

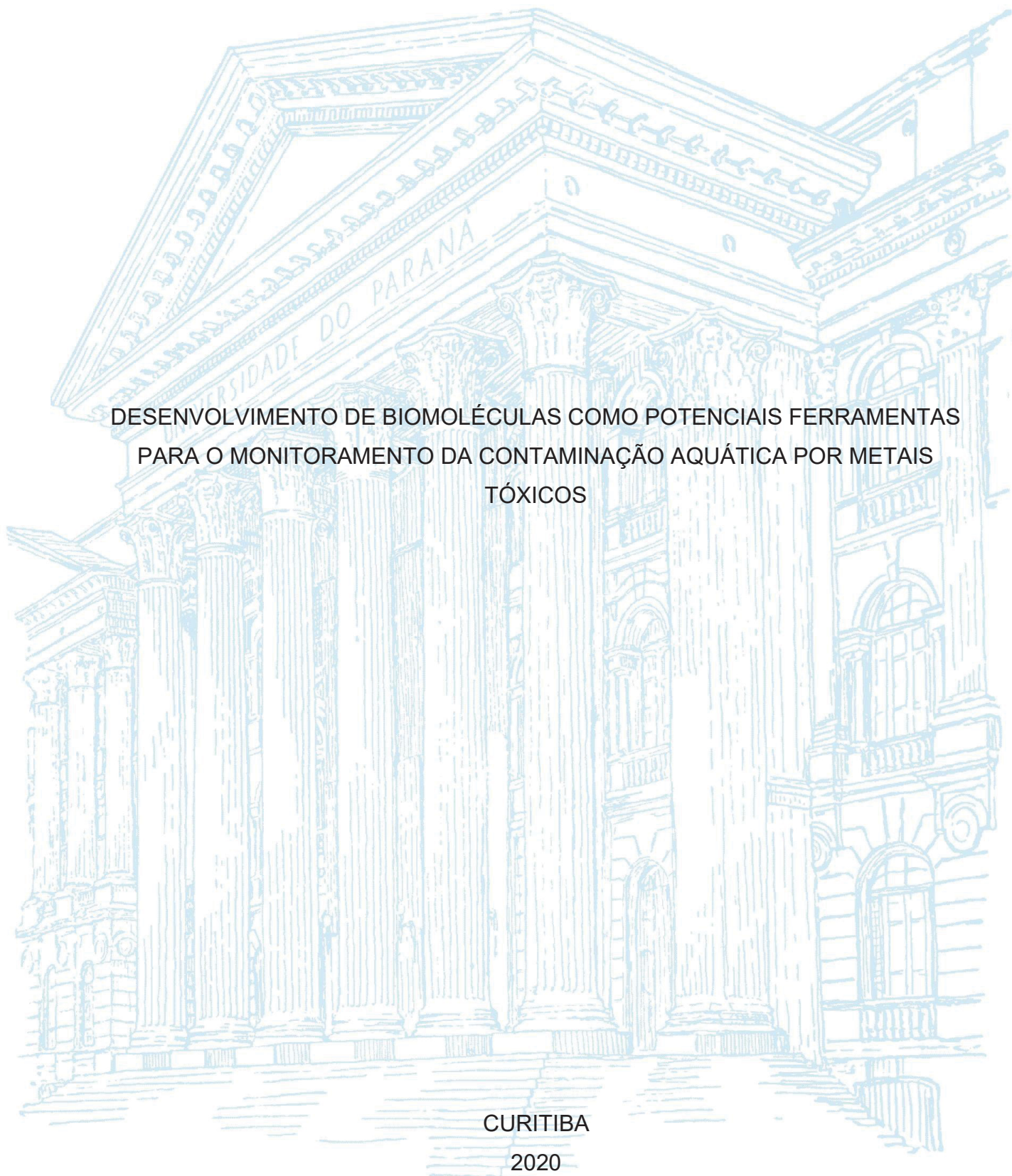
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PAOLA CAROLINE NAGAMATSU

DESENVOLVIMENTO DE BIOMOLÉCULAS COMO POTENCIAIS FERRAMENTAS
PARA O MONITORAMENTO DA CONTAMINAÇÃO AQUÁTICA POR METAIS
TÓXICOS

CURITIBA

2020



PAOLA CAROLINE NAGAMATSU

DESENVOLVIMENTO DE BIOMOLÉCULAS COMO POTENCIAIS FERRAMENTAS
PARA O MONITORAMENTO DA CONTAMINAÇÃO AQUÁTICA POR METAIS
TÓXICOS

Tese apresentada ao curso de pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de doutora.

Orientador: Prof. Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro

Coorientador: Dr. Claudemir de Souza

CURITIBA
2020

FICHA CATALOGRÁFICA

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Nagamatsu, Paola Caroline

Desenvolvimento de biomoléculas como potenciais ferramentas para o monitoramento da contaminação aquática por metais tóxicos. / Paola Caroline Nagamatsu. – Curitiba, 2020.

109 p.: il.

Orientadora: Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro.

Coorientador: Claudemir de Souza.

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

1. Água - Qualidade. 2. Biomarcadores. 3. Cádmio. 4. Metalotioneína. I. Título. II. Ribeiro, Ciro Alberto de Oliveira,

FOLHA DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Tese de Doutorado de **PAOLA CAROLINE NAGAMATSU** intitulada “**DESENVOLVIMENTO DE BIOMOLÉCULAS COMO POTENCIAIS FERRAMENTAS PARA O MONITORAMENTO DA CONTAMINAÇÃO AQUÁTICA POR METAIS TÓXICOS**”, sob orientação do Prof. Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro, que após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **APROVAÇÃO** no rito de defesa. A outorga do título de Doutor está sujeita à homologação pelo Colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação. CURITIBA, 11 de dezembro de 2020.



**CIRO ALBERTO DE
OLIVEIRA RIBEIRO**
Presidente da Banca
examinadora (UFPR)



KATYA NALIWAIKO
Avaliador Interno (UFPR)



LUCELIA DONATTI
Avaliador Interno (UFPR)



RODRIGO DE CASSIO DA SILVA
Avaliador Externo (UEPG)



LIA SUMIE NAKAO
Avaliador Interno (UFPR)

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro pela amizade, confiança, orientação e incentivo. Agradeço de coração por tudo que me ensinou durante a graduação e na pós-graduação.

Ao prof. Dr. Nilson Ivo Tonin Zanchin por sua orientação. Obrigada pela parceria fundamental para a realização deste trabalho.

Um especial agradecimento ao meu coorientador Dr. Claudemir de Souza pela excelente orientação, por todo o conhecimento e, acima de tudo, pela constante motivação.

Ao Dámaso, por toda ajuda no laboratório e principalmente pela companhia e amizade ao longo desses anos.

À equipe técnica do Instituto Carlos Chagas, em especial à Brenda e à Tatiana por toda ajuda e paciência.

Aos colegas e professores do Laboratório de Toxicologia Celular, peças chave para o desenvolvimento deste trabalho. Obrigada pela coletividade, pelo incentivo e pelos momentos de descontração.

À família e aos amigos por todo amor e suporte. A realização deste sonho não teria sido possível sem o apoio incondicional de vocês.

Ao Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos pelo suporte técnico na produção dos anticorpos policlonais e pelo bem estar dos coelhos.

À Piscicultura Panamá pelo manejo e cuidado com os materiais biológicos utilizados nos experimentos.

Ao CNPq pelo financiamento para a realização deste trabalho.

E a todos aqueles que de alguma forma colaboraram nestes anos intensos de pesquisa e aprendizado.

*Dedico ao meu
amado pai*

RESUMO

A contaminação ambiental por metais tóxicos em diferentes compartimentos ambientais tem aumentado rapidamente durante as últimas décadas devido a uma grande diversidade de atividades antrópicas. Estes elementos não são degradáveis naturalmente e, portanto, podem bioacumular em todos os níveis tróficos da cadeia alimentar. Atualmente, o cádmio é um dos metais poluentes mais preocupantes por causar efeitos tóxicos graves e irreversíveis principalmente nas comunidades aquáticas. Um dos vários mecanismos de toxicidade relacionado a esse metal é o de induzir a expressão das metalotioneínas. Essas proteínas atuam na homeostase de metais essenciais nas células e em fluídos corporais e tem sido utilizada como um dos principais biomarcadores de poluição aquática por metais tóxicos biodisponíveis. Assim, nosso principal objetivo foi produzir e validar anticorpos policlonais a fim de detectar a expressão diferencial da metalotioneína induzida pelo cádmio. Esses anticorpos foram obtidos a partir do soro de coelhos imunizados com a proteína metalotioneína de tilápia, sintetizada previamente por sistema de expressão heteróloga em *Escherichia coli*. Os anticorpos foram seletivamente purificados do soro por cromatografia de imunoafinidade e validados pelos ensaios de Western blot e ELISA. Com base nisso, foi possível verificar a obtenção de anticorpos policlonais com alto grau de especificidade e sensibilidade, os quais podem ser utilizados como potenciais ferramentas na detecção da biodisponibilidade de metais tóxicos na ictiofauna brasileira. Após os bioensaios foi possível detectar diferentes níveis de MT endógena em larvas e extratos de fígado juvenil com o anticorpo policlonal. Além disso, foram observados danos ao DNA em indivíduos expostos à concentração mais alta. Os resultados aqui apresentados complementam os estudos e abrem portas para a investigação direta do estresse ambiental gerado pelos metais e reforçam a necessidade de planos efetivos para garantir a saúde dos recursos hídricos no cenário brasileiro.

Palavras chave: Qualidade de água, cádmio, metalotioneína, biomarcadores, imunodeteção.

ABSTRACT

Contamination by toxic heavy metals in different environmental compartments has been increasing rapidly over the last decades by a variety of disordered anthropogenic inputs. These elements are not degradable and can bioaccumulate at all trophic levels of the food chain. Cadmium is currently one of the most worrying environmental pollutant metals as it causes severe and irreversible toxic effects mainly in aquatic communities. One of several mechanisms of toxicity related to this metal in its complexity is to induce the expression of metallothionein. These proteins act on metal homeostasis in cells and body fluids and it has been used as one of the main biomarkers of water pollution by bioavailable toxic metals. In this way our main goal was the production and validation of polyclonal antibodies in order to detect the differential expression of metallothionein induced by cadmium. These antibodies were obtained from the rabbit serum immunized with the tilapia metallothionein, synthesized by heterologous expression system in *Escherichia coli*. The antibodies were selectively purified from the serum by immunoaffinity chromatography and later validated by Western blot and ELISA assays. Based on this, it was possible to verify the obtaining of polyclonal antibodies with a high specificity and sensitivity which can be used as potential tools for detecting the bioavailability of toxic metals in the Brazilian ichthyofauna. After the bioassays it was possible to detect different levels of expression of endogenous MT in larvae and juvenile liver extracts with the polyclonal antibody. These results presented here complement studies and open doors for the direct investigation of the environmental stress generated by metals, and reinforce the need for effective plans to guarantee the health of water resources in the Brazilian scenario.

Keywords: Water quality, cadmium, metallothionein, biomarkers, immunodetection.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1 - Representação esquemática da estrutura da MT no seqüestro do Cd.....23

Figura 2 - Formas juvenis de *Rhamdia quelen* 32

Figura 3 - Espécime juvenil de *Rhamdia quelen* 32

MATERIAIS E MÉTODOS

Figura 4 - Mapa do vetor para a expressão do antígeno recombinante de *O. aureus* 38

RESULTADOS

Figura 5 - Esquema da construção da fusão MT-Trx... 57

Figura 6 - Análise da MT recombinante de *E. coli*.....59

Figura 7 - Análise da reatividade do antissoro com a MT recombinante pelo ensaio de Western blot 61

Figura 8 - Análise da reatividade do antissoro com a MT recombinante pelo ensaio ELISA.....62

Figura 9 - Validação dos anticorpos purificados por ensaio de Western blot.....	63
Figura 10 - Validação dos anticorpos purificados por ensaio ELISA.....	64
Figura 11 - Detecção da MT endógena por Western Blot.....	65
Figura 12 - Análise da MT endógena de <i>Rhamdia quelen</i> por ELISA colorimétrico no formato competitivo	66
Figura 13 - Respostas de danos no DNA após exposição aguda de cádmio	67

LISTA DAS PRINCIPAIS ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA - *bovine serum albumin*
Cd - *cádmio*
CH - *cadeia pesada*
CL - *cadeia leve*
C - terminal - *carboxi-terminal*
Cys - *cisteína*
DO - *densidade óptica*
DTT - *dithiothreitol*
EDTA - *ethylenediamine tetraacetic acid*
ELISA - *enzyme linked immuno sorbent assay*
GFP - *green fluorescent protein*
His₆ - *sequência de 6 moléculas do aminoácido histidina*
Hpf - *horas após a fertilização*
HRP - *horseradish peroxidase*
IgG - *imunoglobulina do tipo g*
IMAC - *immobilized metal affinity chromatography*
IPTG - *isopropyl β -d-1-thiogalactopyranoside*
kDa - *kiloDalton*
LB - *meio de cultura lúria-bertani*
MT - *metalotioneína*
MTR - *metalotioneína recombinante*
MT-TRx - *metalotioneína em fusão com a tiorredoxina*
NCBI - *national center for biotechnology information*
N-terminal - *amino-terminal*
pAb - *policlonal antibody*
PBS - *phosphate buffered saline*
PBS-T - *phosphate buffered saline-tween-20*
PCR - *polymerase chain reaction*
pH - *potencial hidrogeniônico*
PMSF - *phenylmethylsulfonyl fluorid*
psi - *pound force per square inc*
RPM - *rotações por minuto*

SDS-PAGE- *sodiumdodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*

TBS - *tris-buffered saline*

TBS-T - *tris-buffered saline -tween-20*

Trx - *tiorredoxina*

xg - *unidade de medida da força da centrifugação*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 Contextualização do tema	13
1.2 Impacto ambiental da contaminação por metais tóxicos	15
1.3 Peixes como modelo de estudo	19
1.4 Características moleculares da metalotioneína	22
1.5 Metalotioneína como biomarcador	25
Detecção molecular	25
Imunodetecção	27
2. JUSTIFICATIVA.....	34
3. OBJETIVOS	36
3.1 Objetivos gerais.....	36
3.2 Objetivos específicos.....	36
4. MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1 Obtenção dos genes sintéticos	37
4.2 Vetor de expressão bacteriano.....	37
4.3 Estoque dos clones sintéticos	38
4.4 Expressão da metalotioneína recombinante (anti-MTR).....	39
4.5 Purificação da metalotioneína recombinante (anti-MTR).....	41
4.6 Produção dos anticorpos policlonais anti-MTR	41
4.7 Clivagem da TRx	43
4.8 Purificação dos anticorpos policlonais anti-MTR	43
4.9 Validação dos anticorpos purificados	45
4.10 Extração e detecção da MT endógena de <i>Rhamdia quelen</i>	45
4.11 Detecção da MT endógena por imunoenaios	50
4.12 Detecção de quebras simples de DNA.....	55
4.13 Análises estatísticas	56
4.14 Comitê de ética	56
5. RESULTADOS.....	57
5.1 Construção da proteína recombinante	57
5.2 Validação dos anticorpos policlonais.....	60
5.3 Imunodetecção da MT endógena de <i>R. quelen</i>	65
5.4 Detecção de quebras simples de DNA de <i>R. quelen</i>	66

6. DISCUSSÃO	68
7. CONCLUSÃO	79
REFERÊNCIAS.....	80
APÊNDICE.....	106

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONTEXTUALIZAÇÃO DO TEMA

A contaminação dos ecossistemas aquáticos e das águas destinadas ao abastecimento público tem colocado em risco a saúde da população e os ambientes naturais. A demanda atual e futura destes recursos hídricos limitados, tanto em quantidade quanto em qualidade, está expandindo. Entretanto, de forma paradoxal, o aumento demográfico associado ao ritmo acelerado da industrialização, à urbanização extensiva e às práticas dos setores agrícolas, tem intensificado os despejos de poluentes químicos que contribuem para a deterioração significativa dos corpos d'água (CAJARAVILLE et al., 2000; COIMBRA et al., 2013; VARDHAN et al., 2019).

Não é surpresa que a poluição química das águas naturais tenha se tornado alvo de grande preocupação em escala global. Cerca de 80% da população enfrentam dificuldades econômicas e estão ameaçadas pela escassez hídrica, causada principalmente pela poluição (REVENGA & TYRREL, 2016). Conforme estimativas recentes, o estresse hídrico será agravado e o número de pessoas que vivem em áreas de escassez aumentará para cerca de 3,9 bilhões até 2030 (XU et al., 2018). Além disso, a água contaminada é um veículo de diversos agentes químicos e biológicos, sendo responsável pela disseminação de doenças que causam a morte aproximada de dois milhões de pessoas anualmente (WHO, 2016; CHEN et al., 2019).

Neste contexto, o Brasil reúne uma série de condições adversas que interferem na qualidade da água. Trata-se de um país extenso com 8,5 milhões de km² e que no ano de 2020 apresentou uma população de 211, 6 milhões de pessoas (IBGE, 2020). Ainda de acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, quase 50% dos municípios brasileiros não apresentam rede de esgoto. Isto favorece o lançamento indiscriminado "*in natura*" diretamente nos córregos das cidades pelas populações não assistidas por tratamento prévio de efluentes domésticos, e por indústrias negligentes que não precedem um pré-tratamento de seus efluentes líquidos (ARCHELA et al., 2003; XIAO et al., 2021). Além dos centros urbanos, as agroindústrias são consideradas as principais fontes poluidoras do país (MEES et

al., 2009). O mercado de agrotóxicos cresceu quatro vezes mais do que a média mundial na última década, colocando o Brasil como o maior consumidor e produtor de agrotóxicos do mundo (ANVISA, 2013).

Os impactos do aumento demográfico, do setor urbano e da produção de bens agrícolas são notados pela perda da biodiversidade nos sistemas aquáticos e imediações e pela diminuição da água potável para o consumo humano com prejuízos à saúde (DELLAMATRICE & MONTEIRO, 2014). Essas problemáticas sinalizam a necessidade de serem tomadas medidas enérgicas e definitivas a tempo para garantir a proteção dos ecossistemas aquáticos.

Nesse sentido, os programas de monitoramento da contaminação aquática, sobretudo da água de uso público, são de extrema importância para a contínua investigação do estresse ambiental e da integridade biológica (XIONG et al., 2019). Compreender a dinâmica e os efeitos dos diferentes tipos de poluentes em comunidades aquáticas expostas é essencial para o desenvolvimento de planos eficazes para a conservação, restauração ecológica e garantia do padrão de potabilidade para o consumo.

Os ecossistemas aquáticos de água doce abrigam um nível extremamente alto da biodiversidade. Os rios e córregos estão entre os habitats mais vulneráveis, pois recebem extensivamente resíduos geogênicos e resíduos antropogênicos a partir do esgoto doméstico e industrial e do escoamento de terras agrícolas em suas vastas bacias (SCHWARZENBACH et al., 2010; VOROSMARTY et al., 2010; PANDER & GEIST, 2013; XIONG et al., 2016b).

Os poluentes químicos em águas superficiais e subterrâneas podem ser divididos em macro e micropoluentes. Os macropoluentes geralmente são encontrados em miligrama por litro e incluem nutrientes como o nitrogênio, espécies de fósforo e compostos orgânicos naturais. Por outro lado, os corpos d'água também sofrem impactos de diferentes tipos de micropoluentes, compostos sintéticos ou naturais presentes na água em nível de nanograma ou micrograma por litro (GRUBER & GALLOWAY, 2008; FILIPPELI, 2008; JORGENSEN, 2009). Mesmo em concentrações muito baixas, os micropoluentes podem exercer efeitos tóxicos sobre a biota, que podem ser agravados quando presentes em misturas complexas (DEMIRA et al., 2015).

Para garantir a qualidade da água, buscam-se informações de limites estabelecidos por agências políticas internacionais referentes aos grupos químicos

existentes na água (MELLO & OLIVO, 2016). Um alicerce no Brasil que permite identificar áreas poluídas é a resolução CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente), n. 357, de 17 de março de 2005, que dispõe sobre as condições de qualidade para o enquadramento dos corpos hídricos em território nacional, de acordo com seus usos preponderantes e para o lançamento de efluentes. Esta resolução estabelece valores de referência quanto à presença de substâncias químicas em sistemas de água doce, salobra e salina e, desde o início de sua vigência, tem sido instrumento de referência para pesquisas científicas (CUNHA et al., 2013). O gerenciamento dos recursos hídricos tem como objetivo viabilizar a utilização da água para as atividades humanas e para a manutenção da biodiversidade. Um passo fundamental em direção à sustentabilidade.

Apesar dos avanços dos valores orientadores regulatórios de qualidade de água, os estudos nesta área ainda são modestos, regionais e pontuais. As avaliações científicas e as fiscalizações de órgãos responsáveis dos impactos diretos e indiretos dos poluentes ainda são incipientes e desafiadoras, pois requerem planos contínuos de ação, coletas de dados e amostras, ampla abordagem interdisciplinar especializada, procedimentos metodológicos padronizados e recursos financeiros, medidas cruciais para diagnosticar e assegurar condições adequadas dos parâmetros físicos, químicos e biológicos dos sistemas aquáticos.

Dentre a grande variedade de micropoluentes capazes de interagir com outros compostos químicos, naturais ou antropogênicos, dissolvidos ou particulados, e com componentes bióticos, observa-se um crescente interesse no monitoramento dos metais tóxicos, os quais são utilizados em escala exponencial e introduzidos irregularmente em níveis significativos nos corpos hídricos (MASINDI & MUENDI, 2018; PANNETIER et al., 2019).

1.2 IMPACTO AMBIENTAL DA CONTAMINAÇÃO POR METAIS TÓXICOS

“Metais pesados” é um termo geral empregado a um grupo de elementos com densidade maior do que 5 cm³, e que possuem grande afinidade pelo oxigênio (óxidos metálicos) e pelo enxofre (sulfatos) (ADRIANO, 1986). Embora diferentes concentrações de metais possam ser encontradas naturalmente em baixas concentrações nas águas e nos sedimentos por origem geoquímica, a poluição

antropogênica destes micropoluentes é inevitável e a humanidade tem lutado para lidar com isso.

Apesar de alguns metais serem micronutrientes requeridos em baixas concentrações com funções biológicas essenciais para os seres vivos (ferro (Fe) níquel (Ni), cobre (Cu), o zinco (Zn) e o manganês (Mn), por exemplo), as emissões de poluentes tem contribuído para o acréscimo destes elementos a níveis nocivos nos ambientes naturais (JARUP, 2003; LI et al., 2019). Já os metais não essenciais para o metabolismo dos seres vivos, dentre os quais se destacam o cádmio (Cd), chumbo (Pb) e o mercúrio (Hg), são micropoluentes que podem provocar efeitos negativos, até mesmo em baixas concentrações (FESTA et al., 2011).

A poluição dos corpos hídricos por metais tem aumentado significativamente durante as últimas décadas por uma variedade de atividades econômicas. Insumos antrópicos como o lixo eletrônico, combustão de combustíveis fósseis, mineração, fertilizantes inorgânicos e orgânicos, pesticidas e efluentes domésticos constituídos de águas residuais não tratadas ou parcialmente tratadas, são fontes de metais tóxicos, sendo o escoamento superficial urbano uma das principais causas da deterioração de rios e lagos (PRESTES et al., 2006; MANIRETHAN et al., 2018).

Estudos mostram que as especiações dos metais (diferentes formas químicas depositadas no sedimento ou particuladas em suspensão) desempenham um papel fundamental em sua reatividade, mobilidade, comportamento, persistência e biodisponibilidade no meio aquático (SIGG et al., 2006; WILTEMBURG, 2012). Os metais se espalham facilmente pela lixiviação, tornando-se biodisponíveis aos seres vivos. Isto se deve ao fato de não possuírem caráter de biodegradação, o que favorece a bioacumulação, a bioconcentração em tecidos e a biomagnificação em níveis tróficos superiores da cadeia alimentar (sendo particularmente prejudiciais aos seres humanos, posicionados no topo da cadeia) (DUFFUS, 2002; WHO, 2017).

À medida que os efeitos dos metais tóxicos se tornaram mais conhecidos na saúde humana, seus usos se tornaram mais restritos. Alguns foram proibidos ou tiveram suas emissões reguladas em aplicações específicas. Para isso, são estipulados limites nas concentrações pela legislação de forma a minimizar a exposição dos ecossistemas, principalmente os aquáticos. A regulação da concentração de poluentes na água potável desperta significativo interesse e é, sem dúvidas, uma prioridade para as agências governamentais. Além disso, alguns países também impõem concentrações máximas permissíveis na irrigação de água,

impulsionada pela necessidade de controlar a concentração de metais pesados nos alimentos (VAREDA et al., 2019).

Nos últimos anos, têm sido voltadas atenções de setores da saúde pública global relacionada aos metais pesados perigosos e prioritários devido às características tóxicas irreversíveis (KIM et al., 2019). Quando exposto a altas concentrações de metais, o organismo humano pode sofrer os efeitos nocivos associados a diferentes doenças gastrointestinais, renais, cardiovasculares, ósseas, endócrinas, neurológicas, reprodutivas e a variados tipos de câncer (VARDHAN et al., 2019). As principais rotas de exposição incluem a ingestão oral, inalação e a exposição cutânea (EL-KADY et al., 2018). Sendo as potenciais fontes de metais muito complexas e diversificadas, muito se tem estudado sobre as quantificações das concentrações e toxicidade na biota aquática de áreas urbanizadas (GONÇALVES, 2008).

A liberação de metais nos ecossistemas aquáticos e os vários processos físico-químicos no sedimento e na coluna d'água podem ter um impacto notável nas respostas biológicas. A assimilação dos metais pelos organismos está relacionada principalmente pelas atividades dos íons metálicos livres. Uma vez absorvidos, a toxicidade dependerá do tempo de exposição da concentração e das características do indivíduo.

Dentre os metais comumente encontrados nos corpos hídricos, há uma preocupação crescente com o cádmio (Cd), elemento químico não essencial para sistemas biológicos e naturalmente integrado aos ciclos geológicos (ZHANG & REINOLDS, 2019). Uma vez extraído dos reservatórios da crosta terrestre através de processos naturais: intemperismo de minerais, incêndios florestais e por erupções vulcânicas, o Cd pode ser transportado pela atmosfera, águas superficiais, águas subterrâneas e camadas superficiais do solo. Estas fases são intercambiáveis por meio de reações como quelação, adsorção/dessorção e precipitação/ dissolução, nos quais o metal pode estar presente em várias formas de compostos químicos, a maioria associada a complexos inorgânicos como o Cl^- , SO_4^{2-} , HCO_3^- e F^- , ou a complexos orgânicos (MASON, 2013).

O Cd foi descoberto em 1817 e rapidamente passou a ser importante a nível industrial, principalmente na produção de baterias, tintas e plásticos. A emissão deste poluente ocorre através dos resíduos do fabrico de cimento, da queima de

combustíveis fósseis e do lixo urbano, pelo sedimento de esgoto e através da mineração (KALIČANIN, 2009).

Segundo Prestes et. al. (2006), o tráfego de veículos e o escoamento superficial originado dos telhados também são fontes significativas de Cd. Embora haja ampla aplicação em produtos comerciais e atividades antrópicas, tem sido estimado que cerca de um terço do Cd presente nos ecossistemas aquáticos seja proveniente da agricultura pelo uso de fertilizantes fosfatados (WHO, 2010;

CROIZIER et al., 2018). Para controlar os níveis de contaminação de metais presentes nas águas, órgãos ambientais estabelecem limites máximos de concentrações permissíveis para que não ocorram danos à biota e à saúde humana.

No Brasil, o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) estabelece que a concentração aceitável de Cd nas águas de Classe 2 seja de 0,001 mg/L. Em águas naturais, as concentrações encontradas são muito baixas, chegando às vezes a valores inferiores a 0,01 µg/L (BARBIERI & PAES, 2011). No entanto, estudos de monitoramento da qualidade da água têm verificado concentrações superiores aos limites estabelecidos (BARBOSA et al., 2010). Diante dessas informações, a necessidade de monitorar temporal e espacialmente as concentrações de Cd, compreender e caracterizar as fontes, rotas de exposição e respostas biológicas induzidas pelo metal são de grande relevância.

A preocupação relacionada ao Cd deriva de sua toxicidade caracterizada por múltiplas alterações na biota (GERBRON et al., 2015; MIANDARE et al., 2016). Mesmo em concentrações traço (na faixa entre ng/L e µg/L.), é um agente tóxico bioacumulável nos organismos, incapazes de eliminá-lo de forma rápida e eficaz (ENSAFI et al., 2006; DZIUBANEK et al., 2015).

Os mecanismos mais importantes pelos quais o Cd manifesta sua toxicidade incluem alterações na expressão gênica, inibição no reparo do DNA, interferência nos mecanismos de apoptose, autofagia, estresse oxidativo e na interação com bioelementos (ĐUKIĆ-ĆOSIĆ et al., 2019). Esta interação se deve à afinidade por grupos SH, OH, carboxila, fosfato e à sua ação competitiva com outros elementos funcionais essenciais tais como o zinco (Zn), cobre (Cu), ferro (Fe) e cálcio (Ca). As principais interações conhecidas são: (i) a ligação forte com grupos SH das proteínas intracelulares e (ii) a quebra das ligações sulfídricas e liberação do Zn com consequente alterações enzimáticas em processos bioquímicos (KLASSEN, 2001).

