíças representando os resultados de expressão da MT nos grupos controle e tratado de curimatá. Os valores da média (x) e desvio padrão (dp) estão apresentados. O * representa diferença estatisticamente significativa, com valor de $t=-2,24$.

4.2.2 Tentativas de Clonagem

Quanto aos ensaios de clonagem utilizando o gene da MT de curimatá, estes não mostraram resultados. Não houve crescimento de colônias nas placas com meio LB.

4.2.3 Identificação protéica da MT

Para as análises da expressão proteica da metalotioneína dessa espécie, fez-se a extração de proteínas por homogenização com tampão Hapes e quantificação por BCA. Utilizou-se 80 μ g

de proteína de cada extrato para os ensaios de SDS-PAGE, apresentando grande quantidade de proteína (figura 25).

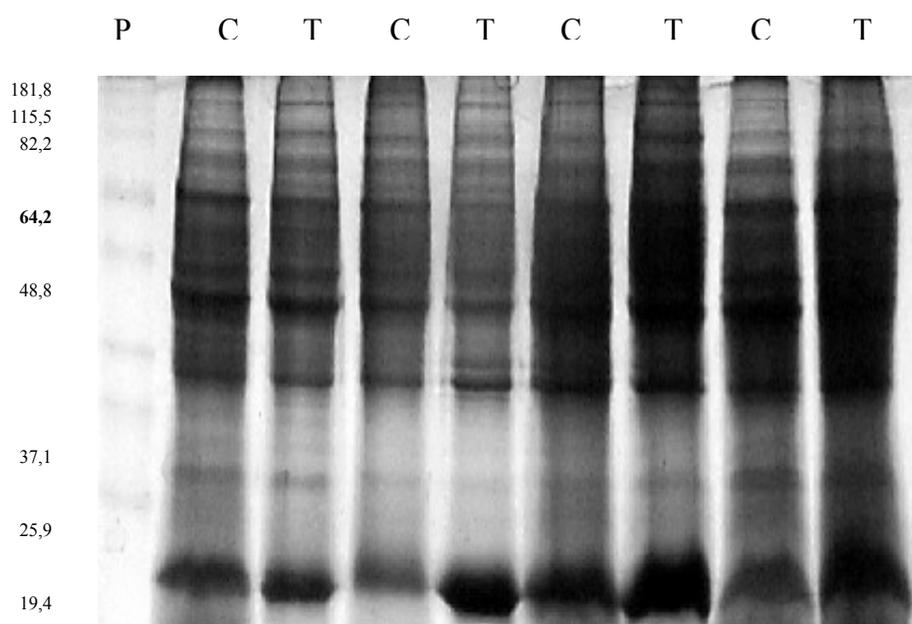


Figura 25 SDS-PAGE dos extratos proteicos de fígado de curimatá. Gel de tricina com 16% de Acrilamida/Bisacrilamida. Corado com *Comassie Blue*. P: padrão de proteína pré-corado, C: animais do grupo controle, T: animais do grupo tratado.

As proteínas resolvidas em gel de poliacrilamida com tricina foram transferidas para membrana de nitrocelulose para realização dos ensaios de *Western Blotting*. Foram visualizadas bandas, porém de grande massa molecular, aproximadamente 70kDa, e esperava-se a metalotioneína com 6 a 7 kDa (figura 26).



Figura 26 *Western blotting* para detecção de MT em extratos protéicos de fígado de curimatá. Membrana de nitrocelulose incubada com anti-MT humana e com anti-IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina. C: grupos controles, T: grupos tratados.

Assim como para os ensaios proteicos com tecidos de tilápia, uma possível explicação para a não detecção da MT como esperado seja a utilização de um anticorpo anti-MT humana para tecido de peixe. E apesar de certa similaridade (figura 27) pode não ter reconhecido a proteína de peixe.

	1	10	20	30	40	50	6062
	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----						
humana	MDPNCSC E AGG S CACAG S CKCK K CT S CK K SCC S CC P L G CA K CA Q G C IC-K G ASE K C S CCA						
coelho	MDPNCSCAT G NS C TCA S SK C KE C KT S CK K SCC S CC P AG C T K CA Q G C IC-K G AS D K C S C CA						
lineatus	XYRHLXYLSLS N CT N CT C CK C CP C CP S SK-AS G C V CG K TC D SS C S V TP						
Consensus	mdpncsc..g.sc.ca.sckck.ckCTsCkksCCsCCP.gC.KcAqGC!C.Kgas.kCScca						

Figura 27 Alinhamento da MT de *P. Lineatus* com a MT humana e de coelho.