Estudos toxicogenômicos indicam que a exposição ao Cd pode alterar as atividades dos fatores transcricionais e provocar o desenvolvimento e progressão de tumores (SMIRNOVA et al., 2000). Além disso, pode influenciar a alteração do balanço de bioelementos que apresentam propriedades físicas e químicas semelhantes (como o Zn, Cu, Fe, Mn, Se, Ca e Mg) em todos os níveis toxicocinéticos: reabsorção, distribuição, eliminação e também em locais onde os elementos desempenham suas funções biológicas (BULAT et al., 2017).

Nos ambientes aquáticos, o Cd pode se tornar biodisponível a 10 cm acima dos substratos bentônicos (MAN et al., 2004) e se apresentar fracamente ligado ao sedimento na forma de cloreto de cádmio (CdCl_2) (VON DER HEYDEN & NEW, 2004). Desta forma, o constante monitoramento das concentrações do metal em áreas de risco, associado às concentrações de metais biodisponíveis, permite a avaliação e a gestão da poluição antes da degradação das comunidades (CHUA et al., 2018).

O contato direto dos poluentes com a biota que os assimila altera suas funções bioquímicas, fisiológicas e comportamentais (em nível de organismo, tecido e/ou célula). Estas alterações em espécies ecologicamente representativas fornecem informações valiosas que permitem investigações ecotoxicológicas, necessárias em programas de monitoramento ambiental (ARIAS et al., 2007; HU et al., 2019).

1.3 PEIXES COMO MODELO DE ESTUDO

Nos ecossistemas aquáticos, organismos estão expostos a um grande número de agentes químicos que podem ser absorvidos diretamente da água ou indiretamente via cadeia alimentar (LUCZYŃSKA et al., 2018). Vários estudos têm utilizado espécies sentinelas de peixes como bioindicadores de metais tóxicos, uma vez que são amplamente distribuídos, facilmente coletados e identificados, além de apresentar mecanismos de respostas similares aos de vertebrados superiores como os mamíferos.

Os peixes assimilam os metais essenciais e não essenciais diretamente da água ou principalmente pela via trófica, retendo-os em seus tecidos (CROIZIER et al., 2018). Os metais tendem a acumular-se nos órgãos vitais em até várias centenas de vezes acima das concentrações ambientais (PODRUG & RASPOR,

2009; HAUSER-DAVIS et al., 2014; BEG et al., 2015; CROIZIER et al., 2018), sendo geralmente seguida a ordem de bioacumulação: intestino > fígado > rins > brânquias > músculos (BERNTSEN et al., 2001; KIM et al., 2006). Assim, estes organismos apresentam uma série de amostras biológicas com informações metabólicas mensuráveis que refletem a qualidade ambiental de seu habitat (KUMAR et al., 2019).

Os efeitos iniciais da exposição à xenobióticos são sinalizados por múltiplas respostas biológicas adaptativas denominadas de biomarcadores, que podem ser evidenciados e mensurados em níveis moleculares, celulares, histológicos, fisiológicos e até comportamentais (DALZUCHIO et al., 2017).

Os biomarcadores são sinais precoces amplamente utilizados para a investigação da saúde de organismos expostos a agentes tóxicos. As duas características mais importantes dos biomarcadores são: a) possibilitam a identificação das interações que ocorrem entre os poluentes e os organismos vivos através dos efeitos e b) permitem a mensuração de efeitos subletais. Com isso, se torna cada vez mais desejável o uso de biomarcadores em programas de monitoramento da qualidade da água, nas avaliações de impacto ambiental e em estudos ecotoxicológicos (VAN DER OOST et al., 2003).

As espécies de peixes pertencentes aos níveis tróficos superiores da cadeia alimentar são comumente utilizadas como bioindicadores por possuírem intrínseca relação com todos os níveis tróficos inferiores, indicando respostas de efeitos crônicos, acumulativos e persistentes ao nível de ecossistema ou pelos efeitos iniciais diretos a nível de indivíduo. Estes organismos são importantes modelos indicados para se estimar o potencial de exposição a metais, embora a biodisponibilidade e o nível de bioacumulação nos órgãos e tecidos variem de acordo com a categoria taxonômica da espécie, faixa etária e características físico-bioquímicas (BIELMYER-FRASER et al., 2018).

Os metais podem levar vários meses para bioacumularem. O Cd, especificamente, é captado através do tecido intestinal, atinge o fígado e posteriormente é liberado na circulação sanguínea até finalmente atingir órgãos secundários de acumulação, tais como os músculos (CROIZIER et al., 2018). A depuração interna ocorre principalmente através da produção renal da urina e pela excreção biliar do fígado para o intestino, antes da eliminação final pelas fezes (McGEER et al., 2012). No entanto, o Cd é um elemento tóxico conhecido por ter

uma meia-vida biológica longa devido à baixa eficiência de detoxificação do organismo.

O mecanismo de toxicidade do Cd em peixes de água doce já é bem descrito e envolve principalmente a inibição da absorção de íons cálcio (Ca^{2+}) pelo epitélio branquial (SAUER & WATABE, 1988). A forma iônica do cádmio (Cd^{2+}) presente na água mimetiza o Ca^{2+} e entra no organismo do animal através de canais epiteliais apicais de Ca^{2+} (MEINELT et al., 2001; GALVEZ et al., 2006). Uma vez absorvido, a magnitude da acumulação do metal correlaciona-se com a magnitude do seu efeito tóxico (McGEER et al., 2012). O Cd pode se depositar no epitélio branquial em concentrações superiores a 150 mg/kg e causar sua necrose (SORENSEN, 1991), e provocar alterações nas terminações neuromusculares, resultando em paralisia e reduções na taxa respiratória e na excreção de amônia (DAMATO & BARBIERI, 2012).

Outro efeito conhecido é o aumento indireto de espécies reativas de oxigênio (ROS) nos tecidos que, por sua vez, reagem com moléculas biológicas, como proteínas e lipídios, resultando na carbonilação proteica (PCO), peroxidação lipídica (LPO), alterações no sistema antioxidante e lesões histopatológicas (CAO et al., 2010; 2012; PRETTO et al., 2011; PEREIRA et al., 2016).

Em nível bioquímico, o Cd é capaz de induzir o estresse oxidativo através da inibição de enzimas antioxidantes como, por exemplo, a catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e a glutathiona peroxidase (GSH-Px) (PAN et al., 2018). Estudos mais recentes indicam uma ação significativa do metal em vias envolvidas em danos no material genético e no metabolismo energético (LACAVE et al., 2019). Sierra- Marquez e colaboradores (2019) têm sugerido que a exposição pode prejudicar a reprodução e alterar o desenvolvimento através de mecanismos de desregulação endócrina.

Alteração na expressão gênica de proteínas e sistemas enzimáticos cruciais para diversas atividades biológicas que asseguram a homeostase do organismo, também é outro mecanismo associado à exposição ao Cd (ADAM et al., 2010). Expressões diferenciais de proteínas específicas do metabolismo podem ser utilizadas como biomarcadores moleculares em técnicas de monitoramento e nas avaliações de risco, visto que são mais sensíveis aos primeiros sinais de perturbação ambiental. Estas ferramentas podem ser utilizadas como análises preditivas, mesmo para concentrações não detectáveis do metal pelos métodos

instrumentais analíticos, mas suficientes para causarem efeitos biológicos. Desta forma, estudos ecotoxicológicos da qualidade ambiental com bases moleculares têm focado na identificação e caracterização de proteínas chaves expressas em resposta à exposição a determinadas classes de agentes químicos poluentes (MOORE et al., 2002).

Todos os seres vivos desenvolveram mecanismos fisiológicos para controlar a absorção e o acúmulo de metais. Um desses mecanismos é a síntese de metalotioneínas (MTs), proteínas que atuam como armazenadoras temporárias de metais através de complexos metal-MT. A origem destes complexos impede o Cd, assim como outros metais, de permanecerem como íons livres, sua forma mais tóxica nos diferentes tecidos e fluídos corporais (MIJOŠEK et al., 2019).

As superexpressões de genes responsáveis pela síntese de MT têm sido relacionadas à exposição ao Cd, um indutor de alterações em fatores de transcrição (como o fator de transcrição regulador de metais – MTF1), assim como em fatores de tradução (grupos de genes envolvidos com os mecanismos de iniciação, alongamento e terminação da síntese de proteínas) (SMIRNOVA et al., 2000; JOSEPH et al., 2002ab). Os níveis de transcritos e da proteína MT são importantes respostas de defesa celular contra a exposição de metais, e representa grande perspectiva em avaliações da poluição por metais tóxicos nos ecossistemas aquáticos (LIU et al., 2017).

1.4 CARACTERÍSTICAS MOLECULARES DA METALOTIONEÍNA

As MTs são representadas por uma família de proteínas não enzimáticas de baixo peso molecular (2 -12 kDa), com cerca de 24 a 257 resíduos de aminoácidos, dos quais em torno de um terço são cisteínas (que ocorrem em sequências conservadas cys-x-cys, cys-xy-cys e cys-cys, onde que x e y representam outros aminoácidos).

Elementos metálicos nas suas formas catiônicas apresentam forte afinidade aos grupos tiois das cisteínas através da formação de domínios metal-sulfidril (CAPDEVILA et al., 2012; ZILLER et al., 2017). A capacidade de ligação da proteína é de 7 átomos para íons divalentes e de 12 para monovalentes, criando uma configuração tetraédrica de grupos tiol ($R - S - H$) (HAMER, 1988). As MTs apresentam características muito distintas e peculiares, tais como: (i) composição

incomum de aminoácidos, a qual não apresenta nenhum aminoácido aromático em sua estrutura primária. (ii) Alto teor molar de metal cujas ligações são predominantemente, senão exclusivamente, às múltiplas cadeias laterais decisteínas, e (iii) ausência de dissulfetos e grupos sulfidril livres (OTVOS & ARMITAGE, 1980) (Fig. 1).

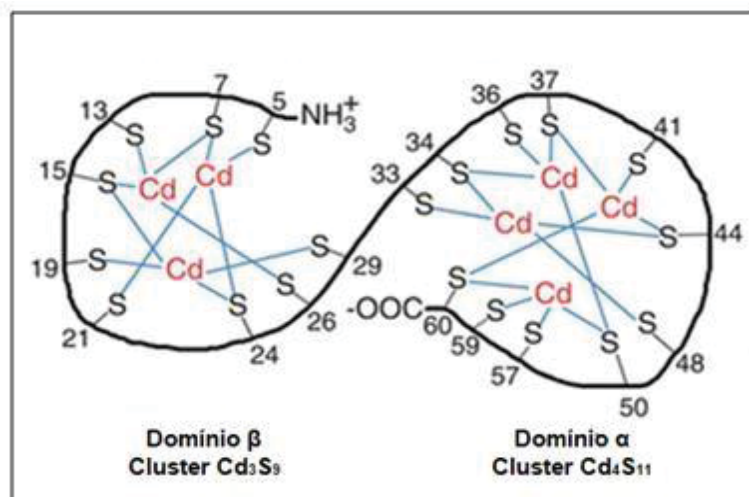


FIGURA 1 - Representação esquemática da estrutura da MT no sequestro do Cd. Destaque para o domínio β na região n terminal com 9 cys e 3 átomos de Cd, e para o domínio α na região carboxi terminal com 11 cys e 4 átomos de cádmio. Os radicais tiol (-S) formam ligações com os sete átomos metálicos bivalentes (SABOLIĆ et al., 2013).

Desde a sua descoberta em 1957 no córtex renal de equino (MARGOSHES & VALLEE, 1957), as MTs foram caracterizadas a partir de uma variedade de outros mamíferos (incluindo o ser humano), e de fontes mais divergentes como pássaros, peixes, invertebrados e microrganismos (KOJIMA & KAGI, 1978; NORDBERG & KOJIMA, 1979).

A ocorrência generalizada nos diversos seres vivos sugere que estas metaloproteínas possuem funções relacionadas à homeostasia e detoxificação de metais essenciais, suprimindo a demanda metabólica de micronutrientes como o zinco (Zn) e o cobre (Cu) através do armazenamento e transporte (RYDEN & DEUTSCH, 1978). Um papel semelhante no metabolismo de átomos metálicos tóxicos também foi proposto, já que as MTs criam condições ideais para proteger as células (AICH et al., 2017).

As MTs não são proteínas exclusivamente citoplasmáticas, já que podem ser encontradas no núcleo, lisossomos, espaço intermembranar das mitocôndrias (TSUJIKAWA et al., 1991), e em fluídos extracelulares como plasma, bile e urina (BREMNER et al., 1987). No meio extracelular, as moléculas da MT podem ser absorvidas pelas células através de um mecanismo mediado por receptores onde a proteína permanece em um compartimento endocítico e o metal é translocado para o citosol (MARET, 2009).

De acordo com estudos estruturais comparativos entre as isoformas da MT, as posições dos resíduos de cisteínas na cadeia polipeptídica são virtualmente invariáveis. Isto indica que as estruturas dos complexos metálicos formados não são apenas idênticas, mas também essenciais para as funções biológicas da proteína (VERGANI et al., 2005; GAO et al., 2009). As MTs possuem uma configuração espacial terciária que consiste em dois domínios metálicos globulares separados: um domínio β N-terminal contendo três metais ligados, e um domínio mais estável α C-terminal capaz de incorporar quatro metais bivalentes (SCHULTZE et al., 1988).

A estrutura tridimensional final da proteína é coordenada pela interação entre as cisteínas e os sete íons metálicos, independentemente da espécie, do tecido e da isoforma. Além disso, outra propriedade marcante das MTs é a notável reatividade cinética dos domínios. Consequentemente, apesar da aparente rigidez, a molécula apresenta um estado ativo dinâmico, com uma contínua redistribuição dos íons metálicos dentro dos dois domínios globulares (SCUDIERO et al., 2005) (Fig. 1).

São conhecidos 18 íons metálicos que possuem capacidade de se ligar à MT. No entanto, apenas o cobre (Cu^+), cádmio (Cd^{2+}), chumbo (Pb^{2+}), mercúrio (Hg^{2+}), prata (Ag^+) e bismuto (Bi^{2+}) podem deslocar e substituir o zinco (Zn^{2+}) (ZHOU et al., 2000), sendo este o metal mais prevalente na proteína, preferencialmente ligado ao domínio β . Portanto, a porção N-terminal regula a homeostase do Zn^{2+} e do Cu^{2+} , enquanto que a porção C-terminal desempenha um papel central na detoxificação de metais tóxicos (ZHOU et al., 2000) (Fig. 1).

Sob condições fisiológicas, a MT possui maior afinidade de ligação pelo Zn^{2+} , seguido do Pb^{2+} , Cd^{2+} e Cu^{2+} . Por isso, apesar da proteína naturalmente apresentar uma quantidade apreciável de Zn em sua estrutura, o Cd e outros metais tóxicos podem substituí-lo nos sítios de ligações. Isto sugere que a MT endógena seja composta por uma mistura heterogênea de diferentes átomos metálicos (NATH et al., 1988). Em contrapartida, quando todos os sítios se encontram disponíveis, a

proteína não possui estrutura bem definida e é designada como apo-metalotioneína (apo-MT) ou tioneína (DUNCAN & STILLMAN, 2006).

Os metais induzem a síntese de novas moléculas de MTs, o que pode gerar níveis elevados das proteínas, nas quais os metais indutores se ligam por meio dos grupos sulfidríla ($-SH$) das cisteínas. Fisiologicamente, este processo ocorre principalmente em órgãos envolvidos na captação, acumulação e excreção destes elementos químicos. Estudos sobre estímulos indutores da expressão gênica evidenciam que a síntese dessas proteínas também pode ser regulada por processos neoplásicos e por uma variedade de agentes oxidantes (BAUMAN et al., 1991, 1992; CAI et al., 1999; NORDBERG & NORDBERG, 2009; HAUSER-DAVIS et al., 2014).

Em condições de elevado estresse oxidativo, as MTs atuam como inibidoras da propagação de radicais livres a partir da transferência intermolecular de íons Zn para outras proteínas. A relação direta entre os níveis de metais bioacumulados e a síntese das MTs em tecidos de teleósteos, associada a mecanismos citoprotetoras, permite que estas proteínas sejam amplamente utilizadas como biomarcadores da poluição ambiental por metais tóxicos (CHATTERJEE et al., 2016; MIJOŠEK et al., 2019).

Geralmente são conduzidas análises da MT em tecido hepático, já que este é o principal órgão de metabolização e detoxificação de xenobióticos (KOVENDAN; VINCENT, 2013). Entretanto, a expressão proteica pode variar de acordo com a espécie, condições reprodutivas, idade e dieta alimentar. Por isso, diferentes órgãos apresentam divergências nos níveis de expressão da MT, em função dos processos bioquímicos e fisiológicos e das concentrações de metais, intensificados significativamente a partir da maturação sexual (INACIO, 2006; BIRD et al., 2008). Neste sentido, as MTs podem ser detectadas e quantificadas de forma altamente específica e eficaz a partir de diferentes tipos de ensaios.

1.5 METALOTIONEÍNA COMO BIOMARCADOR

DETECÇÃO MOLECULAR

Identificar biomarcadores que sejam sensíveis à qualidade dos ecossistemas aquáticos é um desafio contínuo e fundamental para a proteção da biodiversidade e

de processos ecossistêmicos. A literatura descreve que as MTs estão entre os principais biomarcadores moleculares para a detecção de exposição metálica (LIVINGSTONE, 1993), mecanismo mais eficiente de ativação da proteína.

A indução das MTs representa o primeiro sistema de defesa das células contra a presença de metais tóxicos, desta forma, diversos estudos foram realizados sobre o uso da MT como importante biomarcador de exposição a metais (VIARENGO et al., 1997; CHATTERJEE et al., 2016; FABRIN et al., 2018). A ativação da transcrição dos genes que codificam a MT depende de regiões reguladoras no DNA conhecidas como elementos de respostas a metais (MRE), reguladas pelo fator de transcrição MTF-1 (uma proteína zinc-finger). Os genes são responsivos aos metais, que interagem com a região promotora e estimulam a expressão da MTs (HAQ et al., 2003).

Segundo Larochelle et al. (2001), o processo de ativação do MTF-1 e consequentemente a ativação da transcrição do gene da MT se dá com a ligação do zinco ao MTF-1 presente no citosol. A ligação do metal ao fator de transcrição leva a translocação deste fator até o núcleo da célula, onde o complexo MTF-1+Zn permanece ligado ao DNA em estado inativo. Simultaneamente, metais tóxicos como o Cd, ativam uma série de cascatas de reações de proteínas quinases, cujo produto final é a ativação da MTFK, uma proteína quinase que fosforila a MTF-1 no núcleo. Esta fosforilação ativa o MTF-1 que, por sua vez, ativará MRE, dando início à transcrição gênica. O Cd e outros metais também podem competir com o Zn pela ligação nas MTs. Aqueles que apresentam maior afinidade pela proteína, induzem a síntese de RNAm da MT pela liberação de Zn ligado ao fator no citosol (ROESIJADI, 1996).

O progresso das técnicas analíticas instrumentais tem permitido a correlação da expressão das isoformas gênicas das MTs no ambiente celular com níveis de contaminação por exposição a metais pesados. A conservação evolutiva dos genes que codificam essas proteínas permite estudos em diferentes espécies de bioindicadores, a partir da mensuração dos níveis de transcritos e de proteínas responsivos aos estímulos metálicos em diferentes tecidos (HAYES et al., 2004; (VERGANI et al., 2007; YUDKOVSKI et al., 2008; FABRIN et al., 2018).

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em tempo real é um método comumente aplicado para a quantificação dos níveis de transcritos da MT em tecidos de organismos aquáticos sob diferentes cenários de exposição a metais

(TOM et al., 2004). Apesar da dependência de mão de obra especializada, de reagentes caros e estrutura laboratorial, é descrito pela literatura como sendo mais sensível, rápido, reprodutível e que requer pouca amostra tecidual para investigações da MT (COIMBRA, 2008). Por outro lado, sabe-se que os níveis da proteína e do RNAm nem sempre estão claramente associados, o que enfatiza a importância das análises complementares de ambos ensaios para melhor entendimento em programas de biomonitoramento ambiental (KNAPEN et al., 2007).

O alto conteúdo de resíduos de cisteínas favorece a quantificação da MT através de ensaios de saturações de metais que detectam todas as ligações metálicas presentes em uma mistura complexa (SCHEUHAMMER & CHERIAN, 1986). Em contrapartida, estudos mostraram que esta metodologia é apropriada somente quando os níveis das MTs são altos. Quando estas proteínas estão presentes em baixas quantidades (em micrograma por grama de peso seco de tecido), ou quando não há amostras disponíveis suficientes de tecidos (em células cultivadas e embriões e larvas, por exemplo), ocorre uma redução na sensibilidade e na reprodutibilidade dos ensaios.

Técnicas eletroquímicas baseadas na quantificação da MT via grupos sulfidril em sua estrutura também são empregadas. Entretanto, a interferência de outros sistemas redox presentes na amostra pode comprometer as análises (ADAM et al., 2007; CAPDEVILA et al., 2010). Para superar essas limitações e propiciar uma detecção altamente específica da proteína de interesse, com limite absoluto de até 1 pg, os imunoenaios têm sido propostos (RYVOLOVA et al., 2011).

IMUNODETECÇÃO DA METALOTIONEÍNA

Os imunoenaios são baseados na interação específica entre anticorpos e antígenos e continuam sendo as principais técnicas para a caracterização estrutural, localização e quantificação de proteínas. Atualmente estão entre os métodos mais promissores para a análise ambiental (laboratorial ou de campo), visto que são ferramentas altamente seletivas e sensíveis, aplicáveis na detecção e quantificação de biomoléculas específicas presentes em amostras biológicas complexas. Além disso, a simplicidade operacional, reprodutibilidade, estabilidade do sistema, possibilidade de múltiplas análises, rapidez e baixo custo também são qualidades atribuídas aos imunoenaios (NUNES, 2005).

Os anticorpos, componentes-chaves de todas as imunoanálises, são caracterizados por sítios de reconhecimento, presentes em suas estruturas, que interagem especificamente com seus antígenos (NUNES, 2005). São proteínas conhecidas como imunoglobulinas que apresentam a forma de Y, constituídas por duas cadeias polipeptídicas pesadas e duas cadeias leves ligadas entre si por pontes de dissulfeto. O domínio amino terminal da cadeia polipeptídica da imunoglobulina é responsável pela resposta imunológica humoral contra agentes agressores imunogênicos (BOWEN & CASADEVALL, 2018).

Avanços na biotecnologia têm permitido a produção de diferentes tipos de anticorpos para aplicações em imunoensaios. Os anticorpos monoclonais (mAbs) são produzidos a partir de um único clone de célula (linfócito B), o que leva a uma alta especificidade por possuírem afinidade por um único epítopo (única região imunogênica) e menor probabilidade de reatividade cruzada entre sítios similares de outros eventuais antígenos (MARQUES, 2005). Por outro lado, os policlonais (pAbs) reconhecem epítopos variados (diferentes regiões imunogênicas), uma vez que são produzidos a partir de numerosos clones de células (YAU et al., 2003, SINGH et al., 2014). Isto possibilita maior cobertura na detecção de moléculas alvos, porém perde-se a especificidade em relação ao monoclonal.

A escolha do tipo de anticorpo mais adequado dependerá da sua aplicação. Em geral, é preferível o uso de anticorpos policlonais em estudos ambientais, especialmente quando se quer analisar uma classe de poluentes na sua totalidade. Estes anticorpos, por se ligarem a vários epítopos, permitem maior sensibilidade e ampliações de sinais quando utilizados para a detecção de antígenos em imunoensaios (GIL et al., 1999).

O progresso no desenvolvimento de novas metodologias imunoanalíticas depende da clara demonstração de sua validação e eficiência. Os componentes sugeridos para um imunodiagnóstico ambiental incluem: (1) proteínas ou transcritos padrões, permitindo a quantificação dos níveis de biomarcadores, e (2) produtos genéticos expressos constitutivamente que são processados simultaneamente com o biomarcador alvo e avaliados por métodos semelhantes (YUDKOVSKI et al., 2008). Em ambos os casos, os produtos recombinantes são preferíveis, garantindo o suprimento e reprodutibilidade dos padrões, já que as padronizações de ensaios imunológicos normalmente requerem altas quantidades de anticorpos para incubações primárias ou para conjugação com moléculas reveladoras da reação.

A expressão heteróloga de proteínas recombinantes tem sido uma alternativa para suprir estas demandas desde a década de 70. Esta técnica apresenta vantagens como: a possibilidade de construção prévia de sequências gênicas sintéticas das proteínas de interesse, diminuição da variação lote a lote, redução no número de animais como modelos experimentais e especificidade superior em relação aos antígenos brutos (PEREIRA, 2009).

A expressão de proteínas recombinantes, sistemas simples e comercialmente disponíveis, é amplamente difundida nas ciências biológicas e biomédicas. No entanto, embora a tecnologia do DNA recombinante seja largamente utilizada para geração de moléculas híbridas e obtenção de antígenos para a preparação de vacinas, poucos estudos diagnósticos ambientais têm sido realizados até o momento.

O objetivo da expressão de uma proteína recombinante é produzir uma amostra que suporte certa atividade bioquímica ou biológica, como catálise enzimática ou interações proteína. Para isso, muito esforço tem sido feito no sentido de aperfeiçoar a *Escherichia coli* como hospedeiro de expressão para uma variedade de classes de proteínas de diferentes organismos a partir de genes sintéticos que, nos últimos anos, vem apresentando quedas significativas nos custos para suas construções (MAKRIDES, 1996; CARUSO, 2007). Este amplo arsenal de ferramentas pode ser usado para aumentar o rendimento de proteínas solúveis para a produção posterior de anticorpos em larga escala.

Uma vez obtidos os anticorpos de interesse, é possível utilizá-los em ensaios ambientais para estabelecer a correlação direta entre a resposta do organismo à xenobióticos e a qualidade de água de reservatórios e rios de abastecimento. Os anticorpos policlonais produzidos contra uma proteína recombinante podem ser utilizados na detecção e quantificação de proteínas endógenas de espécies rastreáveis representativas da diversidade filogenética do Brasil (FOLLE, 2018). Desta forma, as análises de biomarcadores moleculares através de imunoensaios ecotoxicológicos tornam-se promissoras e desafiadoras para a gestão de diferentes classes de poluentes incorporados aos sistemas aquáticos do país. O que faz com que novas abordagens experimentais sejam pesquisadas e utilizadas para este fim.

Os imunoensaios são as principais técnicas empregadas nas análises da MT, mas requerem uma alta demanda de anticorpos e de antígenos, que são matérias-

primas necessárias para a padronização de novas ferramentas moleculares. No entanto, nem sempre é possível a obtenção da proteína de interesse *in situ*. Além disso, alguns fatores ambientais e a inconsistência entre os diferentes lotes também podem interferir na obtenção destas proteínas e/ou alterar suas características, comprometendo a confiabilidade dos resultados. Por isso, neste trabalho foi utilizado um sistema de expressão heteróloga da MT a fim de se preservar a conformação estrutural da proteína para a produção dos anticorpos policlonais e manter a total reprodutibilidade entre os lotes.

Os imunoenaios que vêm sendo utilizados na detecção das MTs são: a) RIA (*Radio immunoassay*), b) FIA (*Fluorescence immunoassay*), c) ELISA (*Enzyme linked immunosorbent assay*) e d) WB (*Western Blot*). Dentre os protocolos disponíveis, os dois últimos merecem destaque nas análises ambientais devido à facilidade e à alta sensibilidade (YAMAMOTO et al., 2017; FOLLE, 2018).

O ELISA (direto, indireto, competitivo, sanduíche ou multiplex) é, atualmente, o ensaio mais usado para sorologia, oferecendo a opção de detectar diferentes classes de anticorpos, bem como usar uma ampla gama de exoantígenos (SANTOS, 2016). É um método de rotina para a determinação da proteína alvo com base na reação entre a proteína de interesse e o anticorpo específico imobilizado em um suporte sólido. No WB, a proteína alvo é desnaturada e separada com base no seu peso molecular por eletroforese em gel e depois transferida para uma membrana (tipicamente de nitrocelulose ou PVDF), onde é detectada através de anticorpos específicos (RYVOLOVA et al., 2011).

Os principais obstáculos no uso do ELISA e outros métodos imunológicos são a necessidade de se evitar a degradação e agregação da molécula alvo e a reatividade cruzada, sendo necessárias otimizações para cada tipo de amostra e para os anticorpos. Além disso, o critério para um antígeno ser considerado um bom imunógeno é a sequência de aminoácidos a ser reconhecida pelo sistema imune do organismo. As MTs endógenas presentes em fluídos e tecidos biológicos são imunógenos que podem ser considerados fracos, uma vez que apresentam alto conteúdo de resíduos de cisteínas na cadeia polipeptídica, baixo peso molecular e baixa variedade interespecies.

Na tentativa de se contornar estes obstáculos, a tecnologia do DNA recombinante é uma alternativa de extrema importância que propicia a construção prévia dos genes para a expressão significativa dos antígenos de interesse. A partir

disso, a produção *in vitro* da MT recombinante de mamíferos e peixes têm tido amplo emprego em *Escherichia coli* (VERGANI et al., 2003; YANG et al., 2007).

As MTs estão presentes em todo o reino animal com um alto grau de homologia. Devido ao seu envolvimento em vários processos e funções vitais, são descritas como essenciais para os organismos. A escolha da espécie exótica *O. aureus* para a construção dos vetores se baseou na quantidade de informações já disponíveis para essa espécie, tanto em literatura quanto no banco de dados (NCBI) em termos de exposição à poluentes, de modo a possibilitar estudos futuros que permitam a comparação dos dados.

Diferentes imunoenaios, como o Western blot e o ELISA têm sido utilizados para análises da interação destas moléculas (CHU et al., 2006; NAGAMINE et al., 2013). Levando-se em conta que o primeiro é uma técnica qualitativa desnaturante, nesse estudo também foi realizado o segundo ensaio a fim de possibilitar estimativas quantitativas do biomarcador alvo e de verificar uma possível presença de epítomos conformacionais perdidos durante a desnaturação.

Devido à elevada quantidade de cisteínas, as MT possuem muitos grupos -SH (tiol ou sulfidril), que formam um sítio de interação com diferentes afinidades para metais bivalentes: $Hg^{2+} > Cu^+ > Cd^{2+} > Cu^{2+} > Zn^{2+}$ (HAMER, 1986). Considerando a absorção de metais tóxicos, a síntese deste tipo de proteína é conhecida por ser induzida no caso de exposição ao Cd em organismos aquáticos, prevenindo sua ação tóxica e danos celulares. O uso de espécies nativas nas avaliações ecotoxicológicas é fundamental, pois apresenta alta disponibilidade e abundância, uniformidade, facilidade de cultivo e manejo e informações ecológicas relevantes compatíveis com a área estudada.

O bagre da espécie *Rhamdia quelen* (QUOY e GAIMARD, 1824) é um peixe nativo de água doce (representante da classe Osteichthyes, série Teleostei, ordem Siluriformes e família Pimelodidae), com ampla distribuição geográfica registrada na América do Sul e Central (KÜTTER et al., 2009). Esta espécie, também conhecida popularmente como jundiá, adota uma estratégia alimentar onívora e generalista, e desperta grande interesse econômico nas pisciculturas da região sul do Brasil pela facilidade de produção em viveiros de terra e tanques-rede, pequenos intervalos entre as gerações, possibilidade de filetagem e, especialmente, pela apreciação da carne no mercado consumidor (GHIRALDELLI et al., 2007).

A taxa de crescimento do jundiá depende da temperatura e é bastante pronunciado nos primeiros anos de vida. O desenvolvimento larval é subdividido em três períodos: larva inicial, larva média e larva tardia, sendo estas fases iniciais caracterizadas pela presença da vesícula vitelina. Subsequentemente a partir do 7º dia após a fertilização, após o consumo de todo o vitelo, os organismos são considerados pós-larvas juvenis (RODRIGUES-GALDINO, 2010). De acordo com a mesma autora, a fase juvenil é o principal período de metamorfose, processo pelo qual o peixe adquire aspecto semelhante ao adulto conforme a Figura 1 e Figura 2, embora ainda seja sexualmente imaturo e de tamanho muito reduzido. Já o período adulto é caracterizado pela maturidade sexual adquirida por volta de um ano de idade em ambos os sexos.

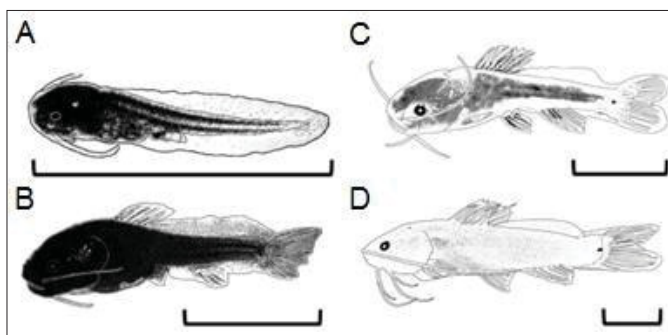


FIGURA 2 - Formas juvenis de *Rhamdia quelen* (A - 7dpf; B - 14 dpf; C - 21dpf; D - 28 dpf). Barra = 0.5 cm. Fonte: modificado de Brandão-Gonçalves e Sebastian, 2013. ** dpf = dias pós-fertilização.



FIGURA 3 - Espécime juvenil (*Rhamdia quelen*) utilizada nos ensaios de toxicidade com CdCl_2 . Barra = 1 cm.

Durante os estádios iniciais de desenvolvimento, os organismos tendem a ser mais vulneráveis do que nas fases tardias (juvenis e adultos) à exposição a contaminantes aquáticos, impactando negativamente na ativação do mecanismo

típico defensivo a partir da síntese de MT. Estudos recentes têm demonstrado essa sensibilidade a diferentes poluentes ou mesmo a misturas complexas (FOLLE, 2018) com risco à manutenção das populações.

Após a fertilização, a quantidade de MT materna transferida ao oócito, diminui durante a clivagem. Essa redução durante a embriogênese pode estar relacionada com a alta demanda de metais essenciais, caracterizada pela rápida síntese de DNA e alta atividade metabólica (RIGGIO et al., 2003). Embora os metais sejam componentes intrínsecos de processos biológicos, é de vital importância que novos estudos elucidem os mecanismos de detoxificação das MTs durante estes estádios em teleósteos, em resposta à exposição a metais tóxicos.

Sendo o jundiá amplamente utilizado como modelo para estudar os efeitos de poluentes aquáticos (BARRETO et al., 2020), e o Cd um dos metais indutores mais significativos na expressão da MT (CHO et al., 2008; WANG et al., 2014), o presente trabalho objetivou o desenvolvimento e aplicação de uma imunoferramenta gerada a partir da MT sintética de tilápia (*Oreochromis aureus*) e produzida em sistema de expressão *E.coli*.

2 JUSTIFICATIVA

A avaliação da qualidade da água pode ser abordada por diferentes ferramentas analíticas, isoladas ou associadas com análises biológicas. A legislação brasileira contempla principalmente a análise química de metais em águas superficiais (Resolução CONAMA 357/2005), ou em material oriundo do sedimento (Resolução CONAMA 421/2010), como parâmetros para definir os níveis de poluição em ambientes aquáticos. Entretanto, a simples análise da presença e da concentração de metais, muitas vezes realizada de maneira descontínua, não constitui necessariamente a real ameaça à biota, além de estar sujeita a erros e incertezas durante o processo.

Uma avaliação da poluição química da água depende de cinco elementos principais: (I) conhecimento do tipo e da fonte do poluente, (II) a disponibilidade de métodos analíticos para a quantificação da variabilidade temporal e espacial das concentrações dos agentes químicos presentes, (III) compreensão da complexidade dos processos que determinam o transporte e o destino no sistema considerado, (IV) modelos matemáticos para projetar estratégias de amostragem ótimas e prever procedimentos de remediação em casos de poluição e (V) métodos de detecção dos biomarcadores na vida aquática e na saúde humana (SCHWARZENBACH et al., 2010).

A preocupação com os impactos nos ambientes naturais tem intensificado a procura por novos procedimentos empregados no biomonitoramento. Diversas adaptações de protocolos moleculares no estudo de proteínas associadas com mecanismos de toxicidade foram desenvolvidas para espécies de peixes, o que já constitui um grande avanço para os estudos de toxicologia ambiental. Porém, ainda se faz necessário aprimorar as metodologias de imunodiagnóstico para avaliações da qualidade da água de mananciais, reservatórios e rios de abastecimento urbano para que sejam simples, rápidas, eficientes e, principalmente, menos dispendiosas.

Uma vez que a expressão diferencial de proteínas está diretamente relacionada com a biodisponibilidade de xenobióticos específicos, a identificação, caracterização e a quantificação das mesmas possibilitam inferir se determinado ambiente hídrico encontra-se impactado por metais. O desenvolvimento de novas ferramentas moleculares para o diagnóstico precoce da degradação de ecossistemas aquáticos, alternativas escassas no cenário brasileiro, podem

possibilitar uma discussão mais segura na investigação da interação complexa entre os poluentes e a biota, incluindo populações humanas. Assim, a aplicabilidade da imunodeteção de biomarcadores é base para a manutenção dos nossos corpos hídricos e fundamental para subsidiar a regulamentação de misturas complexas de poluentes na legislação, um dos maiores desafios contemporâneos da toxicologia ambiental.

De acordo com o pressuposto acima, é fundamental o desenvolvimento de novas biomoléculas indicadoras da poluição aquática por metais, como potenciais ferramentas para o monitoramento da qualidade da água a partir de imunoensaios. A produção de anticorpos, assim como as aplicações dos mesmos na investigação da contaminação aquática por metais pesados, poderá preencher algumas lacunas e contribuir de maneira significativa para o cenário científico e ambiental do país.

Nesse contexto, este trabalho contemplou o desenvolvimento de anticorpos policlonais para a detecção e quantificação da MT da espécie de peixes nativo *Rhamdia quelen*. Em posse de tais moléculas, testadas e caracterizadas adequadamente, as mesmas poderão ser utilizadas de maneira contínua em biomonitoramentos e em avaliações de risco de corpos hídricos, sobretudo, em regiões com significativa influência antrópica.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Desenvolver e caracterizar a metalotioneína de teleósteos como potencial ferramenta molecular para a detecção, por meio de imunoensaios, da biodisponibilidade de metais tóxicos em recursos hídricos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir a metalotioneína de *Oreochromis aureus* através da técnica do DNA recombinante em *Escherichia coli*;
- Produzir anticorpos policlonais anti-MT recombinante em coelhos;
- Padronizar os imunoensaios de detecção da metalotioneína recombinante e da metalotioneína endógena de teleósteos.
- Avaliar a aplicação dos anticorpos em *Rhamdia quelen* expostos aos Cd, em fase embrionária e juvenil;
- Analisar os efeitos genotóxicos da exposição aguda ao cloreto de cádmio em larvas e em tecido hepático de *R. quelen* na fase juvenil.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção dos genes sintéticos

Pelo fato de não haver dados de sequenciamento do DNA do peixe nativo da espécie *Rhamdia quelen* (jundiá), fez-se necessária a seleção de uma sequência nucleotídica codificadora da MT da espécie exótica *Oreochromis aureus* (tilápia) para a montagem dos genes sintéticos (número de acesso: GenBank AAP14677.1).

Dois clones da MT de tilápia, um com uma sequência gênica (M1) e o outro com duas sequências gênicas repetidas (M2), foram sintetizados pela empresa *GenScript* (representados no Brasil pela Fastbio®) no vetor de expressão pET32a (+) (Novagen) (Fig. 4) entre os sítios de restrição *BglII* e *XhoI*. As construções de ambos os genes foram baseadas em sequências de aminoácidos depositadas no Centro Nacional de Biotecnologia e Informação (NCBI). Devido ao baixo peso molecular da MT, a proteína de interesse foi fusionada a uma cauda de tiorredoxina (Trx • Tag™), a uma His₆ • Tag® e a um sítio de clivagem de trombina, de modo a possibilitar a expressão e detecção proteica em sistema *E. coli*, além de favorecer a estabilidade e a solubilidade da proteína recombinante.

4.2 Vetor de expressão bacteriano

Cada clone foi fusionado ao vetor de expressão pET-32a (+) (Novagen) (Fig. 2), desenvolvido para expressão de proteínas recombinantes a níveis elevados em fusão com a Trx • Tag™ e com uma cauda de seis histidinas (His₆ • Tag®) na extremidade N- terminal, para a posterior detecção e purificação por cromatografia de afinidade a metal imobilizado (IMAC). Os vetores pET possuem promotores T7 reguláveis que, quando induzidos, permitem uma grande produção de RNA mensageiro (RNAm) a partir do gene clonado.

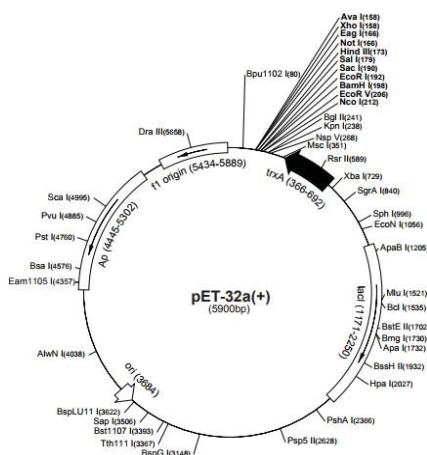


FIGURA 4 - Mapa do vetor para expressão do antígeno recombinante de *O. aureus*. A seta maior indica a localização dos sítios de restrição, local onde é inserida a sequência gênica de interesse. Ap é o gene que confere resistência ao antibiótico ampicilina a este plasmídeo. FONTE: NOVAGEN, (2003).

4.3 Estoque dos clones sintéticos

Para induzir a expansão e preservar a viabilidade dos clones sintéticos, células cálcio competentes de *E. coli* da cepa DH5α foram submetidas à transformação com 1 µl de cada solução de reação de ligação (vetor M1 e vetor M2) para estoque. As amostras foram incubadas em banho de gelo por 30 minutos e então submetidas ao choque térmico a 42°C por 2 minutos. Em fluxo laminar, foi adicionado 1 ml de meio de cultura Lúria-Bertani (LB) (0.5% extrato de levedura, 1.0% triptofano e 1.0% NaCl) para a incubação por 1 hora a 37°C com velocidade de agitação de 200 RPM. Em seguida, as suspensões foram centrifugadas por 5 minutos a 3000 xg. Foram retirados 800 µl do sobrenadante e ressuspensos os 200 µl restantes. Em placas de Petri foram semeadas 100 µl da suspensão em meio LB sólido contendo o antibiótico de seleção ampicilina (100 µg/mL). As placas foram incubadas por 17 horas a 37°C e mantidas na geladeira até o pré-inóculo.

Em fluxo laminar, duas colônias transformadas com os vetores de interesse (correspondentes a M1 e M2) foram selecionadas (*toothpick*), cultivadas separadamente em 5 ml de meio de cultura LB contendo 20 µl de ampicilina (100 µg/mL), e mantidas em pré-inóculo *overnight* sob agitação de 200 RPM a 37°C. Após este período, 300 µl de cada cultura foram ressuspensas em 300 µl de glicerol (80%) e estocadas em nitrogênio líquido.

4.4 Expressão da metalotioneína recombinante

Células cálcio competentes da cepa de *E.coli* BL21B3 star foram submetidas à transformação, com a adição de 1 µl de cada solução de reação de ligação (clone M1 ou clone M2) nas seguintes condições: as amostras foram incubadas em banho de gelo por 30 minutos e então submetidas ao choque térmico a 42°C por 2 minutos, voltando ao banho de gelo por mais 2 minutos. Em fluxo laminar, foi adicionado a cada amostra 1 ml de meio de cultura LB para a incubação por 1 hora a 37°C com velocidade de agitação de 200 RPM. Após este período, as suspensões M1 e M2 foram agitadas durante 5 minutos a 3000 xg. Foram retiradas 800 µl do sobrenadante e ressuspensos os 200 µl restantes. Em placas de Petri foram semeadas, 100 µl da suspensão em meio LB ágar contendo o antibiótico de seleção ampicilina (100 µg/mL). As culturas foram incubadas por 17 horas a 37°C e deixadas na geladeira até o momento do pré-inóculo.

Para a seleção dos clones recombinantes, duas colônias de bactérias transformadas (M1 e M2) foram selecionadas e transferidas para o pré-inóculo de 5 ml de meio de cultura LB com 20 µl ampicilina (100 µg/mL) através da técnica de palitagem. Em seguida, as amostras foram incubadas para crescimento *overnight* sob agitação de 200 RPM a 37°C. Após o período de incubação, 600 µl de cada cultura foram inoculadas separadamente em erlenmeyers contendo 30 ml de meio de cultura LB suplementado com 120 µl de ampicilina (100 µg/ml). As culturas foram então incubadas novamente nas mesmas condições de crescimento até atingir a densidade óptica desejada entre 0,6 a 0,8.

Após as culturas terem atingido o número ideal de células, foi adicionado isopropil β-D-1-tiogalactosidase (IPTG) na concentração final de 0,2 mM em cada inóculo para a indução da expressão das MTs recombinantes por 16 horas. As temperaturas selecionadas para a indução foram de 37, 25 e 15°C. Como controles negativos foram utilizados os mesmos clones, sem ativação pelo IPTG.

As células foram coletadas por centrifugação a 7000 xg por 10 minutos a 4°C, e ressuspensas em tampão de lise 1 (solução de 50 mM, Tris HCl pH 7,4, 100 mM de NaCl, 10 mM de β mercaptoetanol, 5 mM de EDTA e 0,5 mM de PMSF) em 2 ml/g de células, seguido de lise enzimática (0,1 mg/ml de lisozima) em câmara fria à 4°C por 30 minutos sob agitação moderada. Foi adicionado tampão de lise 2 (50 mM Tris HCl, pH 7,4, 100 mM de NaCl, 10 mM de β mercaptoetanol, 5 mM de EDTA, 0,5

mM de PMSF e 2% de Triton X-100) em uma proporção 1:1 para a homogeneização. As células foram sonicadas em banho de gelo (6 ciclos de 20 segundos, pausa de 30 segundos, com amplitude de 20%) para a obtenção do extrato total. Este foi centrifugado a 7000 xg por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante correspondente à fração solúvel foi coletado e fracionado em gel de poliacrilamida a 13% por SDS-PAGE e corado com azul de coomassie blue R250.

Os géis foram preparados a partir de uma solução estoque (p/v) de acrilamida 29,2% e bis-acrilamida 0,8% diluída para uma concentração final de 15% em 375 mM, Tris-HCl, pH 8,8; e SDS 0,1% (p/v) para o gel de separação, e diluída a 4% em Tris-HCl 125mM, pH 6,8; SDS 0,1% (p/v) para o gel de aplicação e concentração das amostras. A polimerização dos géis de concentração e separação ocorreu na presença de persulfato de amônio (PMSF) e TEMED (Sigma-Aldrich, Inc.) nas concentrações finais de 0,1 % e 1:2000 v/v, respectivamente. As proteínas foram preparadas em tampão de amostra (0,0625 M Tris-HCl, pH 6,8; SDS 2%, glicerol 10%; azul de bromofenol 0,0005% e β mercaptoetanol 2,5%), homogeneizadas em vortex e fervidas por 5 minutos a 90 – 100°C. A eletroforese foi realizada a 20 V por cerca de 45 minutos, em tampão Tris-glicina (25 mM Tris base, pH 8,3; 250 mM de glicina, SDS 0,1%). O gel foi corado com azul de coomassie (coomassie blue R250 0,25%, metanol 50%, ácido acético 10%) durante 20 minutos em temperatura ambiente e lavado várias vezes com solução descorante (metanol 30% e ácido acético 10%).

Considerando a alta demanda na quantidade da proteína MT nos imunoensaios, e as possíveis perdas durante as etapas de purificação, as bactérias transformadas com o gene M1 (antígeno que melhor expressou) foram acrescidas de 2L de meio de cultivo após a indução com IPTG a 15°C (temperatura escolhida para a indução). Após um período de 16 horas, as células foram coletadas por centrifugação, totalizando um rendimento de 12 g de células. Estas foram ressuspensas em tampão de lise (Tris-HCl 50 mM, pH = 8,0; 300 mM NaCl e 15 mM de imidazol, 1 mM PMSF) (4ml/g de células) e o extrato foi então submetido a 20 ciclos consecutivos de alta pressão do microfluidificador (M110-P) ajustado a 80 psi. A amostra homogeneizada foi adicionada ao reservatório com um volume inicial mínimo de 16 ml.

A suspensão resultante foi então centrifugada a 20.000 g por 30 minutos a 4°C. O pellet gerado foi analisado em gel de poliacrilamida e congelado a -20°C. Já o

sobrenadante foi conduzido a uma coluna cromatográfica de afinidade. O procedimento foi realizado simultaneamente com o controle positivo GFP (*Green fluorescent protein*) em pET28a resistente ao antibiótico kanamicina.

4.5 Purificação da metalotioneína recombinante

O método cromatográfico utilizado para a purificação do extrato solúvel foi o de afinidade a metal imobilizado (IMAC). O sobrenadante recuperado foi filtrado (0.45 µm) e aplicado no interior de uma coluna HisTrap de 1 ml (GE Healthcare) carregada com volume de níquel e encaixada em um cromatógrafo *ÄKTA purifier* UPC-163900 (GE Healthcare). A coluna foi equilibrada com o tampão A (50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 300 mM de NaCl e 20 mM de imidazol) com fluxo de 1ml. min⁻¹, seguido de um gradiente de 20% CV (volume de coluna) de 0% a 10% do tampão B (50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 300 mM de NaCl e 400 mM de imidazol).

A eluição da fusão MT-Trx foi realizada com um gradiente CV de 20% de 10% a 50% de tampão B e um gradiente de 5% de CV de 50% a 100% de tampão B, com um fluxo de 1 ml.min⁻¹. As frações: pré-coluna, flow, lavagens e purificação foram fracionadas em gel de poliacrilamida a 13% e posteriormente coradas com azul de coomassie R270. Às frações purificadas foram adicionadas 50 mM do agente redutor β mercaptoetanol para o armazenamento a -20°C. O eluato da fusão MT-Trx foi dialisado (membrana 3,000 MWCO - 171 Millipore Corp., Bedford, MA, USA) em PBS a 4°C e concentrado a 1 mg/ml por ultrafiltração (Amicon Ultra-0.5 Centrifugal Filter 3,000 MWCO – Merck) antes da imunização ou da clivagem. A concentração proteica foi determinada através do espectrofotômetro (Thermo Scientific™ NanoDrop 2000) a 280 nm e analisado em gel de eletroforese (15 ou 18% 0.75 mm)(SDS-PAGE) sob condições redutoras (Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis systems BioRad), corado com coomassie Blue G250 ou transferido para uma membrana de PVDF para análises de Western blot.

4.6 Produção dos anticorpos policlonais anti-MT-Trx

Dois coelhos machos da raça neozelandesa (*Oryctolagus cuniculus*), com 1 ano de idade (1,2 kg), foram obtidos na Fazenda Experimental de Canguiri – UFPR. Os animais foram transportados até o Centro de Produção e Pesquisa de

Imunobiológicos (CPPI) (vinculado à Secretaria de Saúde do Estado do Paraná), e aclimatados em gaiolas individuais com disponibilidade de água e alimento. As normas de bem estar animal foram seguidas e aprovadas pela comissão de ética da UFPR.

Antes da primeira imunização foram coletadas 4 ml de soro pré-imune da porção auricular como controle negativo. Após este procedimento, os coelhos foram imunizados com 0,2 mg de proteína recombinante (volume total de proteína de 500 μ l) na primeira imunização e quatro reforços de 0,1 mg (massa total de proteína em 500 μ l) com intervalo de três semanas e quatro semanas (nos últimos dois reforços). Na primeira imunização, as proteínas recombinantes foram homogeneizadas em adjuvante completo de Freund e as demais com adjuvante incompleto de Freund (Sigma-Aldrich).

As suspensões contendo os antígenos foram inoculadas nos coelhos por via subcutânea distribuídas em cinco pontos da região dorso lombar. A veia marginal auricular foi usada para a coleta de sangue a partir da terceira inoculação. Após o quarto e último reforço (após 9 dias), foi realizada a coleta total de sangue por punção cardíaca para a separação do soro e análise dos anticorpos policlonais produzidos.

Para o procedimento da punção, os coelhos foram anestesiados com cetamina-xilazina 40:5 mg. Kg⁻¹ para a eutanásia através de uma injeção de cetamina-xilazina 240:27 mg. Kg⁻¹. O sangue coletado foi centrifugado a 7000 RPMa 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi retirado e o soro armazenado a -20°C até o momento da purificação dos anticorpos policlonais anti-MT-Trx. Os resultados foram analisados através da técnica de Western blot.

As proteínas recombinantes purificadas (100 ng/poço) foram separadas por SDS-PAGE e transferidas para uma membrana de nitrocelulose (sob voltagem de 100 V, por 1 hora, a 4°C). A membrana foi bloqueada durante 1 hora com TBS-T (1M Tris-HCl, pH 7,4; 4M NaCl e 0,05% Tween-20) contendo 5% de leite em pó desnatado liofilizado. O soro do coelho foi testado em uma curva decrescente de titulação nas concentrações diluídas em tampão de bloqueio.

Os anticorpos ligados foram detectados com anticorpos anti-coelho acoplados a HRP (horseradish peroxidase, 1:4000 - BioRad) diluídos em solução de bloqueio. A membrana foi lavada com TBS-T entre as incubações com os anticorpos primários

e secundários. A reação foi revelada usando o kit quimioluminescente da Pierce (fotografia Hyperformance ou Kodak filme) com exposição máxima de 20 minutos.

Antes da purificação dos anticorpos presentes no soro, a MT recombinante, já previamente purificada por cromatografia de afinidade, foi submetida a uma segunda estratégia de purificação por cromatografia de troca iônica para aumentar a especificidade anticorpo-antígeno durante o procedimento de purificação.

4.7 Clivagem da MT-Trx

Após a diálise em PBS, a proteína em fusão (MT-Trx) foi diluída (3x) em uma composição de tampão ativado (50 mM Tris-HCl pH 6,8; 150 mM NaCl; 2,5 mM CaCl_2 ; 10 μM heparina) e, em seguida, misturada com trombina serina protease (plasma bovino - Sigma-Aldrich), na proporção de 0,1 unidade para cada 10 μg de fusão proteica.

Após 16 horas a 4°C, a reação foi parada por congelamento à - 20° C e a mistura foi incubada com resina IMAC carregada com níquel (Ni Sepharose 6 Fast Flow - GE Healthcare) por 2 horas em tampão de ligação, de acordo com os procedimentos descritos anteriormente. Enquanto o domínio Trx clivado contendo a His₆ • Tag® permaneceu na resina, a MT foi recuperada da fração de fluxo com uma baixa concentração de imidazol (20 mM), dialisada contra tampão fosfato (0,1 M pH 7,4) e adsorvida às microesferas para a purificação dos anticorpos policlonais (anti-MT-Trx) do soro.

4.8 Purificação dos anticorpos policlonais anti-MT-Trx

Para isolar os IgGs do soro do coelho, 50 μg da MT-Trx recombinante ou 100 μg de MT comercial (Metallothionein COP03 - 208 Creative BioMart) foram utilizadas para purificar os anticorpos policlonais anti-MT-Trx por meio da cromatografia de imunoafinidade.

As proteínas foram adsorvidas em microesferas magnéticas (Dynabeads® M-270 Epoxy – Invitrogen) conforme as instruções do fabricante. Estas microesferas biorreativas possuem grupamentos Epoxy os quais permitem a ligação covalente de uma ampla variedade de proteínas em sua superfície. Desta forma, moléculas alvo pode ser capturadas diretamente de amostras biológicas. O protocolo de

acoplamento da proteína às microesferas é constituído de três etapas: a) acoplamento da proteína, b) captura dos anticorpos do soro e c) eluição dos anticorpos. Este ensaio foi realizado com 5 mg ($\sim 3,3 \times 10^8$) de microesferas para 0,5 mL de antissoro de coelho diluído (1:1) em PBS por um período de 16 horas a 4°C.

As frações proteicas purificadas foram quantificadas (concentração de 0,382 mg/ml) e centrifugadas por 10 minutos (20.000 xg) à 4°C. As microesferas foram dissolvidas em solvente orgânico DMP (Dimetilformamida) (Merck), conforme as instruções do fabricante, de modo que em cada 165 μ L estivessem 5 mg ($\sim 3,3 \times 10^8$) de microesferas.

As microesferas foram vortexadas por 30 segundos e foram pipetadas 5 mg (165 μ L) da solução para cada 100 μ g da proteína a ser acoplada. A solução foi mantida em repouso por 60 segundos na estante magnética. O sobrenadante obtido foi cuidadosamente descartado para duas lavagens com 1 ml de tampão de acoplamento (0,1 M NaH_2PO_4 , pH 7.4). A cada lavagem, as microesferas eram deixadas em repouso por 1 minuto antes da retirada do sobrenadante. Em seguida, foram acrescentados 0,5 ml de tampão de ativação (1,5M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) e 0,5 ml da proteína ligante.

A solução foi incubada sob agitação leve e constante por 24 horas a 4°C. Após este período, as microesferas foram lavadas três vezes com 1 ml de tampão de ligação (PBST 0,05%) em estante magnética para os espaços livres da superfície das microesferas serem bloqueadas com 1 ml do tampão de bloqueio (PBS-T 0,05% e leite desnatado 1%) sob agitação constante por 30 minutos a 4°C.

As microesferas foram novamente lavadas como descrito anteriormente com tampão de ligação. Para a captura dos anticorpos foram adicionados 0,5 ml de soro diluído em tampão de ligação (1:1) para cada 5 mg de microesferas. A solução foi incubada sob agitação leve e constante por 16 horas a 4°C. As microesferas foram lavadas três vezes com 1 ml de tampão de ligação cada em estante magnética antes da eluição dos anticorpos.

A liberação dos anticorpos das microesferas ocorre pela redução do pH do meio e sua recuperação se dá quando as microesferas são retidas na parede dos microtubos quando estes são encaixados nas estantes magnéticas adequadas. Para a eluição dos ligantes foram pipetados 90 μ L do tampão de eluição (0,1M de citrato, pH 3,1) para cada 5 mg de microesferas. A solução foi agitada por 2 minutos e deixada em repouso na estante magnética por 1 minuto. Em seguida o

sobrenadante foi coletado e neutralizado com a 1/10 volume (10 µL) de Tris-HCl (1M, pH 8,8 em 1/5 de volume da eluição). A eluição foi repetida mais duas vezes antes dos anticorpos anti-MT-Trx purificados serem transferidos para o tampão de armazenamento, aliquotados e estocados a -20°C até o momento do uso.