5 DISCUSSÃO

A metalotioneína é bastante estudada em trabalhos de biomonitoramento de poluição ambiental. Seu estudo em peixes geralmente está associado ao monitoramento de ambientes aquáticos quanto à exposição a metais. Com relação a mensuração da concentração de metais em águas ou sedimento, diferentes métodos têm sido propostos e testados, como a caracterização do acúmulo de metais em diferentes órgãos ou tecidos, que tem provado ser uma mensuração representativa (KNAPEN *et al.*, 2007). Porém, a utilização de bioindicadores, como a metalotioneína, tem se mostrado de grande importância para os estudos de poluição por metais. Alguns diferentes métodos de análise da MT são utilizados, tais como a cromatografia líquida de alta resolução (HPLC), métodos de saturação de metais, ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) e *Western Blotting*. Cada um desses métodos é capaz de mensurar a da proteína MT (WERNER *et al.*, 2008).

Os ensaios com os extratos proteicos deste trabalho mostraram um resultado diferente do esperado. A banda marcada nos experimentos de *Western Blotting* corresponde a uma massa muito maior do que a correspondente à metalotioneína. Algumas hipóteses podem ser levantadas, como a ocorrência de uma reação cruzada do anticorpo, ou que a quantidade de MT seja pequena e por isso não foi possível detectá-la, ou ainda que foi difícil sua transferência para a membrana de nitrocelulose. Além disso, é preciso levar em consideração o fato de que o anticorpo utilizado é humano e os tecidos são de peixes, e mesmo com tamanha conservação da MT, pode ser que o anticorpo não tenha reconhecido a MT de peixe, ou que isso aumente a possibilidade da ocorrência de reações cruzadas.

Alguns trabalhos mostram que o aumento da expressão do mRNA da MT não coincide com aumento no nível proteico, e que mecanismos pós-transcricionais sejam importantes para definir a expressão da proteína (VASCONCELOS *et al.*, 2002; VERGANI *et al.*, 2007). Assim, apesar do mRNA de MT estar expresso em ambos os grupos, talvez o nível desta proteína ainda seja muito pequeno para possibilitar sua detecção, mesmo com a exposição a metais.

Os trabalhos mais recentes têm se interessado na mensuração do RNA mensageiro da MT como um bioindicador potencialmente mais responsivo a exposição a metais, que também permitiu o estudo de cada isoforma separadamente, o que não é possível nos estudos da proteína (CERATTO *et al.*, 2002; KNAPEN *et al.*, 2007; WERNER *et al.*, 2008). Os métodos mais comumente utilizados para analisar o mRNA da MT têm sido por *Northern Blot* (SCUDIERO *et al.*, 1996), por RT-PCR (reação em cadeia da polimerase por transcriptase reversa) (SCHLENK *et al.*, 1997; CERATTO *et al.*, 2002), e mais recentemente por PCR em tempo real (VERGANI *et al.*, 2007; WERNER *et al.*, 2008). Esta última abordagem, PCR quantitativo, tem sido sugerida como um método mais sensível para a análise da MT. Neste trabalho pôde-se constatar o uso de qPCR como uma boa ferramenta nos estudos do gene da MT, chegando a resultados com significância estatística.

Ao se comparar as metalotioneínas de diferentes organismos, percebe-se uma alta conservação evolutiva, sobretudo no seu conteúdo de cisteína (HAQ *et al.*, 2003). Os resultados deste trabalho vieram reafirmar este fato, onde a utilização de *primers* que se associam a posições tão conservadas permitiu analisar as seqüências da metalotioneína de espécies não estudadas anteriormente. O sucesso da análise da expressão do mRNA da metalotioneína em curimatá, especialmente, se deu justamente pela manutenção da estrutura genética dessa molécula. Ao se analisar as seqüências obtidas em relação às já estudadas (alinhamentos nas figuras 11 e 21)

percebe-se que o rico conteúdo do aminoácido cisteína é mantido em diferentes espécies, mostrando a importância da MT nos processos envolvendo metais, já que esta função lhe é conferida pela presença das Cys em sua estrutura.