A eficácia da ligação do anticorpo às moléculas da MT1 imobilizadas nas microesferas, assim como o grau de pureza destes anticorpos foram analisados através de SDS-PAGE e sua concentração estimada com base na absorbância medida pelo Espectrofotômetro NanoDrop® 2000 (Thermo Scientific).

4.9 Validação dos anticorpos purificados

Coleta dos espécimes da ictiofauna do Rio Iguaçu

Para validar a detecção da MT endógena pelos anticorpos policlonais purificados do soro, foram utilizadas amostras de fígado de diferentes espécimes de peixes aqui denominadas de bioindicadores. As amostras de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), Mandi (*Pimelodus maculatus*), Curimbatá (*Prochilodus lineatus*) e de Dourado (*Salminus brasiliensis*) foram cordialmente cedidas pelodoutorando Dámaso Ángel Rubio Vargas.

Em seu estudo, alevinos de Tilápias do Nilo foram obtidos da piscicultura Panamá, transportados, engaioladas e posicionados em três regiões do Reservatório de Salto Segredo, onde foram mantidos durante 6 meses. Este é um importante reservatório de água no baixo Rio Iguaçu (SE, 25°79'13" S, 52°11'89" W), porém, amplamente impactado por metais provenientes de atividades urbanas, industriais e agrícolas.

Por um mesmo período de exposição, um grupo controle de tilápias foi mantido em tanques de 500 L contendo água filtrada do reservatório (Inox Water Tank Filter for Central Inlet 500 l/h – Tecsol) na estação de piscicultura da COPEL. Esses animais foram alimentados com ração comercial a cada dois dias e posteriormente coletados e transportados até o laboratório da estação da piscicultura da COPEL para a remoção dos tecidos de interesse. Paralelamente foram coletadas quatro espécies de peixes nativas do Reservatório de Salto Segredo (*Pimelodus maculatus*, *Prochilodus lineatus* e *Salminus brasiliensis*) para a avaliação da reatividade dos anticorpos purificados contra a MT endógena de extrato de fígado.

Amostra de fígado:

Antes da coleta do fígado, os peixes foram anestesiados com MS222 (0,02%) (metanossulfonato de tricáina - 100 mg/L) e sacrificados por secção espinhal. O órgão foi imediatamente removido e congelado em nitrogênio líquido para o transporte até o Laboratório de Toxicologia Celular (UFPR) onde foram armazenadas a -80°C, até as análises. As amostras foram fragmentadas em alíquotas de 100 mg e homogeneizadas por três ciclos de três minutos em um sistema TissueLyser II (QIAGEN®) (Frequência de 30 Hz a 4°C) em uma proporção de 100 mg / mL do tampão contendo 50 mM carbonato / bicarbonato pH 9,6, ureia 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 2%, glicerol 10%, DTT 20 mM, EDTA 1 mM e PMSF 1 mM.

O extrato foi incubado à temperatura ambiente (25°C) por 30 minutos com uma agitação constante de 50 RPM seguida por sonicação (3 ciclos de 20 segundos com um intervalo de 60 segundos em gelo) e centrifugação (30 minutos a 14.000 RPM, 4°C). As proteínas totais do sobrenadante foram estimadas por espectrofotômetro a 280 e 320 nm com as amostras diluídas 25x em PBS para evitar a interferência do tampão e, em seguida, foram analisadas por imunoenaios.

Western blot:

Os antígenos foram diluídos em tampão de amostra 4x, aquecido a 95°C por 5 minutos e distribuídos no gel em cuba vertical. As amostras da fusão MT-Trx (5 µL/poço), das proteínas clivadas (15 µL/poço) e do extrato de fígado de cada espécie de peixe (50 µg/poço) foram previamente fracionadas pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida a 15% (SDS-PAGE), sob condições de redução.

As condições de corrida do gel foram: corrente 20 mA e voltagem de 15V por, aproximadamente, 1 hora e meia. Para a estimativa da massa molecular das proteínas foi utilizado o marcador BenchMark™ ProteinLaderc previamente corado. Em seguida, as amostras foram transferidas do gel para uma membrana de 0,45 µm de PVDF (difluoreto de polivinilideno) (Millipore, Bedford, MA) através do Trans- Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell (BioRad) por 20 minutos.

Em seguida, a membrana foi bloqueada com leite em pó a 5% (w/v) em PBS-T (Phosphate Buffered Saline-Tween-20, 0.05%) durante 60 minutos a temperatura ambiente. Passado o período de bloqueio, as proteínas imobilizadas foram

detectadas com: i) antissoro não processado de coelho (1:200); ii) anticorpos imunopurificados por fusão de proteína recombinante MT-Trx (anti-MT-Trx) (1 µg/mL); iii) anticorpos imunopurificados por MT comercial de coelho (Anti-MTC)(1µg/mL); iv) anticorpo policlonal comercial para MT de peixe (Abcam: ab36882) (pAb-C) (1: 100) e v) anticorpo monoclonal para MT nativa comercial (Rheabiotech, Campinas, Brasil) (mAb-MTC) (2 µg/mL) em tampão PBS-T por 16h a 4°C, seguido por incubação secundária com IgG-AP anti-coelho / camundongo (Invitrogen / Thermo Fisher Scientific) (1:10.000) por 60 minutos a temperatura ambiente.

Após cada etapa de incubação, as membranas foram lavadas três vezes com PBS-T em agitação constante por cinco minutos. A reação da membrana foi revelada com NBT / BCIP (11697471001 - Roche / Merck) por 1-2 minutos.

Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA):

Inicialmente, os ensaios indiretos em sanduíche foram realizados por adsorção dos anticorpos policlonais purificados (anti-MT-Trx) em microplaca de poliestireno (Maxisorb; Nunc, Roskilde, Dinamarca) por 16 horas a 4°C. Estes anticorpos foram previamente diluídos em tampão (0,1 M Bicarbonato / carbonato, pH 9,6) a 0,5, 1, 10, 100 e 1.000 ng/poço, e as ligações inespecíficas foram bloqueadas com 0,2 mL/poço de albumina de soro bovino (BSA) a 1% (p/v) (Sigma- 263 Aldrich) em PBS-T por 1 hora em temperatura ambiente.

Como controle positivo, 1 µg/poço da proteína recombinante MT-Trx diluída em PBS-T foi adicionado ao ensaio e incubado por 2 horas. Para a análise de MT hepática, a microplaca foi revestida com 50 µg/poço das proteínas totais do extrato de fígado, de acordo com as condições descritas acima. Foi realizada uma titulação prévia para definir a melhor diluição e, em seguida, todas amostras de fígado foram incubadas com: i) antissoro não processado (1:500); ii) Anti-MT-Trx (1 µg/mL); iii) Anti-MTC (1 µg/mL); iv) pAb-C (1:100); v) mAb-MTC (2 µg/mL).

As interações amostra/anticorpos foram detectadas pelo anticorpo secundário (anti-coelho - Bio-Rad # 1721019 / anti-camundongo - Invitrogen # 62-6520), conjugado com HRP (1:3.000) por 1h à temperatura ambiente. Após cada etapa de incubação, as placas foram lavadas quatro vezes com PBS-T. A reação de cor foi originada pela adição do substrato TMB (3,3', 5,5-tetrametilbenzidina), por 20 minutos, seguido da adição de 50 µl/poço de H₂SO₄ (2M) para parar a reação. A

absorbância do ensaio foi medida no Leitor de microplaca multimodo Varioskan™ LUX 275 (Thermo Fisher Scientific) a 450 nm.

4.10 Extração e detecção da MT endógena de *Rhamdia quelen*

Coleta das amostras biológicas:

Segundo consta na literatura, ensaios de toxicidade nas fases iniciais de desenvolvimento (embrionário e larval) são promissores não só sob a perspectiva ética, mas por se enquadrarem em uma categoria desprotegida altamente sensível às substâncias químicas presentes na água. Quando se trata das fases tardias de desenvolvimento (juvenil e adulto) de teleósteos expostos a metais tóxicos, o fígado é o órgão em que a MT é encontrada em maior abundância. Com esse propósito, tanto as larvas quanto o fígado dos peixes juvenis da espécie *Rhamdia quelen* foram coletados, pesados e armazenados a -80°C até a realização dos imunoenaios.

Coleta das Larvas:

Dois adultos, um macho e uma fêmea, da espécie nativa *Rhamdia quelen* foram mantidos a $24 \pm 1^\circ\text{C}$ em tanques de 1000 litros com fluxo contínuo de água, na piscicultura Panamá (Santa Catarina, Brasil). A fertilização dos ovócitos foi realizada de acordo com Graeffet et al. (2008).

A fêmea recebeu duas doses de injeções intramusculares de extrato hipofisário de carpa ($0,5$ e $4,5 \text{ mg kg}^{-1}$), diluído em solução salina em intervalos de 8 horas. A desova ocorreu em recipiente de plástico seco, através de uma massagem na região ventral da fêmea. Em seguida, a fertilização foi promovida através da mistura mecânica dos gametas, os ovos fertilizados foram hidratados, devidamente acondicionados em sacos plásticos com atmosfera rica em oxigênio e transportados para o Laboratório de Toxicologia Celular da Universidade Federal do Paraná.

Os ovos fertilizados foram avaliados 8 horas após a fertilização (hpf), e aqueles considerados viáveis nesta fase de gástrula foram selecionados pela morfologia através do estereomicroscópio Leica ($0,7$ a $4,5\times$), de acordo com Rodrigues-Galdino et al. (2010).

Para os ensaios de toxicidade, foi distribuído um ovo viável por poço em microplacas de 96 poços contendo 1 mL de solução teste de cloreto de cádmio (CdCl_2) (Sigma-Aldrich). As concentrações testadas foram baseadas nos valores permitidos pela resolução do CONAMA (2005) (0,1 $\mu\text{g/L}$, 1 $\mu\text{g/L}$ e 10 $\mu\text{g/L}$ de cádmio) encontrados em água doce no Brasil.

Foram 3 placas por tratamento, em cada tempo de exposição: em 18 hpf (10 horas de exposição) e em 28 hpf (26 horas de exposição). O grupo controle foi apenas mantido em água reconstituída (0,0065 g/L CaCl_2 , 0,1335 g/L MgSO_4 , 0,0004 g/L KCl, 0,0105 g/L NaHCO_3) durante o experimento. 50% das soluções de todos os poços foram substituídas diariamente para a remoção de resíduos metabólicos e promoção da oxigenação do meio.

As placas foram acondicionadas sob temperatura controlada a 24°C em incubadora. Após cada tempo de exposição hídrica, os indivíduos foram anestesiados com eugenol (50 mg/L), coletados através de uma pipeta Pasteur e armazenados em freezer a -80°C até os imunoenaios.

Coleta do fígado dos juvenis:

Jundiás juvenis foram aclimatados em tanques de 200 litros com aeração constante na piscicultura Panamá (Santa Catarina, Brasil). Um total de cinco peixes por tanque em duplicatas, para cada tratamento, ficaram expostos às concentrações de Cd permitidas pela resolução do CONAMA (2005) (1 $\mu\text{g/L}$ e 10 $\mu\text{g/L}$) e a uma concentração superior ao limite estabelecido (100 $\mu\text{g/L}$). O grupo controle foi mantido somente em água da própria piscicultura.

Após cinco dias de exposição hídrica, os peixes foram anestesiados com MS222 (100 mg/L - 0,02%) e, a partir da completa paralisação dos movimentos operculares, foi realizada a eutanásia por secção medular. Os tecidos hepáticos foram coletados através de uma incisão na cavidade abdominal. Em seguida, as amostras foram transportadas em nitrogênio líquido até o laboratório de Toxicologia Celular onde foram armazenadas em freezer a -80°C para os imunoenaios.

Extração das proteínas totais das amostras biológicas

Para facilitar a extração de proteínas do fígado de peixes, quando realizadas em campo, procurou-se estabelecer um protocolo que seja eficaz na lise celular somente com base na composição do tampão. Após o completo descongelamento (4 h a 4°C), os fígados de cada tratamento foram simultaneamente homogeneizados através do tissuelyser (Brand) (24 Hz) em tubos eppendorf separados contendo 1,5 ml tampão RIPA modificado (0,1M tampão Borato pH 9.5; 300 Mm NaCl; Glicerol (15%); NP-40 (0,5%); Triton X-100 (1%)) e uma microesfera. Simultaneamente cerca de 50 larvas inteiras de cada tratamento, de cada período de exposição, também foram homogeneizadas pela mesma metodologia descrita.

No momento da homogeneização foram adicionados 10 mM β mercaptoetanol e 1 mM de PMSF. Em seguida, o extrato obtido foi clarificado por centrifugação (20.000 xg, 30 minutos, 4°C). Alíquotas de 25 μ l do sobrenadante foram aplicadas em SDS-PAGE ou armazenadas a -20°C para os imunoenaios.

4.11 Detecção da MT endógena por imunoenaios

Western blot:

Alíquotas de 15 μ L de cada condição testada foram aplicadas no SDS-PAGE 15%, e transferidas para uma membrana do PVDF em sistema semi-seco (BioRad) por 40 minutos a 20 volts. A membrana foi bloqueada com 5% de leite em pó desnatado, diluído em TBS-T (tampão tris salino suplementado com 0,1% Tween-20) por 1 hora sob agitação constante em temperatura ambiente.

Após 3 lavagens de 5 minutos cada em TBS-T, as proteínas imobilizadas na membrana foram detectadas com os anticorpos policlonais anti-MT-Trx (2,5 μ g/ml) diluídos em 2,5% (w/v) TBS-T leite (Molico) por 16 horas a 4°C e, posteriormente, com o conjugado anti-coelho IgG-AP (Invitrogen) (1:5000) por 1 hora em temperatura ambiente. Ao final de cada incubação, a membrana foi lavada 3 vezes com tampão TBS-T sob agitação constante por 5 minutos. A membrana foi revelada com o substrato específico da AP (Kit BCIP/NBT, Promega) por 5 minutos.

ELISA:

Para determinar a concentração de uma determinada molécula em uma amostra biológica através do ELISA, é realizada uma curva padrão, utilizando uma proteína de concentração conhecida em diferentes diluições.

Para este ensaio foi utilizado a proteína MT-Trx, cuja massa foi estimada por meio da absorbância obtida no Espectrofotômetro NanoDrop® 2000 (Thermo Scientific) e por SDS-PAGE, frente à comparação visual com uma curva padrão da proteína BSA, sob diferentes diluições. A curva padrão foi realizada a partir de diluições seriadas (0; 0,1; 1, 10, 100 e 1000 ng/mL) da proteína MT-Trx (0,2 mg/mL) em tampão PBS-T (tampão fosfato salino acrescido de 0,05% de tween-20), sendo, imobilizado 25 ng/poço (250 ng/mL) do anticorpo policlonal anti-MT-Trx nas microplacas de 96 poços.

ELISA sanduíche de captura:

A detecção da metalotioneína endógena foi realizada através do ELISA colorimétrico no formato sanduíche indireto em microplacas de 96 poços (Marca/ Greiner):

Sensibilização:

Foram adicionadas 100 µL/poço do anticorpo policlonal anti-MT-Trx (0,25 µg/mL) (25 ng/poço) diluído em *Coating Buffer* (1,5 g de Na₂CO₂ (PM 105,99); 2,93 g de NaHCO₃ (PM 84,01); água ultrapura para 1L – pH 9,6). As microplacas foram cobertas com selo adesivo por um período de incubação de 16 horas a 4°C. Após este período a solução foi descartada por inversão e o excesso foi retirado através de 3 leves batidas em papel toalha de alta absorção. Cada poço foi lavado 3 vezes com 200 µL/poço do *Wash Buffer* por 1 minuto (Phosphate Buffered Saline (PBS) 1x; 0,05% de Tween-20). O excesso de líquido foi retirado novamente em papel toalha de alta absorção.

Bloqueio:

Foram adicionados 200 µl/poço do *Blocking buffer* (Phosphate buffered saline (PBS) 1x; 0,05% de Tween-20; 5% (p/v) de BSA 1%). Após a incubação por um período de 1 hora em temperatura ambiente (entre 22°-25°C), a solução foi totalmente descartada por inversão e o excesso de líquido retirado em papel toalha de alta absorção. Em seguida, os poços foram lavados 3 vezes com 200 µL/poço de PBS-T por 1 minuto sob agitação leve. O excesso de líquido foi retirado novamente em papel toalha de alta absorção.

Captura:

Para a captura, foram adicionados 100 µl/poço de amostra em cada poço: sendo fígado de *Rhamdia quelen* (1:1) diluído em PBS; larvas de *Rhamdia quelen* diluídas em tampão RIPA modificado; Controles positivos (1 mg/ml em PBS) (fígado de tilápia controle = 20,5 mg/mL; fígado de tilápia do reservatório (20,5 mg/L); fígado de mandi do reservatório (15 mg/mL); MT comercial de coelho (1 mg/mL) e MT-Trx (200 µg/mL). Após 2 horas em temperatura ambiente, sob agitação leve (10 RPM), as soluções foram descartadas da microplaca por inversão e o excesso de líquido retirado em papel toalha de alta absorção. Em seguida, os poços foram lavados 4 vezes com 200 µl/poço de PBS-T por 1 minuto sob agitação leve. O excesso de líquido foi retirado novamente em papel toalha de alta absorção.

Detecção primária:

Para a incubação primária foi adicionado 1 µg/mL do anticorpo purificado anti-MT-Trx (150 µg/mL) diluído em tampão de bloqueio. Após 90 minutos em temperatura ambiente (entre 22°-25°C), sem agitação, a solução foi descartada da microplaca por inversão e o excesso de líquido retirado em papel toalha de alta absorção. Em seguida, os poços foram lavados 3 vezes com 200 µL/poço por 1 minuto sob agitação leve. O excesso de líquido foi retirado novamente em papel toalha de alta absorção.

Detecção secundária:

Para a incubação secundária foram adicionados 100 µL/poço do anticorpo conjugado (anti-igG de coelho-HRP) diluído 1:3000 em tampão de bloqueio. Após 60 minutos em temperatura ambiente, a solução foi descartada por inversão e o excesso de líquido retirado em papel toalha de alta absorção. Em seguida, os poços foram lavados 3 vezes com 200 µL/poço de *Wash Buffer* por 1 minuto sob agitação leve. O excesso de líquido foi retirado novamente em papel toalha de alta absorção.

Revelação:

Para a revelação foram adicionados 100 µL/poço do substrato TMB em temperatura ambiente. Após 10-15 minutos em ausência de luz, a reação de parada foi realizada com 100 µL/poço de ácido sulfúrico (2 M). A absorbância da reação foi medida no leitor de microplacas (Brand) a 450 nm no equipamento Synergy HTX (BioTek) em até no máximo 30 minutos após a parada da reação. Os resultados foram analisados pelo programa de estatística GraphPad Prism 8.

ELISA competitivo:

A detecção da metalotioneína endógena também foi realizada através do ELISA competitivo em microplacas de 96 poços (Marca/ Greiner):

Foi adicionado 100 µL/poço da MT comercial de coelho (20 ng/poço) diluído em *Coating Buffer* (1,5 g de Na₂CO₂ (PM 105,99); 2,93 g de NaHCO₃ (PM 84,01); água ultrapura para 1L – pH 9,6). As microplacas foram cobertas com selo adesivo por um período de incubação de 16 horas a 4°C, no agitador. Foi colocado um “branco” somente com 100 µL/poço de tampão para determinação de efeitos de ligações não específicas. A curva padrão foi conduzida nestas condições em triplicatas, nas diluições testes de 0,01; 0,1; 1; 10; 100; 1000; 10.000 ng MTC/ml.

Paralelamente foi conduzida uma pré-incubação de 200 µL de MT endógena, dos diferentes tratamentos das larvas e fígado de juvenis, diluída em PBS com 200 µL de anti-MT-Trx (concentração final de 1 µg/ml) em um microtubo overnight a 4°C, no shaker. Após este período a solução foi descartada por inversão e o excesso foi retirado através de 3 leves batidas em papel toalha de alta absorção. Cada poço foi

lavado 3 vezes com 200 µL/poço do *Wash Buffer* por 1 minuto (Phosphate Buffered Saline (PBS) 1x; 0,05% de Tween-20). O excesso de líquido foi retirado novamente em papel toalha de alta absorção.

Bloqueio:

Foi adicionado 200 µL/poço do *Blocking buffer* (Phosphate buffered saline (PBS) 1x; 0,05% de Tween-20; 5% (p/v) de BSA 1%. Após a incubação por um período de 90 minutos em temperatura ambiente (entre 22°-25°C) e sem agitação, a solução foi totalmente descartada por inversão e o excesso de líquido retirado em papel toalha de alta absorção. Em seguida, os poços foram lavados 3 vezes com 200 µL/poço de PBS-T por 1 minuto. O excesso de líquido foi retirado novamente em papel toalha de alta absorção.

Captura:

Para a captura, foi adicionado 100 µL/poço da mistura pré-incubada de amostra com os anticorpos policlonais anti-MT-Trx do microtubo para cada poço por 120 minutos a temperatura ambiente (em triplicatas), sob agitação muito lenta (10 RPM). Na sequência, as soluções foram descartadas da microplaca por inversão e o excesso de líquido retirado em papel toalha de alta absorção. Os poços foram lavados 4 vezes com 200 µL/poço de PBS-T por 1 minuto. O excesso de líquido foi retirado novamente em papel toalha de alta absorção.

Deteção indireta:

Para a detecção foi adicionado 100 µg/mL do anticorpo anti-igG coelho-HRP diluído 1:3000 em solução de bloqueio, por 60 minutos e sem agitação. Após este período, a solução foi descartada da microplaca por inversão e o excesso de líquido retirado em papel toalha de alta absorção. Em seguida, os poços foram lavados 3 vezes com 200 µL/poço de PBS-T por 1 minuto. O excesso de líquido foi retirado novamente em papel toalha de alta absorção.

Revelação:

Para a revelação foram adicionados 100 µL/poço do substrato TMB em temperatura ambiente. Após 20-30 minutos em ausência de luz, a reação de parada foi realizada com 100 µL/poço de ácido sulfúrico (2 M). A absorbância da reação foi medida no leitor de microplacas (Brand) a 450 nm no equipamento Synergy HTX (BioTek) em até no máximo 30 minutos após a parada da reação. Os resultados foram analisados pelo programa de estatística GraphPad Prism 8.

4.12 Detecção de quebras simples de DNA

Os danos no DNA foram avaliados através do ensaio de precipitação alcalina proposto por Olive (1988), que utiliza a fluorescência para quantificar vestígios de DNA (Gagné & Blaise, 1993). Esta técnica separa vestígios livres de DNA do DNA genômico.

Para a lise das células, foram adicionados 200 µL de solução SDS (detergente dodecil sulfato de sódio) (2%) contendo 50 mM de NaOH, 10 mM TRIS e 10 mM de EDTA para 25 µL de cada homogenato de tecido. Em seguida, foi adicionado 200 µL de cloreto de potássio (0,12 M). A mistura foi mantida em banho maria a 60°C por 10 minutos e resfriada a 4°C por 15 minutos para precipitar as nucleoproteínas associadas ao SDS e DNA genômico. A mistura foi ainda centrifugada a 8000 ×g por 5 minutos para melhorar o processo de precipitação.

Os níveis de DNA (de fita simples e dupla) restantes no sobrenadante foram detectados misturando 50 mL do sobrenadante com 150 µL de corante Hoescht (NaCl 0,4 M, coleato de sódio 4 mM e tris-acetato 0,1M, pH 8,5), na concentração de 1 mg/mL em tampão fosfato 100 mM, pH 7,0. As cadeias de DNA foram quantificadas usando fluorescência (λ_{ex} 360nm e λ_{em} 450nm) após coloração com o corante Hoescht. Soluções padrão de DNA de esperma de salmão foram usadas para calibração. As concentrações das proteínas foram determinadas por espectrofotometria a 595 nm (Bradford 1976), com BSA como padrão. Todas as análises de biomarcadores foram realizadas em um leitor de microplacas.

A metodologia do preparo de cada solução está detalhada na seção do apêndice.

4.13 Análises estatísticas

Os dados foram representados por médias $\pm$ desvio padrão (D. P.) e analisados pelo GraphPad Prism 8. Foi considerada a análise de variância unilateral para teste de homogeneidade dos dados e método de Tukey para comparações múltiplas.

As diferenças estatísticas dos valores médios dos dados hepáticos foram analisadas através de Kruskal-Wallis (H), seguido de um teste post hoc de Dunn. Os dados das larvas foram analisados utilizando a análise de variância bidirecional (ANOVA) e o teste de Bonferroni como pós-teste para comparar os grupos. Os valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significantes (GraphPad Prism™).

4.14 Comitê de ética

Todos os experimentos com os animais descritos foram realizados de acordo com as diretrizes para a proteção do bem-estar animal, e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA / BIO nº 662, 15/12 / 2013).

5. RESULTADOS

5.1 Construção da proteína recombinante (MT-Trx)

O uso da TrxA no vetor bacteriano foi necessário favorecer a estabilidade ou solubilidade da MT recombinante (MT-Trx). Os dados teóricos da ferramenta ExPASy ProtParam mostram que o vetor pET32a construído com a MT de *O. aureus* codifica uma proteína de fusão MT-Trx, com peso molecular de 22,3 kDa e com 211 aminoácidos.

A proteína fusionada foi clivada no sítio de reconhecimento pela protease trombina resultando na proteína Trx com 13,9 kDa (Fig. 5a), com 129 aminoácidos e na 6xHis-tag que permite a sua detecção ou purificação, e na MT com 8,4 kDa, 82 aminoácidos (Fig. 5a) incluindo um peptídeo fundido terminal de 2,4 kDa (Fig. 5b).

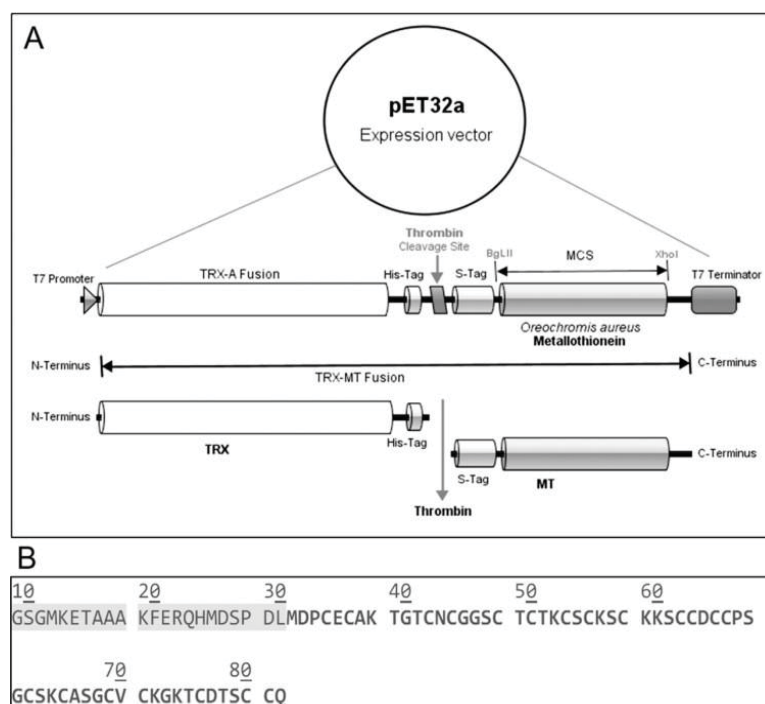


FIGURA 5 - Esquema da construção da fusão MT-Trx. A) Estrutura da construção do gene sintético para expressão da proteína metalotioneína em *Escherichia coli* em um sistema de vetor de fusão tiorredoxina. TrxA) Gene da tiorredoxina da bactéria *E. coli* presente no vetor pET32a. MCS) Local de clonagem múltipla. MT) Metalotioneína. BglIII, XhoI) Enzimas de restrição. B) Sequência de aminoácidos de *O. aureus* com uma fusão de peptídeo após o sítio de clivagem trombina protease destacado em cinza. (Fonte: NAGAMATSU et al., 2020).

De acordo com a análise de SDS-PAGE, após a indução com IPTG da expressão proteica das células bacterianas contendo a construção acima, foi observado um aumento da expressão da proteína recombinante na forma solúvel com aproximadamente 22 kDa na temperatura testada de 15°C (Fig. 6a, linha 4). Em contrapartida, nas induções dos controles positivo e negativo de extrato de *E. coli*, não foram encontradas proteínas com este peso molecular. (Fig. 6a, linha 1 e 2c, linha 1). Assim, foram realizadas as etapas cromatográficas de afinidade e de troca iônica com o extrato solúvel.

O ensaio de Western blot (Fig. 6c) mostrou a presença das proteínas com peso molecular de aproximadamente 23, 45 e 100 kDa. Nenhuma reatividade foi encontrada no extrato celular antes da indução (Fig. 6c, linha 1). As frações de eluições contendo proteínas de peso molecular diferentes foram digeridas pela protease trombina, o que revelou a presença de apenas duas proteínas com peso molecular entre 10 e 14 kDa (Fig. 6d, linha 2).

Após a clivagem das proteínas, foi observado a presença do domínio Trx clivado contendo a His-tag na fração de eluição após a cromatografia de afinidade (Fig. 6d, linha 4 e 6e, linha 3), enquanto a MT foi recuperada da fração não ligada conforme mostrado na fig. 6d (linha 3), 6e (linha 2) e 6f (linha 3). A ausência de proteína na linha 3 (Fig. 6d) é explicada pela alta diluição da proteína em tampão de ligação, enquanto a ausência de reação da mesma fração no Western blot é devido à remoção da His₆ • Tag® durante a clivagem. A presença da proteína nesta fração é confirmada pela reação com o antissoro (Fig. 6f, linha 3). Surpreendentemente, a presença de oligômeros não foi observada após o ensaio de clivagem ou na análise por SDS-PAGE das frações de eluição da cromatografia de afinidade (Fig. 6d, linhas 2, 4 e 6e, linhas 3 e 4).

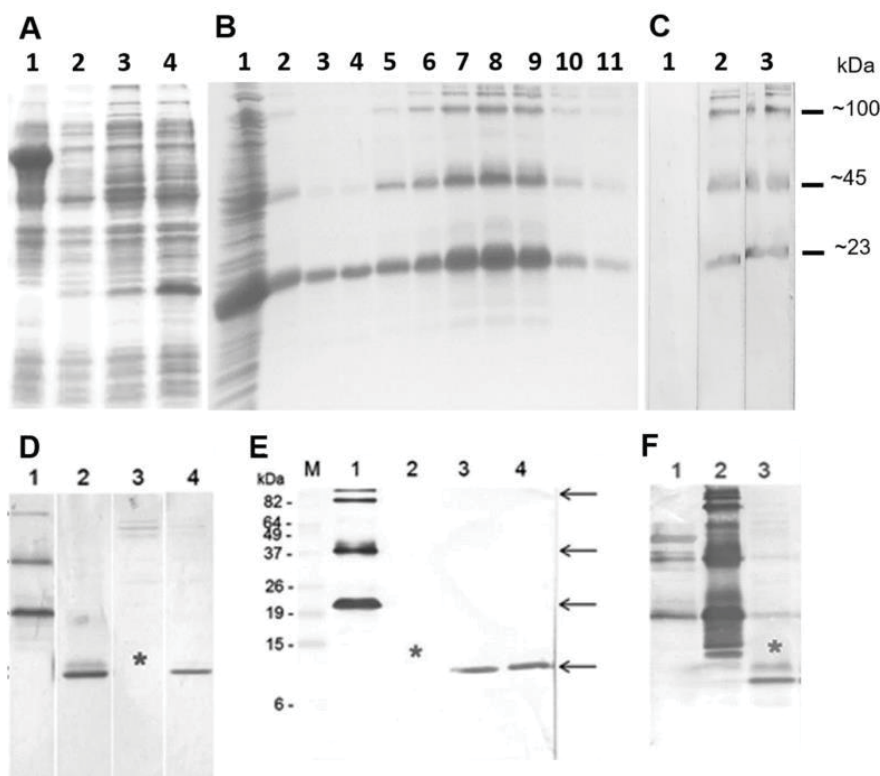


FIGURA 6 - Análise da metalotioneína recombinante de *E. coli*, expressão e purificação. A) Teste de temperatura de indução por análise de SDS-PAGE: indução do controle positivo (proteína GFP) (1); Extrato solúvel da indução a 37°C (2); Extrato solúvel de indução a 25°C (3); Extrato solúvel de indução a 15°C (4). B) Análise de SDS-PAGE. Observe o perfil da MT recombinante ao longo dos diferentes segmentos da cromatografia de troca iônica: fração solúvel do lisado de *E. coli* após a indução a 15°C (1); fração da metalotioneína recombinante após a cromatografia de afinidade (2); fração das proteínas não ligadas da cromatografia de troca iônica (3-5); frações do gradiente de eluição de cromatografia de troca iônica (6-11); C) Análise de Western blot da expressão da MT recombinante pelo anticorpo anti-His₆ • Tag: Controle negativo (extrato solúvel não induzido de *E. coli*) (1); pool das frações não ligadas da cromatografia de troca iônica (2); pool das frações de eluição da cromatografia de troca iônica (3). D) Análise de SDS PAGE do ensaio da clivagem da Metalotioneína / Tiorredoxina pela protease trombina: Fração da MT recombinante antes do ensaio (1); MT recombinante após o ensaio de clivagem (2); Fração não ligada à coluna da etapa de cromatografia de afinidade após o ensaio (3); Fração de eluição da cromatografia de afinidade após o ensaio de clivagem (4). E) Análise de Western Blot das frações do ensaio de clivagem por anti- His₆ • Tag: Fração da MT recombinante antes do ensaio (1); Fração não ligada de etapa de cromatografiade afinidade após o ensaio (2); Fração de eluição da cromatografia de afinidade após o ensaio de clivagem (3); MT recombinante após o ensaio de clivagem (4). F) Análise de Western blot das fraçõesdo ensaio da clivagem por antissoro MT recombinante: MT comercial (1); fração da MT recombinante antes do ensaio de clivagem (2); Fração não ligada da cromatografia de afinidade após a clivagem (3). M) Marcador de proteína pré-corado (Benchmark - Invitrogen). Asteriscos indicam a presença / ausência de proteínas de interesse nas frações (Fonte: NAGAMATSU et al., 2020).

5.2 Validação dos anticorpos policlonais

Antissoro

Como esperado, o antissoro obtido dos coelhos imunizados com a fusão MT-Trx purificada mostrou uma forte reatividade contra esta proteína através do Western blot e ensaio ELISA (Fig. 7a e 8a). Nenhuma reatividade do soro pré-imune foi observada na diluição usada (Fig. 7a, linha 2 e 4).

No ensaio de Western blot para a detecção da MT hepática de *O. niloticus* e da MT comercial, as diluições do antissoro mostraram um perfil diferencial para o reconhecimento de proteínas de baixo e de alto peso molecular. De acordo com a Fig. 7b, a proteína de peso molecular, com aproximadamente 14 kDa, e a MT de ~30kDa, foram detectadas até a diluição de 1:500 de antissoro na amostra de peixe exposto e não detectadas na amostra controle. Diluições acima deste valor não apresentaram as mesmas reatividades com as amostras analisadas (Fig. 7b). No entanto, foi detectada reatividade com padrões semelhantes em outras proteínas de peso molecular acima de 14 kDa e nas amostras controle. O antissoro não processado detectou a proteína de 14 kDa em peixes expostos ou nativos e nenhuma reação foi observada em peixes do grupo controle (Fig. 7c). Dessa forma, a proteína com 14 kDa foi considerada a mais adequada para examinar o padrão de reatividade do anticorpo purificado através do Western blot.

No ensaio ELISA, a diluição ideal do antissoro para a detecção da MT-Trx foi de 1:500 e a diluição do anticorpo conjugado com a enzima peroxidase (anti-IgG-HRP) foi de 1:3000 (Fig. 8a). Em contrapartida, nesta condição os valores obtidos de absorbância no extrato de fígado de peixe foram menores do que aqueles encontrados no controle negativo (dados não mostrados). Diferenças estatísticas do valor da absorbância entre o grupo controle e o grupo exposto foram encontradas na diluição de 1: 500 (Fig. 8b), corroborando os resultados obtidos pelo ensaio de Western blot (Fig. 7b e 7c).

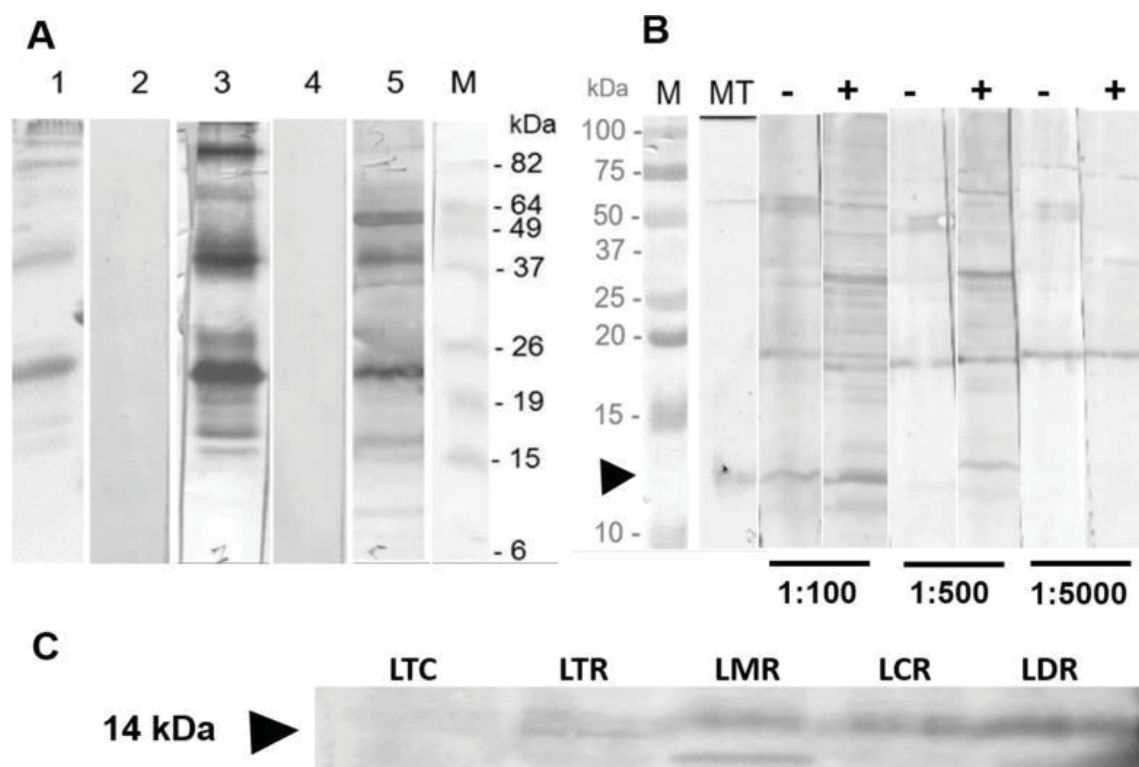


FIGURA 7 - Análise da reatividade do antissoro com a MT recombinante pelo ensaio de Western Blot. A) Ensaio com proteínas purificadas adsorvidas em membrana de PVDF: SDS-PAGE da eluição por cromatografia de afinidade utilizada para imunização de coelhos (1); reação do soro pré-imune com a MT recombinante (2); reação do soro pós-imune com a MT recombinante (3); reação do soro pré-imune com a MT comercial (4); reação do soro pós-imune com a MT comercial (5). B) Ensaio com extrato de fígado de *O. niloticus* adsorvido em membrana de PVDF: MT comercial corada com coomassie R-250 para controle (MT); *O. niloticus* controle (não exposto) (-); *O. niloticus* exposto à água do Reservatório Iguaçu (+) reagiu com diferentes diluições do antissoro. M) Marcador molecular pré-corado (Benchmark – Invitrogen). C) Ensaio com os extratos de fígados de peixes do Reservatório Iguaçu adsorvidos em membrana de PVDF: *O. niloticus* controle (LTC); *O. niloticus* exposto à água do Reservatório de Salto Segredo (Rio Iguaçu) (LTR); *Pimelodus maculatus* (LMR); *Prochilodus lineatus* (LCR). *Salminus brasiliensis* (LDR). 14 kDa significa peso molecular das proteínas detectadas (Fonte: NAGAMATSU et al., 2020).

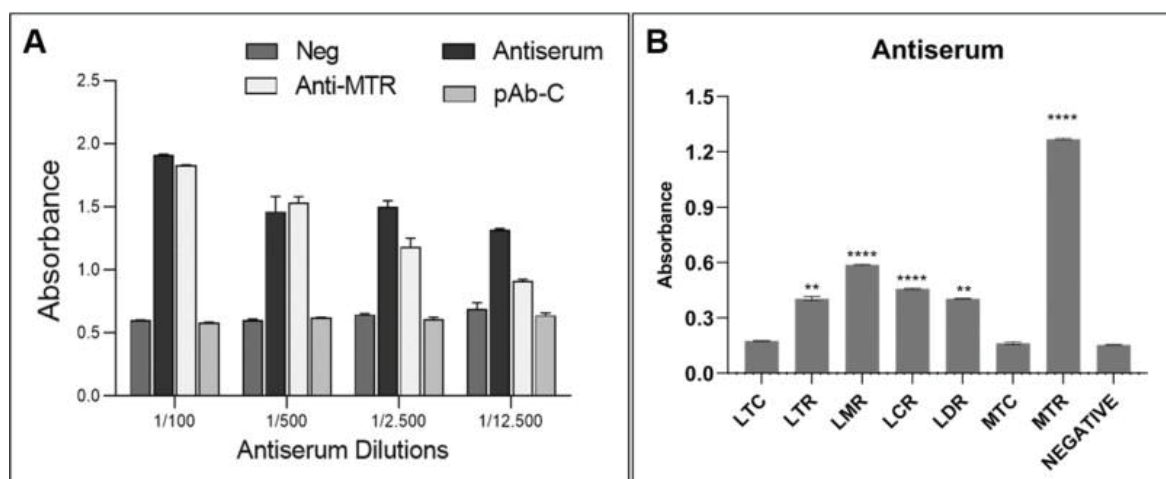


FIGURA 8 - Análise da reatividade do antissoro com a MT recombinante pelo ensaio ELISA. A) Ensaio com diferentes diluições do antissoro utilizado na detecção da MT recombinante pelo ensaio ELISA sanduíche: controle negativo do ensaio (anticorpo policlonal anti-FLAG • Tag (Neg)); antissoro não processado anti-MT recombinante proveniente dos coelhos (Antiserum); anticorpos imunopurificados anti-MT recombinante (Anti-MT-Trx); anticorpo policlonal comercial anti-MT de peixe (pAb-C). B) Ensaio com extrato de fígado adsorvido em microplaca de poliestireno: *O. niloticus* controle (não exposto) (LTC). *O. niloticus* exposto à água do Reservatório Iguaçu (LTR); Espécies de peixes do Reservatório Iguaçu: *Pimelodus maculatus* (LMR); *Prochilodus lineatus* (LCR). *Salminus brasiliensis* (LDR); MT comercial (MTC); MT recombinante purificada (MTR); albumina de soro bovino (Negative) (Fonte: NAGAMATSU et al., 2020).

Anticorpos purificados e comerciais

O acoplamento da fusão MT-Trx ou da MT comercial na superfície das microesferas magnéticas permitiu a purificação dos anticorpos policlonais do soro (Fig. 9a). Estes anticorpos apresentaram o mesmo padrão de reatividade encontrado no antissoro, para ambos os casos, em todas as amostras analisadas por Western Blot (Fig. 9b). Além disso, o anticorpo policlonal comercial e o anticorpo monoclonal mostraram o mesmo padrão de reatividade (Fig. 9c) nas mesmas amostras.

Estes mesmos anticorpos purificados também foram usados em ensaios e ELISA, e mostraram forte reatividade com a proteína fusão MT-Trx e um padrão similar para as amostras de fígado de peixe. Com base nisso, a concentração mais adequada para o anti-MT-Trx foi de 25 ng/poço para o revestimento da placa, e 0,4 µg / mL (1:500) para detecção da fusão MT-Trx ou 1 µg / mL para extrato de fígado

de peixe. Para ambos a diluição do anticorpo conjugado HRP foi de 1:3000 (Fig. 10a).

No ensaio ELISA, foram observadas diferenças nos valores de absorbância dos anticorpos entre o grupo controle e o grupo de peixes expostos (Fig. 10b e 10c), resultado semelhante ao observado com o anticorpo policlonal comercial (10d) e no Western blot. No entanto, o anticorpo purificado anti-MTC mostrou uma reatividade fraca em comparação com os outros anticorpos ou com o antissoro não processado. Como esperado, nenhuma reatividade foi observada nas amostras analisadas com o anticorpo monoclonal, com exceção da MT comercial (Fig. 10e). Esta descoberta indica o maior potencial do anticorpo recombinante anti-MT-Trx purificado na detecção da MT hepática de peixes.

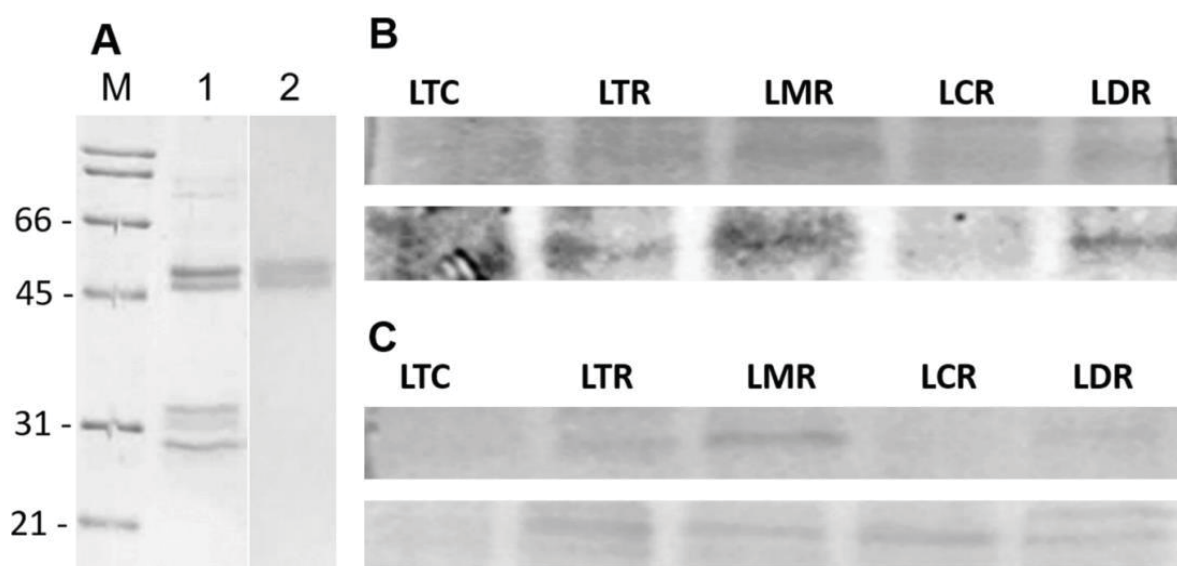


FIGURA 9 - Validação dos anticorpos purificados por ensaio de Western blot. A) SDS-PAGE do anticorpo purificado: detecção da cadeia leve do anticorpo com anticorpo secundário (1); Ensaio de Western blot da eluição da imunoafinidade da fração com a MT recombinante por AP de Coelho anti-IgG (2). B) Ensaio para detecção da MT hepática: por anticorpo anti-MTR purificado (primeira linha) ou anticorpo anti-MTC purificado (segunda linha). C) Ensaio para a MT hepática de peixes por: anticorpo comercial policlonal anti-MT de peixe (primeira linha) ou anticorpo monoclonal anti-MT de Coelho (segunda linha). A amostra é: *O. niloticus* controle (não exposto) (LTC); *O. niloticus* exposto no Reservatório do Iguaçu (LTR). Espécies nativas do Reservatório do Iguaçu: *Pimelodus maculatus* (LMR); *Prochilodus lineatus* (LCR); *Salminus brasiliensis* (LDR) (Fonte: NAGAMATSU et al., 2020).

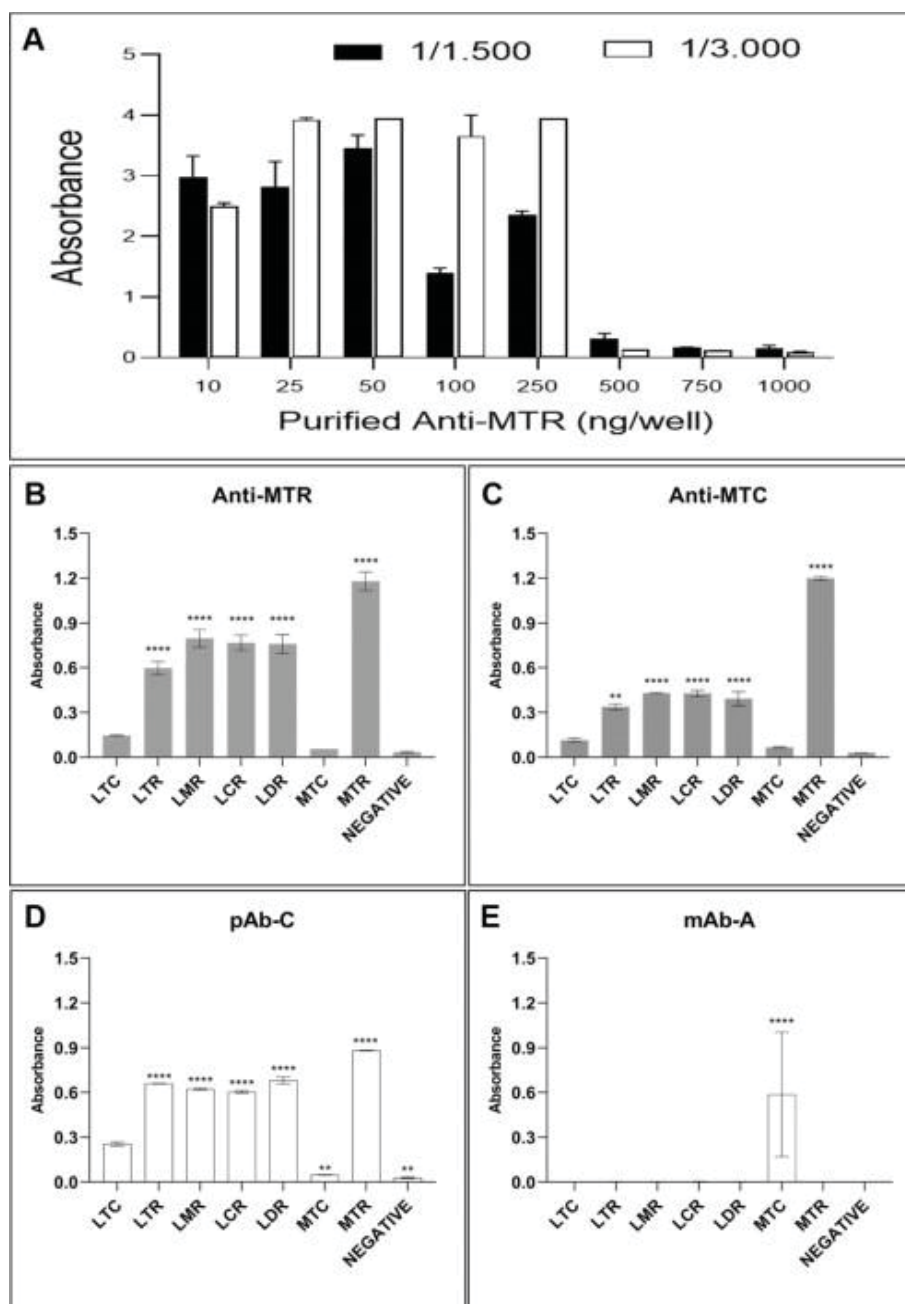


FIGURA 10 - Validação dos anticorpos purificados por ensaio ELISA. A) Ensaio de sensibilidade ao anticorpo anti-MTR para revestimento da microplaca de poliestireno. B) Reação entre anti-MTR e MT hepática de peixes. C) Reação entre o anticorpo anti-MTC e a MT hepática de peixes. D) Reação do anticorpo policlonal comercial anti-MT de peixe com a MT hepática de peixes. E) Reação entre o anticorpo monoclonal anti-MT de coelho e a MT hepática de peixes. A amostra é de: *O. niloticus* controle (não exposto) (LTC); *O. niloticus* exposto na água do Reservatório do Iguaçu (LTR); Espécies nativas do reservatório de Iguaçu: *Pimelodus maculatus* (LMR); *Prochilodus lineatus* (LCR); *Salminus brasiliensis* (LDR); MT comercial (MTC); MT recombinante purificada (MTR); albumina de soro bovino adsorvida (Negative); pAb-C (anticorpo policlonal de peixe - abcam) e mAb-A (anticorpo monoclonal contra a MT comercial) (Fonte: NAGAMATSU et al., 2020).

5.3 Imunodeteccção da MT endógena de *R. quelen*

Western blot

A expressão da proteína MT é detectada em resposta a muitos estressores ambientais. No presente estudo foi verificado que a MT de *R. quelen* foi imunodetectada em fígado de juvenis (Fig. 11a) e em larvas (pós-eclosão) (Fig. 11b), com base na reatividade de Western blot, após exposição hídrica a diferentes concentrações de cádmio. A imunodeteccção da MT recombinante mostrou que o mecanismo está presente mesmo no estágio inicial de desenvolvimento de *R. quelen*.

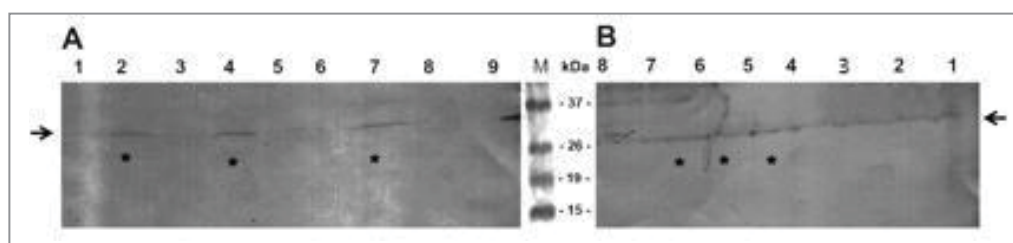


FIGURA 11 - Detecção da MT endógena por Western blot. A) Fração solúvel do extrato de fígado (0,1 g/mL) de *Rhamdia quelen* juvenil exposto a 10 µg/L (2, 5, 8) e 100 µg/L (1, 4, 7) de cloreto de cádmio por 5 dias. Amostras do grupo controle (3, 6). MT comercial isolada de fígado de coelho (9). B) Extrato de larvas de *R. quelen*: 18 hpf - controle (1), 0,1 µg/L (2), 1 µg/L (3), 10 µg/L (4) ; 28 hpf - controle (5), 0,1 µg/L (6), 1 µg/L (7), 10 µg/L (8). M) Marcador molecular (BenchMarker – Invitrogen) (Fonte: NAGAMATSU et al., 2020).

ELISA

Para a quantificação da MT nos extratos das larvas e dos fígados, foram realizados testes de ELISA. Com o objetivo de promover a ligação dos anticorpos às microplacas, para que estes pudessem capturar a MT do extrato das larvas e dos fígados para a detecção pelo antissoro e/ou anticorpos purificados, foi realizada uma tentativa de ELISA sanduíche de captura com a sensibilização das microplacas com o anticorpo purificado anti-MT-Trx. No entanto, foi constatado que o anticorpo secundário reconheceu o anticorpo de captura, o qual havia sido adsorvido no poço

da microplaca (dados não mostrados). Nos próximos experimentos serão testadas outras sensibilizações, descritas pela literatura (WINTHER & THORPE, 2013).

Assim, optou-se pelo segundo método de teste ELISA (Fig. 12). A absorbância mostrou que houve uma redução significativa da MT de larvas que foram expostas ao cádmio nas concentrações de 1 µg/L e 10 µg/L em 18 hpf, e em 10 µg/L em 28 hpf quando comparadas com a MT do controle (Fig. 12a). Ambas as concentrações de cádmio resultaram na redução da detecção da MT em relação ao grupo controle. Nos fígados dos espécimes juvenis não foram observadas variações significativas na concentração da MT entre o controle e os tratamentos de 10 µg/L e 100 µg/L (Fig. 12b). Como esperado, as concentrações da MT dos espécimes adultos de tilápia (TR) e de mandi (MR,) expostos cronicamente à água do Reservatório de Salto Segredo foram superiores à tilápia controle (TC) (Fig. 12c).

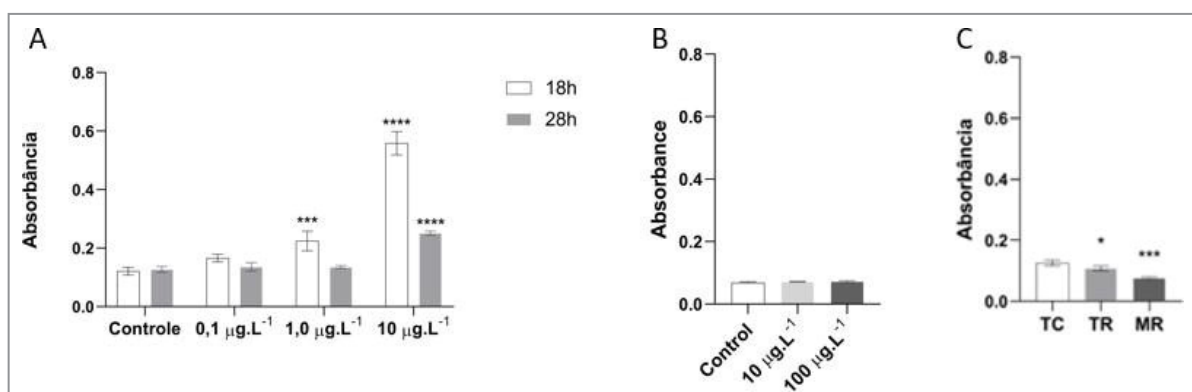


FIGURA 12 - Análise da MT endógena de *Rhamdia quelen* por ELISA colorimétrico no formato competitivo. A) Quantificação da MT endógena de tecidos de larvas de *R. quelen* em 18 horas após a fertilização e 28 horas após a fertilização expostas a diferentes concentrações de Cd (µg/L) (0,1 µg/L, 1 µg/L e 10 µg/L). B) Quantificação da MT endógena de fígado de juvenis de *R. quelen* a diferentes concentrações de Cd (µg/L) (10 µg/L e 100 µg/L). C) Quantificações dos controles positivos: fígado de tilápia adulta controle (TC); fígado de tilápia adulta do reservatório Iguaçu (TR) e fígado de mandi adulto do reservatório do Iguaçu (MR) (Fonte: NAGAMATSU et al., 2020).