Para a análise da expressão do gene da MT é necessária a utilização de um *primer* adaptador (CHAN, 1994; SCUDIERO *et al.*, 1997; SCHLENK *et al.*, 1997). Para se expressar o mRNA desta molécula é preciso a utilização de um adaptador poli-T para a produção do cDNA, do qual se pretende analisar o gene da MT. Também para a amplificação é necessária a utilização do adaptador (sem a cauda poli-T) e mais o *primer Forward*, desenhado para se ligar a extremidade N-terminal da MT, que é um domínio conservado em MTs de peixes (CHAN, 1994). A utilização dos *primers* Adaptador poli-T e do Adaptador, foi imprescindível para se conseguir analisar a expressão da MT neste trabalho.

Seria interessante insistir nos ensaios de clonagem para se completar as seqüências aqui obtidas. Mas percebemos com os resultados apresentados que o estudo da metalotioneína é possível para diferentes espécies, utilizando inclusive os mesmos *primers*. Para estudos de diferentes isoformas, sobretudo da espécie *P. lineatus*, seria necessário o desenho de *primers* mais específicos. Os estudos com tilápia têm indicado a ocorrência de apenas uma isoforma (CHAN, 1994; REN *et al.*, 2006)

O uso do cloreto de zinco neste trabalho se deu pelo fato de estar relatado na literatura que este é o metal que mais aumenta a expressão da metalotioneína, comparado ao cádmio e ao cobre (CHAN, 1994; KNAPEN *et al.*, 2007). Acredita-se que isto ocorra justamente porque o próprio zinco se liga diretamente ao fator de transcrição MTF-1, que induz a expressão da MT por ligação aos elementos de resposta a metais (MREs), enquanto que a indução por outros metais dependem de vias indiretas, como o deslocamento do zinco ou por estresse oxidativo (HAQ *et al.*,

2003; BOURDINEAUD *et al.*, 2006). Mesmo sendo o zinco um metal essencial, a maioria dos organismos vivos só precisa de doses relativamente baixas para seu funcionamento normal. Quando em excesso o zinco, bem como o cobre, torna-se tóxico e perigoso para o organismo (ROCHA *et al.*, 1985).

Diferentes estudos mostram a metalotioneína mais expressa quando na presença de metais (LINDE *et al.*, 2001; KNAPEN *et al.*, 2007; SCHMITT *et al.*, 2007). Os resultados aqui apresentados confirmam esse aumento da expressão. A utilização da técnica de PCR em tempo real se mostra sensível e eficiente para esse tipo de estudo. Mesmo com número pequeno de amostras para as duas espécies, sendo ainda menor para tilápia, foi possível constatar diferença estatisticamente significativa entre os grupos controles e tratados com metais. Além disso, como ambos os grupos de estudo, C e T, das duas espécies estudadas, foram submetidos ao estresse durante o desenvolvimento dos experimentos, deve-se considerar alguma contribuição do estresse para a expressão da MT, tanto para controles como para os tratados. Apesar de os peixes apresentarem um tamanho semelhante, alguns eram um pouco maiores e a manipulação era mais difícil, causando um estresse ainda maior. Sabe-se que o gene da MT conta com uma seqüência responsiva a glicocorticóides e, portanto, sua indução também é responsiva ao estresse, que aumenta o nível de hormônio no organismo (VERGANI *et al.*, 2007). Isso pode justificar os valores extremos de expressão da MT de alguns animais quando comparados aos animais do mesmo grupo.

A maioria dos estudos realizados em peixes para avaliação da expressão do gene da MT tem sido restrita a estudos laboratoriais, em que espécies são artificialmente expostas a metais, no intuito de reproduzir o que ocorre no meio natural. Para estudos em populações naturais é preciso levar em consideração outros fatores como a temperatura da água, idade, sexo e variações

sazonais, que podem influenciar a expressão da metalotioneína (WERNER *et al.*, 2008). Por isso, um número bastante limitado de pesquisas efetivamente determina os níveis da MT em populações naturais expostas a metais (KNAPEN *et al.*, 2007).

Assim, percebe-se a importância de se realizar estudos laboratoriais minuciosos para, cada vez mais, precisar a influência dos metais nos níveis de expressão gênica da metalotioneína em diferentes organismos, de forma a possibilitar estudos mais eficientes em populações de ambientes naturais.

6. CONCLUSÕES

Com os dados obtidos neste trabalho podemos concluir que:

A metalotioneína mantém sua estrutura gênica conservada o suficiente para que estudos com diferentes espécies possam ser feitos usando como base seqüências já conhecidas de outras espécies.

O seqüenciamento do gene da MT de curimbatá possibilita que esta espécie seja estudada no biomonitoramento de ambientes aquáticos, pela análise da expressão de sua MT por metais.

Frente a exposição a metais, em particular o zinco, a expressão gênica da metalotioneína está aumentada, com significativa diferença estatística, quando em comparação à animais que não tiveram contato com metais.

A qPCR pode ser utilizada como método rápido e confiável para a determinação de MT como biomarcador da contaminação de peixes por metais.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOURDINEAUD, J.P.; *et al.* Challenging the model for induction of metallothionein gene expression. **Biochim.**, v. 88, p. 1787-1792, 2006.

CAJARAVILLE, M.P., *et al.* The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. **Sci. Total Environ.**, v. 247, p. 295-311, 2000.

CARVALHO, C.S.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S.; FERNANDES, M.N. Hepatic metallothionein in a teleost (*Prochilodus scrofa*) exposed to copper at pH 4.5 and pH 8.0. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 137, p. 225-234, 2004.

CERATTO, N.; *et al.* Cloning and sequencing of a novel metallothionein gene in *Mytilus galloprovincialis* Lam. **Com. Biochem. Physiol.**, v. 131, p. 217-222, 2002.

CHAN, K.M.; *et al.* Molecular cloning of metallothionein cDNA and analysis of metallothionein gene expression in winter flounder tissues. **Can. J. Zool.**, v. 67, p. 2520-2527, 1989.

CHAN, K.M. PCR-Cloning of goldfish and tilapia metallothionein complementary DNAs. **Biochem. Biophys. Res. Com.**, v. 205, p. 368-374, 1994.

CHAN, P.C.; *et al.* Common carp metallothionein-1 gene: cDNA cloning, gene structure and expression studies. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1676, p. 162-171, 2003.

CHEUNG, L.A.P.; LAM, V.K.L.; CHAN, K.M. Tilapia metallothionein genes: PCR-cloning and gene expression studies. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1731, p. 191-201, 2005.

CHERIAN, M.G.; JAYASURYA, A.; BAY, B.H. Metallothioneins in human tumors and potential roles in carcinogenesis. **Mutat. Res.**, v. 533, n.1-2, p. 201-209, 2003.

COYLE, P.; *et al.* Metallothionein: the multipurpose protein. **Cell. Mol. Life. Sci.**, v. 59, n. 4, p. 627-647, 2002.

CORPET, F. **Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. Disponível em: <<http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin/multalin.html>> Acesso em: 20 jun. 2007.**

DUNCAN, K.E.R.; STILLMAN, M.J., Metal-dependent protein folding: metallation of metallothionein. **J. Inorg. Biochem.**, v. 100, p. 2101-2107, 2006.

FERNANDES, A.G.; MAFRA, D. ZINCO E CÂNCER: uma revisão. **Rev. Saude Com.**, v. 1, n. 2, p. 144-156, 2005.

FISHER, E.H.; DAVIE, E.W. Recent excitement regarding metallothionein. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 95, n. 7, p. 3333-3334, 1998.

HAQ, F.; MAHONEY, M.; KOROPATNICK, J. Signaling events for metallothionein induction. **Mutat. Res.**, v. 533, n. 1-2, p. 211-226, 2003.

IOACHIM, E.E.; *et al.* Localization of metallothionein in urothelial carcinoma of the human urinary bladder: an immunohistochemical study including correlation with HLA-DR antigen, p53, and proliferation indices. **Anticancer Res.**, v. 21, n. 3B, p. 1757-1761, 2001.

KAGI, J.H.; SCHAFFER, A. Biochemistry of metallothionein. **Biochem.**, v. 27, n. 23, p. 8509-8515, 1988.

KLAASSEN, C.D.; *et al.* In vitro and in vivo studies on the degradation of metallothionein. **Environ. Health Persp.**, v. 102, n. 3, p. 141-146, 1994.

KNAPEN, D.; *et al.* Metallothionein gene and protein expression as a biomarker for metal pollution in natural gudgeon populations. **Aquatic. Toxic.**, v. 82, p. 163-172, 2007.

KOURY, J.C.; DONANGELO, C.M. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. **Rev. Nutr.**, v. 16, n. 4, p. 433-441, 2003.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LEWIN, B. **Genes VII**. Porto Alegre: Artmed Editora. 2001.

LINDE, A.R.; *et al.* Metallothionein as bioindicator of freshwater metal pollution: European Eel and Brown Trout. **Ecotox. Environ. Saf.**, v. 49, p. 60-63, 2001.

MAFRA, D.; COZZOLINO, S.M.F. Importância do zinco na nutrição humana. **Rev. Nutr.**, v. 17, n. 1, p. 79-87, 2004.