5.4 Detecção de quebras simples de DNA de *R. quelen*

Não foi observado aumento significativo nas quebras simples de DNA nos diferentes tratamentos de Cd, em comparação com os grupos controles de larvas em 18 e 28 hpf (Fig. 13a). Já as respostas de genotoxicidade do fígado foram

significativamente maiores em espécimes juvenis expostas a 100 $\mu\text{g/L}$ ($P < 0,05$ ANOVA) (Fig. 13b). Estudos anteriores sugeriram que as quebras de DNA relacionadas a exposições por metais podem ser reparadas (GUSSO-CHOUERI, 2016). Porém, em uma alta concentração, o metal tóxico Cd parece inibir os mecanismos de reparo do DNA.

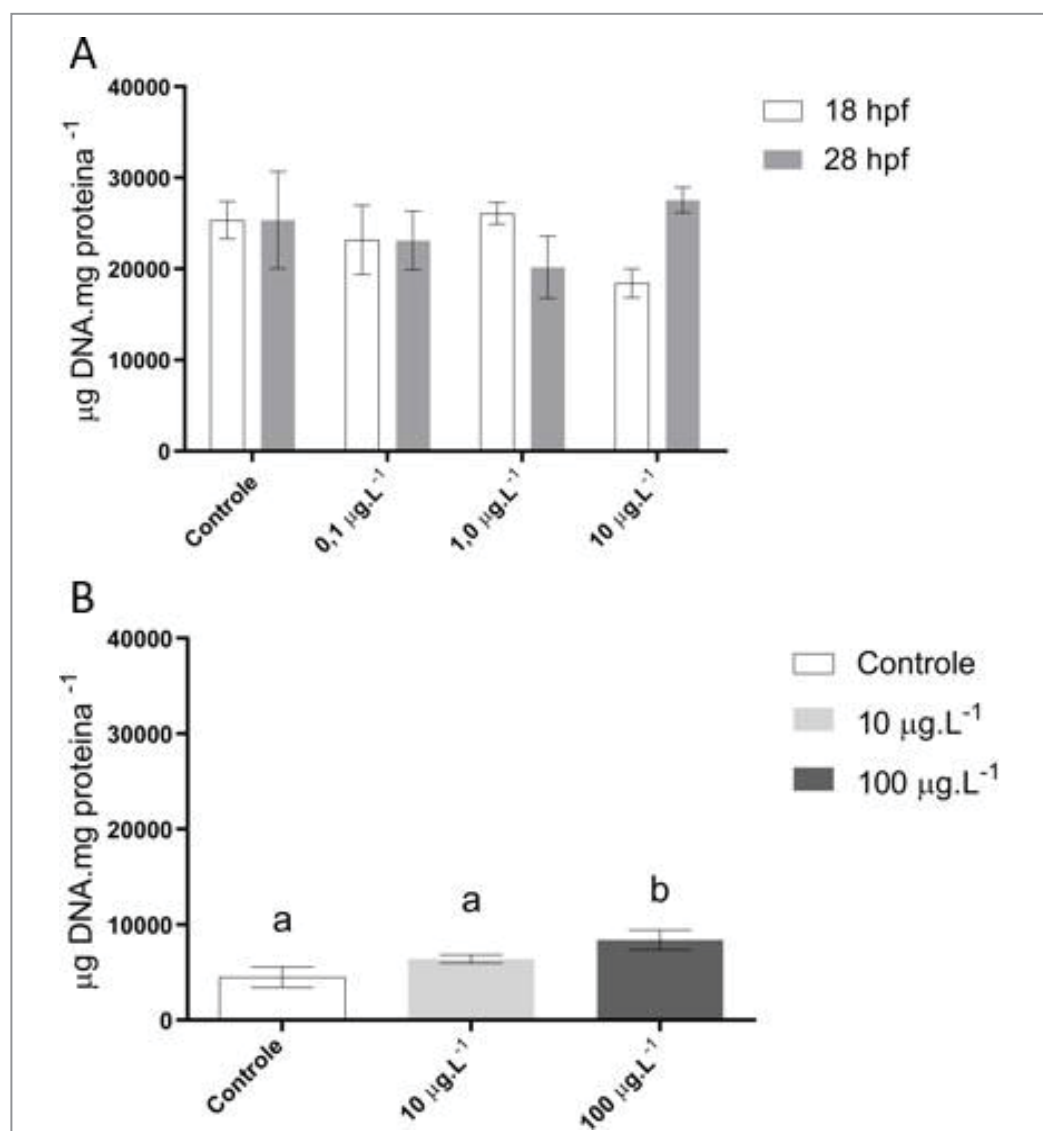


FIGURA 13 - Respostas de danos no DNA após exposição aguda de cádmio. A) Respostas do dano ao DNA de tecidos de larvas de *R. quelen* 18 horas após a fertilização e 28 horas após a fertilização expostas a diferentes concentrações de Cd ($\mu\text{g/L}$). (0,1 $\mu\text{g/L}$, 1 $\mu\text{g/L}$ e 10 $\mu\text{g/L}$). B) Respostas do dano ao DNA de fígado de juvenis *R. quelen* expostos a diferentes concentrações de Cd ($\mu\text{g/L}$) (10 $\mu\text{g/L}$ e 100 $\mu\text{g/L}$). O uso de letras diferentes acima dos dados indica diferenças significativas ($p = 0,05$).

6. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nesse estudo vão de encontro à expectativa da comunidade científica voltada para o biomonitoramento, cuja busca por novas metodologias fazem-se necessário. A MT isolada, através de imunoensaios, se mostrou muito efetiva como biomarcador das espécies testada, e pode ser aplicável na avaliação de metais tóxicos em ambientes aquáticos.

A detecção da MT, baseada em Western blot e imunoensaioenzimática (ELISA), mostrou ser uma ferramenta promissora para o diagnóstico a nível molecular da degradação hídrica, assegurada pela seletividade e especificidade encontradas nos anticorpos policlonais. Diante disso, nossos resultados abrem possibilidades para novos estudos de ecotoxicologia, fundamentais para subsidiar a regulamentação de poluentes, assim como estabelecer políticas ambientais e estratégias de conservação.

As padronizações dos imunoensaios demandaram grandes quantidades de anticorpos e, conseqüentemente, de antígenos. Para conseguirmos tais demandas e evitar inconsistências entre os diferentes lotes da proteína chave de interesse, escolhemos por explorar o sistema de produção de proteína heteróloga em bactérias, disponível comercialmente e com vastas informações na literatura referentes à otimização das condições experimentais.

Sabe-se que a bactéria gram negativa *Escherichia coli* continua sendo um sistema ideal por oferecer melhor relação custo-benefício devido ao seu rápido crescimento em meios de cultura baratos, disponibilidade de uma variedade de vetores, facilidade de manipulação, por não gerar heterogeneidade do alvo pela ausência de modificação pós-traducional e por fornecer alto rendimento proteico (BANEYX, 1999; VERGANI et al., 2005; ROSANO & CECCARELLI, 2014; JOSEPH et al., 2015). Este sistema é amplamente utilizado para a expressão de proteínas solúveis provenientes de diferentes organismos, incluindo proteínas terapêuticas humanas e de plantas (LAVALLIE et al. 1993; MECOY et al., 1997; SONG et al. 2011; KADO et al. 2016; MCNIFF et al. 2016; DUAN et al. 2019).

Com o objetivo de ampliar o potencial da expressão da MT como biomarcador de exposição a metais tóxicos, e desenvolver uma ferramenta de prospecção, a primeira etapa desse estudo foi a construção de um vetor para a expressão da proteína de tilápia (*Oreochromis aureus*) de forma recombinante.

As proteínas recombinantes, por não serem próprias do organismo hospedeiro, muitas vezes são rapidamente degradadas. Além disso, a geração eficiente de proteínas com alto conteúdo de grupos -SH em procarioto tem sido frequentemente limitada pela tendência de agregar e formar corpos de inclusão insolúveis no citoplasma (KILLE et al., 1990), o que pode dificultar os procedimentos para solubilização e recuperação destas proteínas. Assim, devido às características físico-químicas e ao baixo peso molecular da MT (VALIYARI et al. 2017), foi necessário o uso da fusão da tiorredoxina (Trx. • TagTM) com a junção gene MT- vetor, no sentido de contornarmos as possíveis instabilidades da proteína recombinante e favorecer os níveis máximos de solubilidade, atividade, dobramento adequado molécula, assim como já bem relatado na literatura (LAVALLIE et al., 1993; YANG et al., 2009; ZHENG & WANG, 2010).

A presença de uma banda de indução evidenciou uma proteína de fusão solúvel de 22 KDa, o que significou um delineamento experimental satisfatório tanto no processo de clonagem quanto na expressão. Após a confirmação da expressão, as bactérias foram lisadas, sonicadas e centrifugadas e a fração solúvel submetida à primeira etapa de purificação cromatográfica, a qual não atingiu um grau satisfatório de pureza, requerendo uma etapa adicional através da cromatografia de troca iônica.

A expressão de proteínas heterólogas clonadas em fusão com a cauda de histidina (His₆ • Tag) é comumente utilizada para fins de purificação, por isso foi incorporada ao gene que codifica a proteína de interesse, trazendo resultados positivos quanto ao alto grau de pureza (CORRÊA, 2004). O alto nível de expressão e da purificação da MT íntegra foi verificado pelo rendimento proteico de 30 mg, adequadas para as imunizações dos coelhos e para as padronizações dos imunoenaios.

A escolha da espécie *O. aureus* para a construção do vetor se baseou na quantidade de informações já disponíveis para essa espécie, tanto em literatura quanto no banco de dados (NCBI), de modo a possibilitar estudos futuros, e permitir a comparação dos dados gerados. O vetor comercial pET32a (+) foi construído de modo que a sequência da tiorredoxina inserida no inserto, fosse transcrita e traduzida em fusão com a MT alvo, atingindo peso molecular final de 23 KDa.

A construção do gene com o sítio de trombina permitiu a retirada da tiorredoxina com 12 KDa, e manteve a MT preservada com 10 KDa. Apenas a Trx foi detectada em SDS-PAGE com padrão de oligomerização ausente, indicando ser

uma característica das MTs. Como visto em outros estudos, geralmente a eletroforese da MT gera resultados pobres e inconclusivos.

A migração anômala da MT em SDS-PAGE tem sido relatada com muitas discrepâncias (BHOGAVALLI, 2007; ADAM et al., 2019). Apesar do tratamento com o detergente dodecilsulfato de sódio (SDS) e outros aditivos redutores resultarem em perda de metal, a MT tem a capacidade de reoxidar durante a corrida eletroforética, resultando na formação de oligômeros formados por pontes dissulfeto que não foram reduzidas apropriadamente devido à reatividade química dos grupos tióis dos resíduos de cisteínas. Fato este que resulta no padrão “escada” referente à oligomerização das moléculas, perfil ao qual também foi detectado em nossos resultados de SDS-PAGE e Western blot com a MT comercial, conforme resultados descritos na literatura (CHU et al. 2006; YUDKOVSKI et al. 2008; TENÓRIO- DAUSSAT et al. 2014, BHANDARI et al. 2017; ADAM et al. 2019). Este foi o primeiro resultado a confirmar que a MT recombinante produzida apresenta as mesmas características moleculares descritas anteriormente e, adicionalmente, o sucesso do sistema utilizado para expressão dessa proteína.

A construção da fusão também foi importante para a estabilidade *in vivo* e para a imunogenicidade da molécula. Os anticorpos policlonais gerados em coelhos contra a junção MT-Trx, imunopurificados pela fusão MT-Trx ou pela MT comercial adsorvidas na superfície das microesferas, não apresentaram diferença quanto ao padrão de reatividade com as amostras analisadas, incluindo uma alta similaridade com os anticorpos comerciais.

Estes resultados indicam que a fusão com a tiorredoxina não interfere no reconhecimento da MT endógena. Além disso, nos ensaios de Western blot, uma proteína de 14 kDa foi detectada pelos anticorpos policlonais no extratos de fígado de *O. niloticus* e das espécies nativas do Reservatório, corroborando o peso molecular correspondente da MT de peixes (HAMILTON & MEHRLE 1986; LACORNet al. 2000; GAO et al. 2009; HAUSER-DAVIS et al. 2014; TENÓRIO-DAUSSAT et al., 2014). Isso aumenta ainda mais o potencial de aplicação do anticorpo anti-MT- Trx como biomolécula promissora para imunoensaios com a ictiofauna.

Considerando a exposição e absorção de metais por organismos aquáticos, essa proteína torna-se um potente biomarcador para avaliar a biodisponibilidade de metais tóxicos em organismos aquáticos (VIARENGO et al., 1997; LIU et al., 2016; YANG et al., 2017). Assim, a indução da síntese da MT é uma das primeiras e mais

importantes respostas celulares para ser detectada a biodisponibilidade de metais tóxicos na água, uma vez que a sensibilidade de detecção desta proteína é eficiente mesmo em baixos níveis de exposição (DRIRA et al., 2017). Segundo Viarengo et al. (1997), o nível de biodisponibilidade de metais pode ser monitorado pela quantificação de MT endógena sintetizada, visto que sua expressão ocorre em peixes que se encontram em condições de estresse.

A MT endógena apresenta alto grau de homologia entre os animais e seu mecanismo de expressão é ativado pela presença de metais na célula (RYVOLOVA et al. 2011), conforme observado nos extratos de fígado. Níveis de Zn, Cu, Mn, Pb e Co foram detectados no fígado e em músculo de *O. niloticus*, mesmo quando as concentrações na água estavam abaixo dos limites estabelecidos pelo CONAMA/2005 (COIMBRA et al., 2013). Isso é possível, pois segundo os mesmos autores os metais tendem a se acumular nos tecidos em concentrações até 20.000 vezes maiores do que as das águas circundantes.

O fígado é descrito como um órgão eficiente para o metabolismo e detoxificação de xenobióticos, incluindo a imobilização de metais tóxicos (BOELSTERLI, 2007). De acordo com Yap et al. (2015), o tecido hepático é alvo dos metais devido ao alto metabolismo e à capacidade dos metais de se ligarem às proteínas, em ambos os casos levando a efeitos celulares ou induzindo mecanismos de detoxificação pela expressão de MT. Assim, neste trabalho, foi abordada a capacidade dos anticorpos policlonais gerados contra uma proteína recombinante em detectar sua molécula endógena correspondente em extratos de fígado de diferentes espécies residentes do Rio Iguaçu.

O Rio Iguaçu é o principal rio gerador de energia do estado do Paraná e é considerado o segundo rio mais poluído do Brasil, contendo altos níveis de metais tóxicos (YAMAMOTO et al. 2018). Espécies de tilápias (*O. aureus* e *O. niloticus*), são consideradas modelos de organismos sentinelas para exposição de metais (YAMAMOTO et al., 2017), além de possuírem sequências gênicas disponíveis no Genbank (TENÓRIO-DAUSSAT et al. 2014). Apesar de ser uma espécie exótica, a tilápia encontra-se amplamente distribuída em reservatórios no Brasil, como no Reservatório de Segredo, um dos cinco reservatórios do trecho do Rio Iguaçu, localizado a 285 km de Curitiba e administrado pela Companhia Paranaense de Energia (COPEL) desde 1992. Porém, estes recursos hídricos estão sob forte influência de vários fatores antrópicos, principalmente provenientes da região

metropolitana de Curitiba (RMC), o que representa risco de exposição a misturas químicas pelos humanos e organismos aquáticos da região.

Embora a expressão da MT desempenhe um papel importante na imobilização e detoxificação de metais tóxicos, sabe-se que os níveis da proteína e a biodisponibilidade de metais em peixes podem ser influenciados por fatores como idade, estação do ano, sexo e categoria taxonômica (LACORN et al. 2000; GAO et al. 2009). Desse modo, em uma mesma situação de exposição, diferentes espécies de peixes podem apresentar diferentes respostas (LEWIS et al., 2011).

O uso da expressão da MT como biomarcador da biodisponibilidade de metais tóxicos na ictiofauna deve ser realizado com muita cautela. Portanto, neste estudo, foram consideradas análises em mais de uma espécie de peixe pertencentes a níveis tróficos distintos. De acordo com Duarte-Gutiérrez e colaboradores (2019), são necessários vários ajustes no caso da MT endógena por ser altamente instável em solução e apresentar baixo peso molecular. Os autores indicam o tratamento com altas concentrações de DTT (100-300 mM) para garantir que a proteína permaneça completamente reduzida.

Além disso, existem discrepâncias que acabam gerando resultados não conclusivos no SDS-PAGE, Western blot e ELISA, que, embora sejam ensaios simples e práticos, requerem esforços para a padronização de detecção e aplicação de técnicas mais robustas, tais como cromatografia ou espectrometria de massas. Essas técnicas demandam maiores custos, tempo e mão de obra qualificada. Em vista disso, ainda são escassos materiais que sirvam de referência para isolar e quantificar a MT na literatura (MILNEROWICZ & BIZOÑ, 2010).

Os ensaios de Western blot e de ELISA indicaram que houve maior indução da MT hepática nos espécimes residentes do Reservatório de Salto Segredo, sob exposição crônica, em comparação com o grupo controle de tilápias, apresentando o mesmo padrão de reatividade entre os anticorpos produzidos e os anticorpos comerciais. Esses achados são de grande importância, pois revelaram que o anticorpo gerado contra a proteína recombinante (MT-Trx) apresenta o mesmo padrão de detecção do anti-MT comercial para a MT endógena, após exposição crônica a um ambiente impactado por metais tóxicos.

Além disso, de acordo com os resultados analisados, os anticorpos também foram capazes de detectar a MT endógena de três espécies diferentes de peixes nativos do território brasileiro, coletados no mesmo reservatório: *Pimelodus*

maculatus, *Prochilodus lineatus* e *Salminus Brasiliensis*. Estes resultados preliminares foram animadores, pois demonstraram o forte potencial da aplicabilidade de moléculas sintéticas na imunodeteção de biomarcadores em diagnósticos preditivos da qualidade da água, especialmente em situações de avaliações de risco.

O Brasil apresenta uma grande quantidade de ecossistemas aquáticos impactados por metais tóxicos, principalmente devido às atividades industriais e de mineração. Recentemente, dois acidentes de grandes proporções envolvendo metais em ambientes aquáticos de água doce e costeiros foram relatados nos estados de Minas Gerais e do Espírito Santo (ANM-BRASIL, 2019). Assim, os resultados deste estudo a partir de imunoensaios são biologicamente atraentes (JOUANNEAU et al., 2015) e geram grandes perspectivas na investigação da saúde da ictiofauna associado a outros múltiplos biomarcadores.

Futuramente, os anticorpos policlonais purificados também poderão ser utilizados pelo nosso laboratório para o desenvolvimento de outras ferramentas imunodiagnósticas de aplicação ambiental, como os imunossensores. Isso será possível, pois a intensidade de fluorescência resultante é diretamente proporcional à concentração da MT na amostra, o que tornará este método um indicador útil e promissor em análises de contaminação por metais na água (NAKAZATO et al. 2014; KIM & SON 2015; LEE et al. 2018). Thouand e Marks (2016) descreveram que esse tipo de abordagem pode avaliar o nível de toxicidade celular quando exposta a compostos tóxicos em tempo real, sem a necessidade de uma estrutura laboratorial complexa. Em geral, estas ferramentas, se bem padronizadas, podem diminuir os custos associados à coleta, isolamento, embalagem e transporte de amostras.

A MT é o mecanismo protetor reconhecido contra metais tóxicos em organismos adultos, mas há poucos estudos sobre sua expressão relacionada ao cádmio em embriões, larvas e na fase juvenil. Os resíduos de cisteína da MT são altamente conservados entre os teleósteos, sem alteração em nenhum dos 20 resíduos (LIU et al., 2017). Este aminoácido desempenha papéis essenciais relacionados à captura de metais na formação de estruturas secundárias e terciárias da proteína (SHENG et al., 2015). No entanto, a MT desempenha um papel distinto como reguladora dos níveis celulares de metais, incluindo a distribuição,

armazenamento, detoxificação e excreção (LA FONTAINE & MERCER, 2007; ABRIL et al., 2018) em diferentes órgãos e estádios do desenvolvimento.

Poucos estudos descrevem os efeitos de baixas concentrações de metais encontradas em ecossistemas aquáticos referentes aos mecanismos de detoxificação em estádios iniciais do ciclo de vida. Estas fases tendem a ser mais vulneráveis do que as fases tardias (juvenis e adultos) à exposição a contaminantes aquáticos, devido à alta taxa metabólica, relação área / volume superficial, estruturas pouco desenvolvidas e imaturas, além da mobilidade limitada na coluna de água (SARAF et al., 2018), o que impactaria negativamente as populações e a estrutura das comunidades a médio e longo prazo (BRITO et al., 2017). Além do mais, não se conhece nada a respeito da ativação do mecanismo celular da expressão da MT governado por múltiplos fatores toxicocinéticos e toxicodinâmicos em um cenário de exposição a metais tóxicos nas fases iniciais de diferentes espécies.

Os ovos fertilizados e indivíduos juvenis foram submetidos a exposições agudas de diferentes concentrações de cádmio (0,1 µg/L, 1 µg/L, 10 µg/L, 100 µg/L) e (10 µg/L, 100 µg/L), respectivamente. Os resultados da imunodeteção da MT demonstraram que a expressão da proteína é modulada pelo Cd em concentrações mais altas, aumentando a função da imobilização intracelular do metal.

De acordo com Cho et al. (2008) e Wang et al. (2014), o Cd é descrito como um dos indutores mais potentes da expressão da MT. A expressão do gene que codifica a MT é regulada pelo fator de transcrição reguladora de metal 1 (MTF-1). Sabe-se que este gene é responsivo aos metais que se ligam na região promotora e estimulam a expressão proteica (BALAMURUGAN & SCHAFFNER, 2006). Estudos anteriores indicam que a MT tem papel na indução de vitelogenina durante a vitelogênese bem como regula os níveis de metais essenciais (como Zn e Cu) durante a embriogênese em ovos de truta do lago (*Salvelinus namaycush*) (WERNER et al., 2003) e de zebrafish (*Danio rerio*) (RIGGIO et al., 2003).

Os resultados das exposições hídricas revelaram que todas as concentrações testadas de Cd levaram à expressão da MT em larvas de bagre da espécie *R. quelen*. Isso indica que as larvas podem ser sensibilizadas na presença deste metal em áreas poluídas. Esse achado pode representar uma etapa importante na investigação da sensibilidade dos primeiros estádios de vida frente à exposição a metais tóxicos. Além disso, foi observado uma redução na detecção da MT em larvas expostas ao Cd nas concentrações de 1 e 10 µg/L em 18 hpf, e nas

larvas de 28 hpf expostas à 10 µg/L. No entanto, estes resultados não foram acompanhados por danos no DNA. Nestes mesmos tratamentos não foram observados aumentos significativos em quebras no DNA quando comparados com o grupo controle.

Assim, os dados sugerem que as maiores concentrações podem ter inibido alguma via da síntese da MT, o que implicaria em quelar menos átomos livres, e promover menor tolerância à toxicidade do Cd. Esta regulação do gene da MT não está alinhada com os estudos prévios de Wu e Hwang (2003) e Liu et al. (2017). Esses autores demonstraram que a exposição a concentrações subletais de Cd leva a uma maior tolerância de embriões e larvas (pós-eclosão) ao metal devido à indução da transcrição gênica da MT.

Segundo Sonnack et al. (2018), os níveis de expressão de RNAm da MT de zebrafish também são significativamente induzidos pela exposição ao Cd, principalmente a partir de 48 hpf. Espinoza et al. 2010, relataram que a exposição à baixa concentração de cádmio (0,0037 mg/L) resulta em uma indução da expressão do RNAm da MT hepática de salmão coho. Além disso, Han et al. (2015) e Liu et al. (2017) observaram que a indução da transcrição do gene da MT pela exposição ao Cd é tempo-dose dependente em teleósteos, reafirmando o importante papel protetor da proteína no sequestro de metais.

Já níveis baixos de expressão da MT foram encontrados em tecidos embrionários de bagres africanos (*C. gariepinus*) expostos em concentrações superiores de chumbo (Pb) (500 µg/L), o que prejudicaria a estratégia de enfrentamento dos peixes contra a toxicidade de metais tóxicos a nível celular (OSMAN et al., 2019).

A toxicidade do Cd pode ser gerada pela capacidade de substituir metais como cálcio e zinco (Son et al., 2011), de modo que a perda desses metais essenciais pode afetar a função enzimática e gerar distúrbios metabólicos, inclusive na regulação do fator de transcrição 1 (MTF-1). De acordo com Grzywacz et al. (2015), distúrbios na regulação das vias de sinalização conectadas à função MTF-1 podem acarretar alterações adicionais no status intracelular do zinco e esse desequilíbrio crescente pode promover a fisiopatologia dos distúrbios degenerativos.

As respostas de genotoxicidade hepática foram significativamente maiores nas amostras juvenis expostas a maior concentração do Cd (100 µg/L), quando comparadas com o grupo controle e com o grupo exposto à menor concentração.

Além disso, não foi observada diferença significativa da indução da MT no mesmo tratamento como resposta após cinco dias de exposição hídrica ao metal tóxico. Notavelmente, esse resultado sugere que o fígado do estágio juvenil perde o mecanismo da MT. Neste caso, outros mecanismos devem atuar na proteção, sugerindo que, nesta fase do desenvolvimento, a MT hepática não seja um biomarcador eficiente.

De acordo com Shekh et al. (2019), ocorre um decréscimo significativo na expressão de transportadores de Cd no epitélio da pele, a medida em que os peixes crescem da fase larval para a fase juvenil. Este dado indica que, enquanto os peixes acumulam o Cd através do epitélio durante o estágio larval, este mecanismo de transporte começa a ficar menos proeminente no estágio juvenil, sendo substituído gradativamente pela captação do metal através das brânquias, processo que se intensifica gradualmente com o tamanho e a idade e pode contribuir para a acumulação do Cd em tecidos alvos.

A falha na expressão da MT, a qual poderia ser um importante mecanismo de imobilização dos metais tóxicos, acompanhada dos efeitos adversos encontrados no DNA, são corroborados por outros estudos direcionados ao papel da toxicidade de metais. As quebras no DNA podem ser produzidas diretamente pelo xenobiótico (ou do seu metabólito) ou em decorrência de danos estruturais (SHUGART et al., 1992).

Segundo Pavlaki et al. (2016), o aumento no dano ao material genético pode estar associado ao aumento das concentrações de Cd, mesmo quando não são observados efeitos significativos em testes de toxicidade aguda a nível de indivíduo. Estes eventos danosos que excedem a capacidade de reparação do DNA podem estar fortemente ligados à produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs) geradas pela toxicidade do Cd. Para se proteger dos danos oxidativos, o organismo dispõe de mecanismos de defesa antioxidante endógeno, destacando-se as enzimas catalase (CAT) (AEBI, 1984), glutathione S-transferase (GST) (KEEN et al., 1976) e a glutathione dissulfeto redutase (GR) (SIES et al., 1976) como inibidores preventivos contra os danos. No entanto, quando produzidos em grande quantidade, os EROS e ERNs exercem efeitos danosos sobre as macromoléculas através da oxidação do DNA, proteínas e lipídios.

Estudos recentes demonstraram que o Cd pode afetar o equilíbrio entre a geração de espécies reativas de oxigênio e o mecanismo antioxidante em diferentes

espécies de peixes (JIN et al., 2015; ZHU et al., 2017; McRAE et al., 2019). Folle et al. (2020) verificaram em larvas de *R. quelen* sob o efeito agudo de TBP (3,0 µg/L), a ativação do mecanismo antioxidante em 48 hpf e a diminuição das atividades da CAT e da GST a partir de 96 hpf, efeitos que são sugestivos de inibição da defesa antioxidante.

Estes dados sugerem que, a partir de 48 hpf, seja um período crítico em termos de sensibilidade para as larvas, embora este estágio não tenha sido avaliado no presente estudo. Assim, a correlação entre o estresse oxidativo e o mecanismo protetor de detoxificação da MT em diferentes etapas dos estádios iniciais necessitam ser mais bem investigados, uma vez que os desequilíbrios destes sistemas podem estar interferindo em muitos processos intracelulares e, conseqüentemente, contribuindo para a diminuição da taxa de sobrevivência. Além disso, sendo o Cd também um forte indutor da desnaturação de proteínas intracelulares (WAISBERG et al., 2003), são necessários mais estudos complementares que considerem outros tipos de interações biológicas.

Devido à vulnerabilidade do material genético, biomarcadores de genotoxicidade já foram padronizados em organismos aquáticos, para a avaliação do potencial genotóxico de diferentes agentes químicos. As respostas genotóxicas desencadeiam alterações biológicas, algumas das quais podem ser transmitidas para as gerações seguintes e resultar em perda da diversidade genética (BARŠIENĖ et al., 2013).