MARET, W. Zinc and health: current status and future directions. **J. Nutr.**, v. 130, p. 1455-1458, 2000.

MARGOSHES, J.H.; VALLEEE, B.L.A. A cadmium protein from equine kidney cortex. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 69, p. 4813-4814, 1957.

MAZON, A.F.; CERQUEIRA, C.C.C.; FERNANDES, M.N. Gill cellular changes induced by copper exposure in the South American tropical freshwater fish *Prochilodus scrofa*. **Environ. Res.**, v. 88, n. A, p. 52-63, 2002.

McCLAIN, J.C.; *et al.* Laboratory and field validation of multiple molecular biomarkers of contaminant exposure in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 22, p. 361-370, 2003.

MILES, A.T.; *et al.* Induction, regulation, degradation, and biological significance of mammalian metallothioneins. **Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.**, v. 35, n. 1, p. 35-70, 2000.

MONTEIRO, E.A. **Recuperação celular e metabólica do fígado de curimatá, *Prochilodus scrofa* (Steindachner, 1881), após exposição aguda ao cobre.** Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2000.

OLSVIK, P.A.; *et al.* Metal accumulation and metallothionein in brown trout, *Salmo trutta*, from two Norwegian rivers differently contaminated with Cd, Cu and Zn. **Com. Biochem. Physiol.**, v. 128, p. 189-201, 2001.

QUAIFE, C.J.; *et al.* Induction of a new metallothionein isoform (MT-IV) occurs during differentiation of stratified squamous epithelia. **Biochem.**, v. 33, n. 23, p. 7250-7259, 1994.

REN, H.; *et al.* Cloning of crucian carp (*Carassius cuvieri*) metallothionein-II gene and characterization of its gene promoter region. **Biochem. Biophys. Res. Com.**, v. 342, p. 1297-1304, 2006.

ROESIJADI, G. Metallothionein and Its role in toxic metal regulation. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 113C, p. 117-123, 1996.

ROCHA, A.A.; PEREIRA, D.N.; PADUA, H.B. Produtos de pesca e contaminantes químicos na água da Represa Billings, São Paulo (Brasil). **Rev. Saude Publ.**, v. 19, p. 401-410, 1985.

ROMERO-ISART, N.; VASAK, M. Advances in the structure and chemistry of metallothioneins. **J. Inorg. Biochem.**, v. 88, n. 3-4, p. 388-396, 2002.

SABER, R.; PISKIN, E. Investigation of complexation of immobilized metallothionein with Zn(II) and Cd(II) ions using piezoelectric crystals. **Biosens. Bioelectron.**, v. 18, n. 8, p. 1039-1046, 2003.

SAMSON, S.L.A.; PARAMCHUK, W.J.; GEDAMU, L. The rainbow trout metallothionein-B gene promoter: contributions of distal promoter elements to metal and oxidant regulation. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1517, p. 202-211, 2001.

SENS, M.A.; *et al.* Metallothionein isoform 3 overexpression is associated with breast cancers having a poor prognosis. **Am. J. Pathol.**, v. 159, n. 1, p. 21-26, 2001.

SCHLENK, D.; *et al.* Characterization of hepatic metallothionein expression in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) by reverse-transcriptase polymerase chain reaction. **Biomark.**, v. 2, p. 161-167, 1997.

SCHMITT, C.J.; *et al.* Biomarkers of metals exposure in fish from lead-zinc mining areas of Southeastern Missouri, USA. **Ecotoxic. and Environ. Saf.**, v. 67, p. 31-47, 2007.

SCUDIERO, R.; *et al.* Difference in hepatic metallothionein content in Antarctic red-blooded and haemoglobinless fish: undetectable metallothionein levels in haemoglobinless fish is accompanied by accumulation of untranslated metallothionein mRNA. **Biochem. J.**, v. 322, p. 207-211, 1997.

SIMPKINS, C.O. Metallothionein in human disease. **Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)**, v. 46, n. 2, p. 465-488, 2000.

SUHY, D.A.; *et al.* Metallothionein is part of a zinc-scavenging mechanism for cell survival under conditions of extreme zinc deprivation. **J. Biol. Chem.**, v. 274, n. 14, p. 9183-9192, 1999.

THIRUMOORTHY, N.; *et al.* Metallothionein: An overview. **World. J. Gastroenterol.**, v. 13, n. 7, p. 993-996, 2007.