Dentre os indicadores de genotoxicidade, se destaca a detecção da quebra simples de DNA (Single Stand Break), uma ferramenta altamente sensível a nível molecular aplicável em ambientes aquáticos naturais. Segundo Gusso-Choueri et al. (2016), a genotoxicidade verificada em bagres (*Cathorops spixii*) de uma área marinha de proteção ambiental, estaria ligada aos níveis de metais bioacumulados em diferentes tecidos, provenientes de contaminações de fontes de antigas fontes de mineração. Assim, as análises de diferentes respostas de genotoxicidade aliadas ao desenvolvimento de novas ferramentas para o diagnóstico precoce de riscos ambientais devem ser prioridades. Com estas alternativas ainda sendo escassas no cenário brasileiro, a degradação ambiental está ocorrendo em um ritmo muito superior ao do desenvolvimento de soluções.

No presente estudo foi identificado um método eficiente, reprodutível, estável e de alto rendimento para a produção de anticorpos policlonais específicos para a

MT de peixes. Além disso, estes anticorpos (anti-MT-Trx) podem ser aplicados em investigações da biodisponibilidade e de possíveis efeitos celulares de metais tóxicos em diferentes espécies e estádios do desenvolvimento de peixes.

Devido à falta de metodologias padronizadas voltadas para o diagnóstico da poluição por metais em ecossistemas aquáticos, nossa proposta revela uma ferramenta promissora para imunodiagnósticos da contaminação dos recursos hídricos brasileiros, com novas e importantes aplicações em programas de biomonitoramento, fundamentais para subsidiar a regulamentação de metais na legislação. Os resultados observados nos estádios iniciais de desenvolvimento de *R. quelen* revelam que os estádios ontogênicos regulam o transporte de íons metálicos e estabelecem um mecanismo de detoxificação para minimizar os efeitos tóxicos do Cd (MOUCHET et al., 2006). Juntos, nossos dados evidenciam a importância do papel da expressão da metalotioneína como mecanismo protetor já fases iniciais de vida, e contribuem para elucidar o risco real da biota à exposição a metais tóxicos em ambientes impactados.

7. CONCLUSÃO

- A expressão heteróloga da metalotioneína de *O. aureus* e os seus respectivos anticorpos policlonais podem ser utilizadas como ferramenta adicional para a avaliação da poluição por diferentes metais tóxicos em ecossistemas aquáticos.
- A imunodeteção da MT mostrou-se promissora como um biomarcador para análises de diagnóstico ambiental em estudos de biomonitoramento.
- Este trabalho contribuiu para a imunodeteção da metalotioneína na espécie *Rhamdia quelen*, principalmente nos estádios iniciais de desenvolvimento.
- A imunodeteção da MT recombinante mostrou que a MT pode ser regulada pelo Cd no estágio inicial de desenvolvimento, mas não no fígado do estágio juvenil de *R. quelen*. Esses achados são importantes para entender a sensibilidade da fase larval (pós-eclosão) aos metais tóxicos.
- A exposição à concentração realista de Cd não leva a efeitos genotóxicos nos estádios iniciais do desenvolvimento de *R. quelen*, sugerindo que a expressão da MT pode funcionar como um mecanismo de proteção contra a exposição ao Cd.
- Por outro lado, a inibição da expressão de MT em alta concentração de Cd no estágio juvenil também está de acordo com o efeito dos danos no DNA observado também em indivíduos expostos a concentrações mais elevadas, apontando o estágio juvenil como mais afetado que as larvas pelo Cd, representando um risco à nível de população.
- O ensaio por ELISA deve elucidar em termos quantitativos a expressão da MT, mas é necessário a realização de adequações a esses métodos para complementar os resultados apresentados nesse estudo.

REFERÊNCIAS

- ABOAL, A. J. R., CARBALLEIRA, A., GIORDANO, S., ADAMO, P., FERNÁNDEZ, J. A. Moss bag biomonitoring: a methodological review. **Sci. total environ.** v. 432, p. 143–158, 2012.
- ABRIL, S. I. M., COSTA, P. G., BIANCHINI, A. metal accumulation and expression of genes encoding for metallothionein and copper transporters in a chronically exposed wild population of the fish *Hyphessobry conluetkenii*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part c: Toxicology & Pharmacology**. v. 211, p. 25–31. 2018.
- ADAM, V., KRIZKOVA, S., ZITKA, O., TRNKOVA, L., PETRLOVA, J., BEKLOVA, M., KIZEK, R. Determination of apo-metallothionein using adsorptive transfer stripping technique in connection with differential pulse voltammetry. **Electroanalysis**. 19 (2-3), p. 339–347, 2007.
- ADAM, M. A. et al. Detection of Metallothionein Protein Biomarkers (MTs) and Pinocytosis Activity in Gambusia Fish (*Gambusia affinis*) exposed to Cadmium. **Nat. Env. & Poll. Tech.** v. 18, p. 989–994, 2010.
- ADAM, M. A, MAFTUCH, KILAWATI, Y. RISJANI, Y. Detection of Metallothionein Protein Biomarkers (MTs) and Pinocytosis Activity in *Gambusia Fish (Gambusia affinis)* exposed to Cadmium. **Nat. Environ. Pollut. Technol.** 18(3): 989–994, 2019.
- ADRIANO, D. C. Trace elements in the terrestrial environment. New York: springer, 1986.
- AEBI, H. Catalase in vitro. In: **Methods in Enzymology**. v. 105, p. 121–126, 1984.
- AICH, A., CHATTOPADHYAY, B., MUKHOPADHYAY, S. K. Immunolocalization of metallothionein in hepatocytes of guppy fish (*Poecilia reticulata*) exposed to tannery effluent: a biomarker study. **Chemosphere**. v. 169, p.460–466, 2017.

AMIARD, J. C. et al. Metallothioneins in aquatic invertebrates: role in metal detoxification and their use as biomarkers. **Aquatic Toxicology**. v. 76, p. 160–202, 2006.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. <http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/home>. 20 out, 2013.

ARCHELA, E. et al. Considerações sobre as gerações de efluentes líquidos em centros urbanos. **Geografia**, v.12, n.1, 2003.

ARIAS, A. R. L., BUSS, D. F., ALBUQUERQUE, C., INÁCIO, A. F., FREIRE, M. M., EGLER, M., MUGNAI, R., BAPTISTA, D. F. utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. **Ciência & Saúde coletiva**, 12 (1): 61-72, 2007.

BALAMURUGAN, K., SCHAFFNER, W. Copper homeostasis in eukaryotes: teetering on a tightrope. **Biochemica et Biophysica Acta (bba) - Molecular Cell Research**. 1763 (7), p. 737–746, 2006.

BARBIERI E, PAES, E. T. The use of oxygen consumption and ammonium excretion to evaluate the toxicity of cadmium on *Farfantepenaeus paulensis* with respect to salinity. **Chemosphere**. v. 84: p. 9–16, 2011.

BARBOSA, J. S., CABRAL, T. M., FERREIRA, D. N., AGNEZ-LIMA, L. F., DE MEDEIROS, S. R. B. Genotoxicity assessment in aquatic environment impacted by the presence of heavy metals. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** v.73, p. 320–325, 2010.

BAUMAN, J. W., LIU, J., LIU, Y. P., KLAASSEN, C. D. Increase in metallothionein produced by chemicals that induce oxidative stress. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** v. 110, p. 347–354, 1991.

BAUMAN, J. W., MADHU, C., MCKIM JR., J. M., LIU, Y., KLAASSEN, C. D. Induction of hepatic metallothionein by paraquat. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** v. 117, p. 233–241, 1992.

BARŠIENĖ, J., RYBAKOVAS, A., LANG, T., ANDREIKĖNAITĖ, L., MICHAILOVAS, A. Environmental genotoxicity and cytotoxicity levels in fish from the North Sea offshore region and atlantic coastal waters. **Mar. Pollut. Bull.** 68, 106–116, 2013.

BEG, M. U. et al. Metallothionein, oxidative stress and trace metals in gills and liver of demersal and pelagic fish species from Kuwaits marine area. **Marine Pollution Bulletin**. v. 100, n. 2, p. 662–672, 2015.

BERNTSEN, M. H. G., ASPHOLM, O. Ø., HYLLAND, K., WENDELAAR BONGA, S. E., LUNDEBYE, A.- K. Tissue metallothionein, apoptosis and cell proliferation responses in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr fed elevated dietary cadmium. **Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.** v.128, p. 299–310, 2001.

BHANDARI, MELCHIORRE, C. DOSTIE, K. LAUKENS, D. DEVISSCHER, L. LOUWRIER, A. THEES, A. LYNES M, A. Detection and manipulation of the stress response protein metallothionein. **Curr. Protoc. Toxicol.** 1–28, 2017.

BIELMYER-FRASER, G. K., HARPER, B., PICARIELLO, C., ALBRITTON-FORD, A. The influence of salinity and water chemistry on acute toxicity of cadmium to two euryhaline fish species. **Comp. Biochem. Physiol. C.** v. 214, 23–27, 2018.

BIRD, D. J., ROTCHELL, J. M., HESP, S. A., NEWTON, L. C., HALL, N. G., POTTER, I. C. To what extent are hepatic concentrations of heavy metals in *Anguilla anguilla* at a site in a contaminated estuary related to body size and age and reflected in the metallothionein concentrations? **Environmental Pollution**. 151 (3), 641–651, 2008.

BOWEN, A., CASADEVALL, A. Chapter 6 - The role of the constant region in antibody antigen interactions: redefining the modular model of immunoglobulin structure. Academic–press. p. 145–170, ISBN 9780128033692, 2018.

BREMNER, I., MEHRA, R. K., SATO, M. Metallothionein in blood, bile and urine. In: KOJIMA, Y. KAGI, editors. Metallothionein ii. Basel: Birkhauser Verlag. p. 507–17, 1987.

BRITO, I. A., LÓPEZ-BARRERA, A. L., LINO ARAÚJO, S. B., OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. Modeling the exposure risk of the silver catfish *Rhamdia quelen* (Teleostei, Heptapteridae) to wastewater. *Ecol. Model.* 347, 40–49, 2017.

BULAT, Z., ĐUKIĆ-ĆOSIĆ, D., ANTONIJEVIĆ, B., BUHA, A., BULAT, P., PAVLOVIĆ, Z., MATOVIĆ, V. Can zinc supplementation ameliorate cadmium- induced alterations in the bioelement content in rabbits? **Arh. Hig. Rada. Toksikol.** 68 (1): p.38–44, 2017.

CAI, L., SATOH, M., TOHYAMA, C., CHERIAN, M. G. Metallothionein in radiation exposure: its induction and protective role. **Toxicology.** v. 132, p. 85–98, 1999.

CAO, L., HUANG, W., LIU, J., YIN, X., DOU, S. Accumulation and oxidative stress biomarkers in Japanese flounder larvae and juveniles under chronic cadmium exposure. **Comp. Biochem. Physiol. Part C. Toxicol. Pharmacol.** v. 151, p. 386–392, 2010.

CAO, L., HUANG, W., SHAN, X., Ye, Z., DOU, S. Tissue-specific accumulation of cadmium and its effects on antioxidative responses in Japanese flounder juveniles. **Environ. Toxicol. Pharmacol.** v. 33, p. 16–25, 2012.

CAJARAVILLE, M. P., BEBIANNO, M. J., BLASCO, J., PORTE, C., SARASQUETE, S.E., VIARENGO, A. The use of biomarkers to asses the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. **Sci. TotalEnviron.** v. 247, p. 295–311, 2000.

CAPDEVILA, M., GONZALEZ-BELLAVISTA, A., MUNOZ, M., ATRIAN, S., FABREGAS, E. The first isoform-selective protein biosensor: a metallothionein potentiometric electrode. **Chem. Commun.** 46 (12), 2040–2042, 2010.

CAPDEVILA, M. et al. State-of-the-art of metallothioneins at the beginning of the 21st century. **Coordination Chemistry Reviews.** v.256, p. 46–62, 2012.

CARUSO, C. S. Clonagem, expressão e caracterização de proteínas recombinantes de *Xylella fastidiosa*. Tese (Doutorado) – Instituto de Química de São Carlos, São Carlos, 2007.

CHATTERJEE, S. et al. Metal accumulation and metallothionein induction in *Oreochromis niloticus* grown in wastewater fed fishponds. **Ecological Engineering**. v. 90, p. 405–416, 2016.

CHEN, B. et al. In search of key: Protecting human health and the ecosystem from water pollution in China. **Journal of Cleaner Production**, 2019.

CHO, Y. S., LEE, S. Y., KIM, K. Y., BANG, I. C., KIM, D. S., NAM, Y.K. Gene structure and expression of metallothionein during metal exposures in *Hemibarbus mylodon*. **Ecotoxicol Environ Saf.** v.71, p.125–37, 2008.

CHU, M. Development of ELISA for metallothionein-II allows determination of heavy metal pollution of fresh water. **Frontiers in Bioscience**. 11 (1), 2113, 2006.

CHUA, E. M. et al. Potential for biomonitoring metals and metalloids using fish condition and tissue analysis in na agricultural and coal mining region. **Chemosphere**. v. 202, p. 598–608, 2018.

COIMBRA, R. S. C., SANTOS, C. R., SARAIVA, V. B., OLIVEIRA, M. M. Biomarkers as tools in quality assessment of fish contaminated with trace metals. **Boletim do Observatório Ambiental Alberto Ribeiro Lamego**, Campos dos Goytacazes/RJ, v. 7.1, 153–172, 2013.

COIMBRA, T. M. G. Análise da expressão da metalotioneína em duas espécies de peixes, *Oreochromis niloticus* e *Prochilodus lineatus*. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2008.

CONAMA: Conselho Nacional do Meio Ambiente/Ministério do Meio Ambiente. Resolução No. 357 de 17 de março de 2005 [www Document]. (Accessed 11.08.19).

CORRÊA, E. M. Expressão heteróloga, purificação e caracterização das proteínas humanas DCRA (Down Syndrome Critical Region Gene A) e DSCR8 (Down Syndrome Critical Gene 8). Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2004.

CROIZIER, G. L. et al. Significance of metallothioneins in differential cadmium accumulation kinetics between two marine fish species, **Environmental Pollution**. v 236, p. 462–476, 2018.

CUNHA, D. G. F. et al. Resolução CONAMA 357/2005: análise espacial e temporal de não conformidades em rios e reservatórios do estado de São Paulo de acordo com seus enquadramentos (2005-2009). **Eng. Sanit. Ambient.** v. 18, p. 159–168, 2013.

DALZUCHIO, T. et al. Water quality parameters, biomarkers and metal bioaccumulation in native fish captured in the Ilha River, southern Brazil. **Chemosphere**. v. 189, p. 609–618, 2017.

DAMATO, M., BARBIERI, E. Study on the acute toxicity and metabolic changes caused by cadmium exposure on the fish *Hyphessobrycon Callistus* used as an indicator of environmental health. **O Mundo da Saúde**. São Paulo. 36 (4): p. 574– 581, 2012.

DELLAMATRICE, M. P., MONTEIRO, R. T. R. Principais aspectos da poluição de rios brasileiros por pesticidas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. v.18, n.12, p.1296–1301, 2014.

DEMIRA, V., ERGIN, S., ÇAKIR, Y., ÇELİK, F. Determination and Health Risk Assessment of Heavy Metals. **Water Resour.** p. 508–516, 2015.

DUARTE-GUTIÉRREZ, J., LEYVA-CARRILLO, L., MARTÍNEZ-TÉLLEZ, M. A., MÉNDEZ-ESTRADA, R. O., FÉLIX-PORTILLO, M., YEPIZ-PLASCENCIA, G. Cloning, expression, purification and biochemical characterization of recombinant metallothionein from the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Protein Expression**

and Purification. 105511, 2019.

DUFFUS, J.H. Heavy metals - A meaningless term? **Pure and Applied Chemistry.** v. 74, n. 5, p. 793–807, 2002.

ĐUKIĆ-ĆOSIĆ, D., BARALIĆ, K., JAVORAC, D., ĐORĐEVIĆ, A. B., BULAT, Z. An overview of molecular mechanisms in cadmium toxicity. **Current Opinion in Toxicology**, 2019.

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

DZIUBANEK, G., PIEKUT, A., RUSIN, M., BARANOWSKA, R., HAJOK, I. Contamination of food crops grown on soils with elevated heavy metals content. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** v. 118, p. 183–189, 2015.

ENSAFI, A. A., KHAYAMIAN, T., BENVIDI, A., MIRMOMTAZ, E. Simultaneous determination of copper, lead and cadmium by cathodic adsorptive stripping voltammetry using artificial neural network. **Anal. Chem. Acta.** v. 561, p. 225–232, 2006.

EL-KADY, M. A. Abdel-Wahhab Occurrence of trace metals in foodstuffs and their health impact, Trends Food. **Sci. Technol.** v.75, p. 36–45, 2018.

EPA. Aquatic life ambient water quality criteria cadmium. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water, Office of Science and Technology. EPA 820-R-16-002, 2016.

FABRIN, T. M. C., DIAMANTE, N. A., MOTA, T. F. M., GHISI, N. DE C., PRIOLI, S. M. A. P., PRIOLI, A. J. Performance of biomarkers metallothionein and ethoxyresorufin O -deethylase in aquatic environments: A meta-analytic approach. **Chemosphere.** v. 205, p. 339–349, 2018.

FAO. Coping with Water Scarcity: Challenge of the Twenty-First century. UM Water, 2007.

FESTA, R. A., THIELE, D. Copper: an essential metal in biology. **Curr. Biol.** 21 (21) R877–83., 2011.

FILIPPELI G, M. The global phosphorus cycle: past, present, and future. *Elements* 4: p. 89–95, 2008.

FOLLE, N. M. T. Efeito tóxico e papel desregulador endócrino estrogênio do 2, 4, 6 - tribromofenol (TBF) em peixes teleósteos. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2018.

FOLLE, N. M. T., AZEVEDO-LINHARES, M., GARCIA, J. R. E., SOUZA, A. T. da C., GRÖTZNER, S. R., OLIVEIRA, E. C. de, ... Oliveira Ribeiro, C. A. de. (2020). Low concentration of 2,4,6-tribromophenol (TBP) represents a risk to South American silver catfish *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard, 1824) population. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 187, 2019.

GAO, D. et al. Metallothionein-2 gene from mandarin fish *Siniperca chuatsi*: cDNA cloning, tissue expression, and immunohistochemical localization. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**. v. 149, p. 18–25, 2009.

GALVEZ, F., WONG, D., WOOD, C. M. Cadmium and calcium uptake in isolated mitochondria-rich cell populations from the gills of the freshwater rainbow trout. **Am. J. Physiol.- Regul. Integr. Comp. Physiol.** v. 291, p. 170–176, 2006.

GAGNE', F., BLAISE, C. Hepatic metallothionein level and mixed function oxidase activity in fingerling rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after acute exposure to pulp and paper mill effluents. **Wat. Res.** 27, 1669–1682, 1993.

GIL, E. S. et al. Alguns aspectos de imunoensaios aplicados à química analítica. **Química nova**. 22 (6), 1999.

GERBRON, M., GERAUDIE, P., XUERE, B., MARIE, S., MINIER, C. In vitro and in vivo studies of the endocrine disrupting potency of cadmium in roach (*Rutilus rutilus*) liver. **Mar. Pollut. Bull.** v. 95, p. 582–589, 2015.

GHIRALDELLI, L. Desenvolvimento gonadal do jundiá, *Rhamdia quelen* (Teleostei, Siluriformes), em viveiros de terra, na região sul do Brasil. **Acta Sci. Biol. Sci. Maringá.** v. 29, n. 4, p. 349–356, 2007.

GONÇALVES, M. F. Variação temporal e espacial da presença dos metais pesados Cd, Cr, Ni, Pb, Zn na Bacia do Rio Birigui e identificação de suas fontes potenciais. Dissertação (mestrado), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

GONÇALVES, L. B., SEBASTIEN, N. Y. Feeding activity and influence of intraspecific competition on zooplankton communities by jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy and Gaimard, 1824) in laboratory. **Braz. J. Biol.** vol. 73 n°. 4. São Carlos Nov. 2013.

GRAEFF, A., SEGALIN, C. A., PRUNER, E. N., AMARAL Jr., H. Produção de alevinos de jundiá (*Rhamdia quelen*). Florianópolis: Epagri, p. 34 (Epagri. Boletim Técnico, 140), 2008.

GRUBER N, GALLOWAY J. N. An Earth-system perspective of the global nitrogen cycle. **Nature.** 451: p. 293–96, 2008.

GUSSO-CHOUERI, P. K., CHOUERI, R. B., SANTOS, G. S., de ARAÚJO, G. S., CRUZ, A. C. F., STREME, T., CAMPOS, S. X., CESTARI, M. M., RIBEIRO, C. A. O., ABESSA, D. M. S. Assessing genotoxic effects in fish from a marine protected area influenced by former mining activities and other stressors. **Marine Pollution Bulletin.** 104 (1-2), 229–239, 2016.

HAMER, D.H. Metallothionein. **Annu. Rev. Biochem.** v. 55, p. 913–51, 1986.

HAMER, D. H. Metallothionein - an overview. **Mar. Environ. Res.** 24 (1–4), p. 171–171, 1988.

HAN, Y. L., SHENG, Z., LIU, G. D., LONG, L. L., WANG, Y. F., YANG, W. X, ZHU, J. Q. Cloning, characterization and cadmium inducibility of metallothionein in the tests of the mudskipper *Boleophthalmus pectinirostris*. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** v.119, p.1–8, 2015.

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

HAUSER-DAVIS, R. A. et al. Behaviour of the oxidant scavenger metallothionein in hipoxia-induced neotropical fish. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 103, p. 24–28, 2014.

HAYES, R. A., REGONDI, S., WINTER, M. J., BUTLER, P. J., AGRADI, E., TAYLOR, E. W., KEVIN CHIPMAN, J. Cloning of a chub metallothionein cDNA and development of competitive RT-PCR of chub metallothionein mRNA as a potential biomarker of heavy metal exposure. **Marine Environmental Research**. 58 (2-5), p. 665–669, 2004.

HUANG, G. Y., YING, G. G., LIU, S. FANG, Y. X. Regulation of reproduction- and biomarker-related gene expression by sex steroids in the livers and ovaries of adult female western mosquito fish (*Gambusia affinis*). **Comp. Biochem. Physiol. A Mol Integr. Physiol.** v. 162, p. 36–43, 2012.

HU, C., YANG, X., GAO, L., ZHANG, P., LI, W., DONG, J., LI, C., ZHANG, X. Comparative analysis of heavy metal accumulation and bioindication in three seagrasses: Which species is more suitable as a bioindicator? **Science of Total Environment**. v. 669, p. 41–48, 2019.

IBGE. Censo Demográfico. Brasil. 2020.

INACIO, A. F. Metalotioneína e metais em *Geophagus brasiliensis* – Acará. Dissertação (Mestrado) – Escola Nacional de Saúde Pública, Rio de Janeiro, 2006.

JARUP, L. Hazards of heavy metal contamination. **Br. Med. Bull.** 68 (1), p. 167– 182, 2003.

JIN, Y., LIU, Z., LIU, F., YE, Y., PENG, T., FU, Z. Embryonic exposure to cadmium (II) and chromium (VI) induce behavioral alterations, oxidative stress and immunotoxicity in zebrafish (*Danio rerio*). **Neurotoxicology and Teratology**, 48, 9–17, 2015.

JORGENSEN A. K. Political-economic integration, industrial pollution and human health: a panel study of less-developed countries. **Int. Sociol.** 1980–2000. 24:115–43, 2009.

JOSEPH, P., MUCHNOK, T. K., KLISHIS, M. L., ROBERTS, J. R., ANTONIN, I J. M, WHONG, W. Z, ONG, T. M. Cadmium-induced cell transformation and tumorigenesis areas sociated with transcriptional activation of c-fos, c-jun, and c-myc protooncogenes: role of cellular calcium and reactive oxygen species. **Toxicol. Sci.** 61(2): p. 295–303, 2001.

JOSEPH, P., LEI, Y. X., WHONG, W. Z., ONG, T. M. Oncogenic potential of mouse translation elongation factor-1 δ , a novel cadmium-responsive proto-oncogene. **J. Biol. Chem.** 277 (8): p. 6131–6, 2002.

JOSEPH, B. C., PICHAIMUTHU, S., SRIMEENAKSHI, S., MURTHY, M., SELVAKUMAR, K. M. G., et al. An Overview of the Parameters for Recombinant Protein Expression in *Escherichia coli*. **J Cell Sci Ther.** 6: 221, 2015.

KALIČANIN, B. M. Determination of very toxic metal – cadmium in natural water samples. **Desalination.** v. 249, p. 58–62, 2009.

KEEN, J. H., HABIG, W. H. JAKOBY, W. B. Mechanism for several activities of the glutathione S-transferases. **Journal of Biological Chemistry.** v. 251, n. 20, p. 183 – 6188, 1976.

KIM, S. G., EOM, K. -H., KIM, S. -S., JIN, H. -G., KANG, J. -C. Kinetics of Cd

accumulation and elimination in tissues of juvenile rockfish (*Sebastes schlegeli*) exposed to dietary Cd. **Mar. Environ. Res.** v. 62, 327–340, 2006.

KIM, J. J. et al. Heavy metal toxicity: Na update of chelating therapeutic strategies. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology.** v. 54, p. 226–231, 2019.

KLASSEN, CURTIS, D. Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons; Sixth Edition; McGraw-Hill; 812–837; USA; 2001.

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

KOJIMA, Y., KAGI, J. H. R. **Trends Biochem. Sci.** v. 3, p. 90–93, 1978.

KOVENDAN, K.; VINCENT, S. Expression of metallothionein in liver and kidney of freshwater fish *Cyprinus carpio* var. communis (Linn) exposed to arsenic trioxide. **American Journal of Scientific and Industrial Research.** v. 4, n. 1, p. 1–10, 2013.

KUMAR, N. et al. Impacts of acute of arsenic (III) alone and with high temperature on stress biomarkers, immunological status and cellular metabolism in fish. **Aquatic Toxicology.** v. 214, p. 105233, 2019.

KÜTTER, M. T., BEMVENUTI, M. A., MORESCO, A. Feeding strategy of the jundiá *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptaperidae) in costal lagoons of southern Brazil. **Acta Sci. Bio. Sci.** v. 31, p. 41–47, 2009.

LACAVE, J. M. et al. Bioaccumulation, cellular and molecular effects in adult zebrafish after exposure to cadmium sulphide nanoparticles and to ionic cadmium. **Chemosphere**, 2019.

LACORN, M. et al. Quantification of metallothionein isoforms in fish livers and its implications for biomonitoring. **Environmental Toxicology and Chemistry.** v. 20, p. 140–145, 2001.

LA FONTAINE, S., MERCER, J. F. B. Trafficking of the copper-ATPases, ATP7A and ATP7B: Role in copper homeostasis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. 463(2), p. 149–167, 2007.

LAROCHELLE, O. et al. Phosphorylation is involved in the Activation of Metal-regulatory Transcription Factor 1 in response to metal ions. **J. of Biol. Chem.** v. 276, p. 41877–41888, 2001.

LAVALLIE, E. R. et al. A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm. **Biotechnology** 11: 187–1893, 1993.

LEWIS, M., PRYOR, R., WILKING, L. Fate and effects of anthropogenic chemicals in mangrove ecosystems: a review. **Environmental Pollution**. 159, 2328–46, 2011.

LI, Y., BAI, P., YAN, Y., YAN, W., SHI, W., XU, R. Removal of Zn^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} , and Cu^{2+} from aqueous solution by synthetic clinoptilolite. **Microporous Mesoporous Mater.** v. 273, p. 203–211, 2019.

LIU, Z., MENGES, H., ABDULLA, H., ZHANG, F., MAO, X. Cloning and characterization of metallothionein gene (HcMT) from *Halostachys caspica* and its expression in *E. coli*. **Gene**, 585, 221–227, 2016.

LIU, G. -D., SHENG, Z., HOU, C. -C., NI, J., HAN, Y. -L., WANG, Y. -F., ZHOU, Y., FU, S. -Y., ZHU, J. -Q. Molecular cloning, characterization and expression analysis of metallothionein in the liver of the teleost *Acrossocheilus fasciatus* exposed to cadmium chloride. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. v. 53, p. 1–9, 2017.

LIVINGSTONE, D. R. Biotechnology and pollution monitoring: Use of molecular biomarkers in the aquatic environment. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**. v. 57, p. 195–211, 1993.

ŁUCZYŃSKA, J., PASZCZYK, B., ŁUCZYŃSKI, M. J. Fish as a bioindicator of heavy metals pollution in aquatic ecosystem of Pluszne lake, Poland, and risk assessment for consumer's health. **Ecotoxicology and Environmental safety**. v. 153, p. 60–67, 2018.

MACAULEY-PATRICK, S., FAZENDA, M. L., MCNEIL, B., HARVEY, L. M. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. **Yeast**. v. 22, p. 249–270, 2005.

MAN, K. W., ZHENG, J., LEUNG, A. P., LAM, P. K., LAM, M. H., YEN, Y. Distribution and behavior of trace metals in the sediment and porewater of a tropical coastal wetland. **The Science of the Total Environment**. v. 327, p. 295–314, 2004.

MAKRIDES, S. C. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. **Microbiological reviews**. v. 60, p. 512–538, 1996.

MANIRETHAN, V., RAVAL, K., RAJAN, R., THAIRA, H., BALAKRISHNAN, R. M. Kinetic and thermodynamic studies on the adsorption of heavy metals from aqueous solution by melanin nanopigment obtained from marine source: *Pseudomonas stutzeri*. **J. Environ. Manag.** v. 214, p. 315–324, 2018.

MARET, W. Fluorescent probes for the structure and function of metallothionein. **Journal of Chromatography**. v. 877, p. 3378–3383, 2009.

MARGOSHES, M. & VALLEE, B. L. **J. Am. Chem. Soc.** v. 79, p. 4813–4814, 1957.

MARQUES, C. H. Aspectos fundamentais à implantação da tecnologia de produção de anticorpos monoclonais humanizados com potencial aplicação terapêutica. Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2005.

MASINDI, V., MUEDI, K. Environmental Contamination By Heavy Metals, 2018.

MASON, R. P. Trace Metals in Aquatic Systems. 1st ed. Wiley-Blackwell, 2013.

McGEER, J. C., NIYOGI, S., SMITH, D. S. Cadmium. In: WOOD, C. M., FARRELL, A.P., BRAUNER, C.J. (Eds.), *Homeostasis and Toxicology of Non-Essential Metals*. Elsevier London, UK, p. 125–184, 2012.

MCRAE, N. K., GAW, S., BROOKS, B. W., & GLOVER, C. N. Oxidative stress in the galaxiid fish, *Galaxias maculatus*, exposed to binary waterborne mixtures of the pro-oxidant cadmium and the anti-oxidant diclofenac. **Environmental Pollution**, 2019.

MEINELT, T., PLAYLE, R. C., PIETROCK, M., BURNISON B. K., WIENKE, A., STEINBERG C.E. W. Interaction of cadmium toxicity in embryos and larvae of zebrafish (*Danio rerio*) with calcium and humic substances. **Aquat. Toxicol.** v. 54, p. 205–215, 2001.

MEES, J. B. R. et al. Removal of organic matter and nutrients from slaughterhouse wastewater by using *Eichhornia crassipes* and evaluation of the generated biomass composting. **Revista Engenharia Agrícola**, v. 29, n. 3, p. 466-73, 2009.

MELLO, F. A., OLIVO, A. M. Recursos hídricos: poluição, escassez, qualidade microbiológica e química da água. **Colloquium Vitae**, v. 8, n. especial, p. 36–42, 2016.

MIANDARE, H. K., NIKNEJAD, M., SHABANI, A., SAFARI, R. Exposure of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) to cadmium results in biochemical, histological and transcriptional alterations. **Comp. Biochem. Physiol. C.** v. 181, p. 1–8, 2016.

MIJOŠEK, T. et al. Comparison of electrochemically determined metallothionein concentrations in wild freshwater salmon fish and gammarids and their relation to total and cytosolic metal levels. **Ecological Indicators**. v. 105, p. 188–198, 2019.

MILNEROWICZ, H., BIZON. Determination of metallothionein in biological fluids using enzyme-linked immunoassay with commercial antibody. **Acta BiochemicaPolonica**. v. 57, n°1/2010, p. 99–104, 2010.

MOORE, M. N. Biocomplexity: the post-genome challenge in ecotoxicology. **Aquat. Toxicol.** v. 59, p. 1–15, 2002.

NAGAMATSU, P. C., VARGAS, R. D. A., PROSDOCIMO, M. M., OPUSKEVITCH, I., FERREIRA, F. C. A. S., ZANCHIN, N., OLIVEIRA RIBEIRO, C. A., SOUZA, C. Synthetic fish metallothionein design as a potential tool for monitoring toxic metals in water. **Environ. Sci. Pollut. Res.**, 2010.

NAGAMINE, T., NAKAJIMA, K. Development of a High Sensitivity ELISA for the Assay of Metallothionein. **Curr. Pharm. Biotechnol.** v. 14, 427–431, 2013.

NATH, R., KAMBADUR, R., GULATI, S., PALIWAL, V. K., SHARMA, M. Molecular aspects, physiological-function, and clinical-significance of metallothioneins. **CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.** 27(1), 41–85, 1988.

NORDBERG, M. & KOJIMA, Y. In Metallothionein, eds. Kgi, J. H. R. & NORDBERG, M. (Birkhauser, Basel, Switzerland), p. 41–116, 1979.

NORDBERG, M., NORDBERG, G.F. Metallothioneins: historical development and overview, in: A. Sigel, H. Sigel, R. K. O Sigel (Eds), Metal ions in life sciences: metallothioneins and related chelators, Royal Society of Chemistry, Cambridge, v. 5, p. 1–29, 2009.

NUNES, G. S. Métodos imunoquímicos para análise de contaminantes ambientais: conceitos, estado de arte e perspectivas. **Quim. Nova.** v. 28, No. 3, p. 462–471, 2005.

OLIVE P. L. DNA precipitation assay: a rapid and simple method for detecting DNA damage in mammalian cells. **Environ. Mol. Mutagen.** 11(4): 487–495, 1988.

OMAR, W. A., SALEH, Y. S., MARIE, M. A. Integrating multiple fish biomarkers and risk assessment as indicators of metal pollution along the Red Sea coast of Hodeida, Yemen Republic. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** v.110 C, p. 221–231, 2014.

OSMAN, A. G. M., WUERTZ, S., MOHAMMED-GEBA, K. Lead-induced heat shock protein (HSP70) and metallothionein (MT) gene expression in the embryos of African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). **Scientific African**. 3, 2019.

OTVOS, J. D., ARMITAGE, I. M. Structure of the metal clusters in rabbit liver metallothionein. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. v. 77, p. 7094–7098, 1980.

PACHECO, B., CROMBET, L., LOPPNAU, P., COSSAR, D. A screening strategy for heterologous protein expression in *Escherichia coli* with the highest return of investment. **Prot. Exp. Purif.** 81: p. 33–41. 2012.

PAN Y. -X., LUO Z., ZHUO M. -Q., W C. -C., CHEN G. -H. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction mediated Cd-induced hepatic lipid accumulation in zebrafish *Danio rerio*. **Aquat. Toxicol.** v. 199, p. 12–20, 2018.

PANDER, J., GEIST, J. Ecological indicators for stream restoration success. **Ecol. Indic.** v. 30, p. 106–118, 2013.

PANNETIER, P., MORIN, B., CLÉRANDÉAU, C., LAURENT, J., CHAPELLE, C., CACHOT, J. Toxicity assessment of pollutants sorbed on environmental microplastics collected on beaches: Part II-adverse effects on Japanese medaka early life stages. **Environmental Pollution**. v. 248, p. 1098–1107, 2019.

PEREIRA, L. M. Clonagem, expressão, purificação e caracterização estrutural da proteína ribossomal L10 humana recombinante. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

PEREIRA, L. S. et al. Effects of ecologically relevant concentrations of cadmium in a freshwater fish. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 130, p. 29–39, 2016.

PODRUG, M., RASPOR, B. Seasonal variation of the metal (Zn, Fe, Mn) and metallothionein concentrations in the liver cytosol of the European chub (*Squalius cephalus* L.). **Environ. Monit. Assess.** v. 157, p. 1–10, 2009.

PRESTES et al. Copper, lead and cadmium loads and behavior in urban stormwater runoff in Curitiba, Brazil. **J. Braz. Chem. Soc.**, v.17. N°.1, 53–60, 2006.

PRETTO, A., LORO, V.L., MORSCH, V.M., MORAES, B.S., MENEZES, C., CLASEN, B., HOEHNE, L., DRESSLER, V. Acetylcholinesterase activity, lipid peroxidation, and bioaccumulation in silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to cadmium. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.** v. 58, p. 1008–1014, 2011.

REVENGA, C., TYRRELL, T. Major river basins of the World. In: The Wetland Book. Springer Science + Business Media Dordrecht, 2016. Available from: tentara.org/wp/wp-content/uploads/2017/03/Major-river-basins-of-the-world.pdf. (Accessed 10 november 2019).

ROESIJADI, G. Metallothionein and its role in toxic metal regulation. **Comp. Biochem. Physiol.** 113: 117–123, 1996.

ROSANO G. L., CECCARELLI E. A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. **Front Microbiol.** 5: 172, 2014.

RYDEN, L., DEUTSCH, H. F. **J. Biol. Chem.** v. 253, p. 519–524, 1978.

RYVOLOVA, M. et al. Analytical Methods for Metallothionein Detection. **Current Analytical Chemistry.** v. 7, No. 3, 2011.

RIGGIO, M., FILOSA, S., PARISI, E., SCUDIERO, R. Changes in zinc, copper and metallothionein contents during oocyte growth and early development of teleost *Danio rerio* (zebrafish). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C.** v. 135, p. 191–196, 2003.

RODRIGUES-GALDINO, A. M. et al. Development of the neotropical catfish *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) incubated in different temperature regimes. **Zygote.** v.18, p. 131–144, 2010.

SANTOS, F. L. N. Caracterização do potencial diagnóstico de poliantígenos para detecção do *Trypanosoma cruzi* na fase crônica da doença de Chagas. Tese

(Doutorado) – Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2016.

SABOLIĆ, I., BRELJAK D., HERAK-KRAMBERGER C. M., LJUBOJEVIĆ M. Cadmium and metallothionein. In: **KRETSINGER R. H., UVERSKY V. N., PERMYAKOV E.A. (EDS) Encyclopedia of metalloproteins**. Springer, NEW YORK, NY, 2013.

SARAF, S. R., FRENKEL, A., HARKE, M. J., JANKOWAIK, J. G., MCELROY, A, E. Effects of Microcystis on development of early life stage Japanese medaka (*Oryzias latipes*): comparative toxicity of natural blooms, cultured Microcystis and micro-cystin-LR. *Aquat. Toxicol.* 194, 18–16, 2018.

SAUER, G. R., WATABE, N. The effects of heavy metals and metabolic inhibitors on calcium uptake by gills and scales of *Fundulus heteroclitus in vitro*. **Comp.Biochem. Physiol. C.** v. 91, p. 473–478. 1988.

SCUDIERO, R., TEMUSSI, P. A., PARISI, E. Fish and mammalian metallothioneins: a comparative study. **Gene.** v. 345, p. 21–26, 2005.

SCHEUHAMMER, A. M., CHERIAN, M. G. Quantification of metallothioneins by a silver-saturation method. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** v. 82, p. 417–25, 1986.

SCHULTZE, P. et al. Conformation of [Cd7]-metallothionein-2 from rat liver in aqueous solution determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy. **J. Mol. Biol.** v. 203, p. 251–268, 1988.

SCHWARZENBACH R. P. et al. The challenge of micropollutants in aquatic systems. **Science.** v. 313, p.1072–1077, 2006.

SCHWARZENBACH, R. P. et al. Global Water Pollution and Human Health. **Annu. Rev. Environ. Resour.** v. 35, p. 109–136, 2010.

SIERRA-MARQUEZ, L. et al. Effects of cadmium exposure on sperm and larvae of neotropical fish *Prochilodus magdalenae*. **Comparative Biochemistry and**

Physiology, part C. v. 225, p. 108577, 2019.

SIES, H., KOCH, O. R., MARTINO, E., BOVERIS, A. Increased biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol-treated rats. **FEBS Letters**. v. 103, p. 287– 290, 1979.

SILVA, J. C. Biomarcadores morfológicos e análise química da bile em peixes para a avaliação da qualidade da água do rio Iguaçu. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba – PR, 2010.

SINGH, A., CHAUDHARY, S., AGARWAL, A., VERMA, A. S. Chapter 15 - Antibodies: **Monoclonal and Polyclonal Animal Biotechnol. Academic Press**. p. 265–287, 2014.

SHEKH, K. et al. Species and life-stage specific differences in cadmium accumulation and cadmium induced oxidative stress, metallothionein and heat shock protein responses in white sturgeon and rainbow trout. **Science of the Total Environment**. v. 673, p. 318–326, 2019.

SHENG, Z., YANG, W.X., ZHU, J.Q. Metallothionein from *Pseudosciaena crocea*: expression and response to cadmium-induced injury in the testes. **Ecotoxicology**. v. 24, p. 779-94, 2014.

SHEKH, K., TANG, S., KODZHAHINCHEV, V., NIYOGI, S., HECKER, M. Species and life-stage specific differences in cadmium accumulation and cadmium induced oxidative stress, metallothionein and heat shock protein responses in white sturgeon and rainbow trout. **Science of The Total Environment**. 673, 318–326, 2019.

SHENG, Z., YANG, W. X., ZHU, J. Q. Metallothionein from *Pseudosciaena crocea*: expression and response to cadmium-induced injury in the testes. **Ecotoxicology**. v. 24, p. 779-94, 2015.

SHUGART L. R, MACCARTHY J. F, HALBROOK, R. S. Biological markers of environmental and ecological contamination: an overview. **Risk Anal**. v.12: p.353–

360, 1992.

SIGG, L., BLACK, F., BUFFLE, J., CAO, J., CLEVEN, B., DAVISON, W., GALCERAN, J., GUNKEL, P., KALIS, E., KISTLER, D., MARTIN, M., NOEL, S., NUR, Y., ODZAK, N., PUY, J., van RIEMSDIJK, W., TEMMINGHOFF, E., WAEBER, M. L. T., TOEPPERWIEN, S., TOWN, R. M., UNSWORTH, E., WARNKEN, K. W., WENG, L.; XUE, H., ZHANG, H. Comparison of analytical techniques for dynamic trace metal speciation in natural freshwaters. **Environmental science & Technology**, 37, 1261, 2006.

SMIRNOVA IV., BITTEL, D. C., RAVINDRA, R., JIANG, H., ANDREWS, G. K. Zinc and cadmium can promote rapid nuclear translocation of metal response element-binding transcription factor-1. **J. Biol. Chem.** 275 (13): p. 9377–84, 2000.

SON, Y. O., WANG, X., HITRON, J. A., ZHANG, Z., CHENG, S., BUDHRAJA, A., DING, S., LEE, J. C., SHI, X. Cadmium induces autophagy through ROS-dependent activation of the LKB1-AMPK signaling in skin epidermal cells. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** v. 255, p. 287–96, 2011.

SONNACK, L., KLAWONN, T., KRIEHUBER, R., HOLLERT, H., SCHÄFERS, C., FENSKE, M. Comparative analysis of the transcriptome responses of zebrafish embryos after exposure to low concentrations of cadmium, cobalt and copper. **Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics**. v. 25, p. 99–108, 2018.

SORENSEN, E. M. B. Copper. In: Sorensen EMB, editor. Metal Poisoning in Fish. Boca Raton: CRC Press. p. 235–84, 1991.

TANG, S., DOERING, J. A., SUN, J., BEITEL, S. C., SHEKH, K., PATTERSON, S., CRAWFORD, S., GIESY, J. P., WISEMAN, S. B., HECKER, M. Linking oxidative stress and magnitude of compensatory responses with life-stage specific differences in sensitivity of White sturgeon (*Acipenser transmontanus*) to copper or cadmium. **Environ. Sci. Technol.** v. 50, p. 9717–9726, 2016.

TSUJIKAWA, K., IMAI, T., KAKUTANI, M., KAYAMORI, Y., MIMURA, T., OTAKI, N., KIMURA, M., FUKUYAMA, R., SHIMIZU, N. Localization of Metallothionein in Nuclei of Growing Primary Cultured Adult-Rat Hepatocytes. **FEBS Lett.** v. 283, p. 239–242, 1991.

TENNO, T., GODA, N., TATEISHI, Y., TOCHIO, H., MISHIMA, M., HAYASHI, H., SHIRAKAWA, M., HIROAKI, H. High-through put construction method for expression vector of peptides for NMR study suited for isotopic labeling. **Protein Eng. Des. Sel.** v. 17, p. 305–314, 2004.

TIWARI, S., SINGH, P., TIWARI, R., MEENA, K. K., YANDIGERI, M., SINGH, D. P., ARORA, D. K. Salt-tolerant rhizobacteria-mediated induced tolerance in wheat (*Triticum aestivum*) and chemical diversity in rhizosphere enhance plant growth. **Biol. Fertil. Soils.** v. 47 p. 907–916, 2011.

TOM, M., CHEN, N., SEGEV, M., FERUT, B., RINKEVICH, B. Quantifying fish metallothionein transcript by real time PCR for its utilization as an environmental biomarker. **Marine Pollution Bulletin.** v. 48, p. 705–710, 2004.

VAN DER OOST, R., BEYER, J., VERMEULEN, N. P. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology.** 13 (2), p. 57–149, 2003.

VAREDA, J. P., VALENTE, A. J. M., DURÃES, L. Assessment of heavy metal pollution from anthropogenic activities and remediation strategies: A review. **Journal of Environmental Management.** v. 246, p. 101–118, 2019.

VARDY, D. W., SANTORE, R., RYAN, A., GIESY, J. P., HECKER, M. Acute toxicity of copper, lead, cadmium, and zinc to early life stages of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) in laboratory and Columbia River water. **Environ. Sci. Pollut. Res. Int.** v. 21, p. 8176–8187, 2014.

VIARENGO, A., PONZANO, E., DONDERO, F., FABBRI, R. A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an

application to Mediterranean and Antarctic molluscs. **Mar. Environ. Res.** v. 44, p. 69–84, 1997.

VARDHAN, K. H. et al. A review on heavy metal pollution, toxicity ADN remedial measures: Current trends and future perspectives. **Journal of Molecular Liquids.** v. 290, p. 1197, 2019.

VERGANI, L., GRATTAROLA, M., DONDERO, F., VIARENGO, A. Expression, purification, and characterization of MT-A from rainbow trout. **Protein Expression and Purification.** v. 27, p. 338–345, 2003.

VERGANI, L. et al. Fish and molluscan metallothioneins. A structural and functional comparison. **The Febs journal.** v. 272, p. 6014–6023, 2005.

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.

VON DER HEYDEN, C. J., NEW, M. G. Sediment chemistry: a history of mine contaminant remediation and an assessment of processes and pollution potential. **Journal of Geochemical Exploration.** v. 82, p. 35–57, 2004.

VOROSMARTY, C. J., MCINTYRE, P. B., GESSNER, M. O., et al. Global threats to human water security and river biodiversity. **Nature.** v. 467, p. 555–561, 2010.

XIANG, D. F., ZHU, J. Q., JIN, S., HU, Y. J., TAN, F. Q., YANG, W. X. Expression and function analysis of metallothionein in the testis of *Portunus trituberculatus* exposed to cadmium. **Aquat Toxicol.** v. 140–141, p. 1–10, 2013.

XIONG, W., LI, J., CHEN, Y. et al. Determinants of community structure of zooplankton in heavily polluted river ecosystems. **Sci. Rep.** v. 6, p. 22043, 2016b.

XIONG, W., NI, P., CHEN, Y., GAO, Y., LI, S., ZHAN, A. Biological consequences of environmental pollution in running water ecosystems: A case study in zooplankton. **Environmental Pollution**. v. 252, p. 1483–1490, 2019.

ZHANG, H., REINOLDS, M. Cadmium exposure in living organisms: A short Review. **Science of the Total Environment**. v. 678, p. 761–767, 2019.

ZHOU, Y., LI, L., RU, B. Expression, purification and characterization of beta domain and beta domain dimer of metallothionein. **Biochem. Biophys. Acta**. v. 1524, p. 87–93, 2000.

ZILLER, A. et al. Metagenomics analysis reveals a new metallothionein family: Sequence and metal-binding features of new environmental cysteine-rich proteins. **Journal of Inorganic Biochemistry**. v. 167, p. 1–11, 2017.

XIAO, L., LIU, J., & GE, J. Dynamic game in agriculture and industry cross-sectoral water pollution governance in developing countries. **Agricultural Water Management**. 243, 106417, 2021.

XU, J., CAO, Z., ZHANG, Y., YUAN, Z., LOU, Z., XU, X., WANG, X. A review of functionalized carbon nanotubes and graphene for heavy metal adsorption from water: Preparation, application, and mechanism. **Chemosphere**. v. 195, p. 351–364, 2018.

WANG, W. -C. et al. Characteristics, functions, and applications of metallothionein in aquatic vertebrates. **Front. Mar. Sci**. 2014.

WANG, C., ZHANG, F., CAO, W., WANG, J. The identification of metallothionein in rare minnow (*Gobiocypris rarus*) and its expression following heavy metal exposure. **Environ. Toxicol. Pharmacol**. v. 37, p. 1283–91, 2014.

WERNER, J., WAUTIER, K., EVANS, R. E., BARON, C. L., KIDD, K., PALACE, V. Water born ethynylestradiol induces vitellogenin and alters metallothionein

expression in lake trout (*Salvelinus namaycush*). **Aquat. Toxicol.** v. 62, p. 321–328, 2003.

WHO: World Health Organization. Exposure to cadmium: a major public health concern, 2010.

WHO: Health as the pulse of the new urban agenda: united nations conference on housing and sustainable urban development, Quito, ISBN9789241511445, 2016a.

WHO: World Health Organization. Guidelines for drinking-water quality, fourth ed. incorporating the 1st addendum, 2017.

WIESLAW, W. et al. Chemical Recycling of Polystyrene, Sulfonation with different sulfonation agents. **Mol. Cryst. Liq. Cryst.** v 5222: p.378/790 – 387/799, 2010.

WILTEMBURG, F. Especificação de metais em ambientes aquáticos utilizando dispositivos DGT modificados: aplicação em ensaios de toxicidade frente a peixes. Dissertação (mestrado), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

WINTHER, J. R., THORPE, C. Quantification of Thiols and Disulfides. **Biochim. Biophys. Acta.** 1840 (2), 2014.

WU, S. M., HWANG, P. P. Copper or cadmium pretreatment increases the protection against cadmium toxicity in tilapia larvae (*Oreochromis mossambicus*). **Zool. Stud.** v. 42, p. 179–185, 2003.

YAMAMOTO F. Y., GARCIA J. R. E., KUPSCO, A., OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. Vitellogenin levels and others biomarkers show evidences of endocrine disruption in fish species from Iguaçu River - Southern Brazil. **Chemosphere.** 186: p. 88–99, 2017.

YANG, F., ZHOU, M., HE, Z.M., LIU, X.R., SUN, L., SUN, Y., CHEN, Z.C. High-yield expression in *Escherichia coli* of soluble human MT2a with native functions. **Protein Expression and Purification.** v. 53, p. 186-194, 2007.

YANG, Y., TIAN, Z., TENG, D., ZHANG, J., WANG, J., WANG, J. High-level production of a candidacidal peptide lactoferrampin in *Escherichia coli* by fusion expression. **Journal of Biotechnology**. 139 (4), p. 326–331, 2009.

YAU, K. Y. F., LEE, H., HALL, C. J., **Biotechnol. Adv.** v. 21, p. 599, 2003.

YUDKOVSKI, Y. et al. Quantitative immunochemical evaluation of fishmetallothionein upon exposure to cadmium. **Marine Environmental Research Elsevier**. 65 (5), p. 427, 2008.

ZHENG, X., WANG, W. High–level expression of housefly cecropin in *Escherichia coli* using a fusion protein. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**. 3 (6), p.421–426, 2010.

ZHOU, Q., YANG, N., LI, Y., REN, B., DING, X., BIAN, H., YAO, X. Total concentrations and sources of heavy metal pollution in global river and lake water bodies from 1972 to 2017. **Global Ecology and Conservation**, 2020.

ZHU, Q. -L., GUO, S. -N., YUAN, S. -S., LV, Z. -M., ZHENG, J.-L., XIA, H. Heat indicators of oxidative stress, inflammation and metal transport show dependence of cadmium pollution history in the liver of female zebrafish. **Aquatic Toxicology**. 191, 2017.

APÊNDICE

A metodologia do preparo de cada solução utilizada na avaliação de danos em DNA (Olive, 1988), foi descrita nesta seção:

Soluções para avaliação de danos em DNA

a) Solução de SDS 2% (temperatura ambiente)

O volume que se prepara depende do número de amostras que se tem, para cada amostra se usa 200 µl de solução para 250 ml de solução:

Para 250 ml de solução:

- 1) 10 mM de EDTA (PM=292,2 g/mol) - 250ml dissolvido* $0,01/1000\text{ml} \cdot 292,29/1 \text{ mol}=0,7305 \text{ g}$ de EDTA.
- 2) 10 mm Trisbase ou Trizma base (PM=121,1 g/mol) – 250 ml dissolvido* $0,01 \text{ mol}/1000 \text{ ml} \cdot 121,1\text{g}/1 \text{ mol}=0,30275 \text{ g}$ Trizma base.
- 3) 40 mM NaOH (PM=40 g/mol) – 250 ml dissolve* $0,04 \text{ mol}/1000 \text{ ml} \cdot 40\text{g}/1\text{mol}=0,4\text{g}$ NaOH
- 4) Sodiumdodecyl sulfate (SDS) 2% 2g SDS para cada 100 ml de dissolução - 5g em 250 ml.

Para 500 ml de solução (avolumar com Milli Q):

- 1) 1,461g de EDTA.
- 2) 0,6055g Trisbase ou Trizma base.
- 3) 0,8g de NaOH
- 4) 10 g de Sodiumdodecyl sulfate (SDS).

b) KCL 0,12 M (temperatura ambiente)

50 ml dissolvido * $0,12 \text{ moles}/1000\text{ml} \cdot 74,559/1 \text{ mol}= 0,447\text{g}$ KCl.

Para 250 ml 2,236 g de KCl em 250mL de Água Milli Q.

c) Reagente Hoechst (1 µl/mL)

Tampão usado como dissolvente para o reagente de Hoescht: 0,4 M NaCl, 4 mM sodium choleate e 0,1 M tris-acetate com o pH de 8,5. Calcular de acordo com a quantidade de amostras (cada pocinho usa 150µl de reagente).

d) Tampão (geladeira)

Para 50 ml (Ajustar pH 8,5 com NaOH):

0,4 M NaCl 50 ml de dissolvido $0,4 \text{ moles NaCl}/1000 \text{ ml} * 58,449/1\text{mol} = 1,169 \text{ g}$
NaCl Para 100 ml = 2,338 g.

**4 mM sodium cholate (430,57g/mol) 50ml de dissolvido * $0,004 \text{ moles}/1000 \text{ ml} * 430,579/1 \text{ mol} = 0,086\text{g}$.

Para 100 ml = 0,172 g.

***0,1 M de trizma-acetato 50 ml de dissolvido* $0,1\text{mol}/1000\text{ml} * 121,149/1 \text{ mol} = 0,6057 \text{ g}$ para 100 ml = 1,2114 g.

e) Estoque do reagente Hoechst 1 mg/ml (geladeira e escuro)

100ul de Hoescht 33342 = trihydrochloride trihydrate (10 mg/ml) 900 µl de metanol.

f) Solução diária (reagente Hoeschst 1 µl/mL propriamente dito (geladeira e escuro))

10 µl da solução acima (Stock do reagente n.2) 9,990 ml de Tampão n.1.

g) Buffer para diluição do DNA para curva padrão

-10 mM Trizma base-HCL (Pm = 121,19 mol) em 500 ml 0,6055 g.

-1 mM EDTA (PM= 380,2 g/mol) em 500 ml 0,1901g pH= 8.

Para 100 ml (Avolumar com Milli Q):

0,1576 g de Tris

0,0292 g de EDTA

Ajustar pH=8,0 com HCl.

e) Standart de esperma de salmão (geladeira).

- Pegar o stock de esperma de 1mg/ml em 4°C (geladeira).
- Pesar 0,010g do stock e diluir em 10 ml da TE1X.
- Diluir no ultrassom.

Observação: este standard será utilizado para curva.

Amostras

Devem ser separadas as seguintes alíquotas:

- 1) 25 µl de amostra homogeneizada não centrifugada em tampão de amostra.

Ensaio

- 1) Pegar os eppendorfs com 25µl de amostras homogeneizadas (agitar primeiro).
 - 2) Adicionar 200 µl SDS 20% aos eppendorfs com amostra.
 - 3) Agitar por inversão 2x.
 - 4) Deixar repousar à temperatura ambiente por 1 minuto.
 - 5) Adicionar 200 µl KCl 0,12 M.
 - 6) Agitar por inversão 2x.
 - 7) Colocar no banho a 60°C por 10 minutos.
 - 8) Agitar por inversão 2x.
 - 9) Incubar 30 min a 4°C.
 - 10) Centrifugar 8000 g a 5 minutos, 4°C (6800 RPM).
 - 11) Pipetar as amostras na placa preta em duplicata.
 - 50 µl do sobrenadante da amostra.
- Adicionar 150 µl do reativo Hoechst (solução diária 1µl/mL.)

Preparo da placa escura

Atenção: a curva não precisa passar pelos mesmos procedimentos da amostra. apenas pipetar direto na placa preta (diluir a solução de DNA no microtubo e depois pipetar na placa).

Standart $\mu\text{g/ml}$	Standart de esperma de salmão (μl)	Buffer de homogeneização μl este deve submeter-se ao mesmo tratamento que as amostras	Reativo Hoechst μl SOLUÇÃO DIÁRIA
0 (Branco)	0	50	150
4,55	5	49,5	150
9,1	10	49	150
22,7	25	47,5	150
45,5	50	45	150
90,9	100	40	150
113,6	125	37,5	150

A solução diária Hoechst tem que ser colocada com multicanal (uma curva por placa).

Leitura

Agitar a placa durante 5 minutos (300s) a 700 RPM.

- Medir a fluorescência:

Excitação: 360nm Emissão 460 nm manual 60

Shaking 300 seg orbital intensity low