VASCONCELOS, M.H.; *et al.* Metal- and Tissue-dependent relationship between metallothionein mRNA and Protein. **Toxicol App Pharmacol.**, v. 182, p. 91-97, 2002.

VERGANI, L.; *et al.* Effects of growth hormone and cadmium on the transcription regulation of two metallothionein isoforms. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 263, p. 29-37, 2007.

WERNER, J.; *et al.* A real-time PCR method for the quantification of the two isoforms of metallothionein in Lake Trout (*Salvelinus namaycush*). **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 54, p. 84-91, 2008.

WOO, S.; *et al.* Heavy Metal-induced differential gene expression of metallothionein in Javanese Medaka, *Oryzias javanicus*. **Marine Biotech.**, v. 8, p. 654-662, 2006.

YE, B.; MARET, W.; VALLEE, L. Zinc metallothionein imported into liver mitochondria modulates respiration. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 98, p. 2317-2322, 2001.

ZAR, J.H. **Biostatistical Analys.** 4. ed. New Jersey: Prentice-Hall, Inc., 1999.

APÊNDICE 1
NOMENCLATURA DOS AMINOÁCIDOS

Nome	Símbolo de 3 Letras	Símbolo de 1 Letra	Estrutura
Alanina	Ala	A	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{CH}_3\text{-C-COO}^- \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
Arginina	Arg	R	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3\text{-C-COO}^- \\ \quad \\ \text{NH}_2 \quad \text{NH}_3^+ \end{array}$
Asparagina	Asn	N	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}=\text{O}-\text{CH}_2-\text{C-COO}^- \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
Ácido Aspártico	Asp	D	$\begin{array}{c} \text{O}^- \\ \\ \text{C}-\text{CH}_2-\text{C-COO}^- \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
Ácido Glutâmico	Glu	E	$\begin{array}{c} \text{O}^- \\ \\ \text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C-COO}^- \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
Cisteína	Cys	C	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{HS}-\text{CH}_2-\text{C-COO}^- \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
Fenilalanina	Phe	F	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}_2-\text{C-COO}^- \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
Glicina	Gly	G	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H}-\text{C-COO}^- \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
Glutamina	Gln	Q	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}=\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C-COO}^- \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
Histidina	His	H	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{HC}=\text{C}-\text{CH}_2-\text{C-COO}^- \\ \quad \\ \text{NH}_3^+ \quad \text{NH} \\ \\ \text{H} \end{array}$
Isoleucina	Ile	I	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{C-COO}^- \\ \\ \text{CH}_3 \quad \text{NH}_3^+ \end{array}$
Leucina	Leu	L	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{CH}_3-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{C-COO}^- \\ \\ \text{CH}_3 \quad \text{NH}_3^+ \end{array}$

Lisina	Lys	K	$ \begin{array}{c} \text{H} \\ \\ ^+\text{NH}_3^-(\text{CH}_2)_4-\text{C}-\text{COO}^- \\ \\ \text{NH}_3 \\ + \\ \text{H} \\ \\ \text{H}_3\text{C}-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}-\text{COO}^- \\ \\ \text{NH}_3 \\ + \end{array} $
Metionina	Met	M	
Prolina	Pro	P	$ \begin{array}{c} \text{H}_2 \\ \\ \text{C} \\ / \quad \backslash \\ \text{H}_2\text{C} \quad \text{COO}^- \\ \backslash \quad / \\ \text{H}_2\text{C}-\text{N}^+ \\ \quad \\ \text{H} \quad \text{H} \end{array} $
Serina	Ser	S	$ \begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{HO}-\text{CH}_2-\text{C}-\text{COO}^- \\ \\ \text{NH}_3 \\ + \end{array} $
Tirosina	Tyr	Y	$ \begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{HO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2-\text{C}-\text{COO}^- \\ \\ \text{NH}_3 \\ + \end{array} $
Treonina	Thr	T	$ \begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H}_3\text{C}-\text{CH}-\text{C}-\text{COO}^- \\ \quad \\ \text{OH} \quad \text{NH}_3 \\ + \end{array} $
Triptofano	Trp	W	$ \begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}=\text{N}^+-\text{CH}_2-\text{C}-\text{COO}^- \\ \quad \\ \text{H} \quad \text{NH}_3 \\ + \end{array} $
Valina	Val	V	$ \begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{CH}_3-\text{CH}-\text{C}-\text{COO}^- \\ \quad \\ \text{CH}_3 \quad \text{NH}_3 \\ + \end{array} $