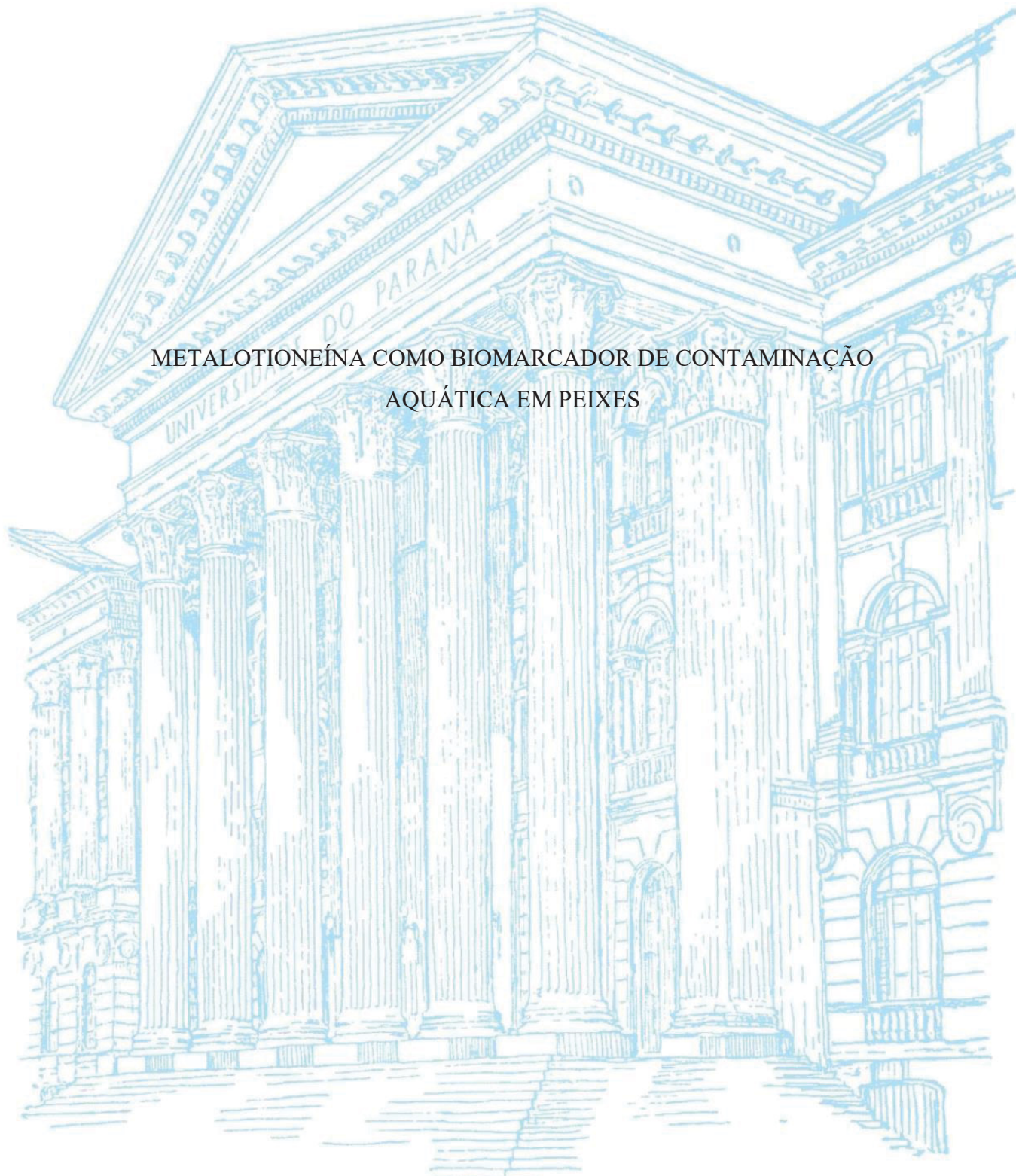


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JESSICA ZABLOCKI DA LUZ

METALOTIONEÍNA COMO BIOMARCADOR DE CONTAMINAÇÃO
AQUÁTICA EM PEIXES



CURITIBA

2023

JESSICA ZABLOCKI DA LUZ

METALOTIONEÍNA COMO BIOMARCADOR DE CONTAMINAÇÃO
AQUÁTICA EM PEIXES

Tese de doutorado 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 em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Filipak Neto

CURITIBA

2023

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Luz, Jessica Zablocki da

Metalotioneína como biomarcador de contaminação aquática em peixes / Jessica Zablocki da Luz. – Curitiba, 2023.

1 recurso on-line : PDF.

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

Orientador: Prof. Dr. Francisco Filipak Neto.

1. Água – Controle de qualidade. 2. Biomarcador. 3. Metalotioneína. 4. Biomonitoramento. I. Filipak Neto, Francisco, 1981-. II. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. III. Título.

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **JESSICA ZABLOCKI DA LUZ** intitulada: **Metalotioneína como biomarcador de contaminação aquática em peixes**, sob orientação do Prof. Dr. FRANCISCO FILIPAK NETO, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutora 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, 31 de Agosto de 2023.

Assinatura Eletrônica

31/08/2023 19:03:48.0

FRANCISCO FILIPAK NETO

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

31/08/2023 21:03:09.0

WANESSA ALGARTE RAMSDORF NAGATA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO
PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

31/08/2023 20:37:10.0

IZONETE CRISTINA GUILOSKI

Avaliador Externo (INSTITUTO DE PESQUISA PELÉ PEQUENO
PRÍNCIPE)

Assinatura Eletrônica

31/08/2023 19:03:57.0

DANIEL BUSSOLARO

Avaliador Externo (INSTITUTO FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

31/08/2023 21:13:04.0

TAYNAH VICARI

Avaliador Externo (FACULDADE PEQUENO PRÍNCIPE)

AGRADECIMENTOS

Ao contribuinte, pela existência das universidades públicas brasileiras e, conseqüentemente, pela oportunidade em conduzir esse estudo.

Ao prof. Francisco, pelos mais de oito anos de orientação, sendo para mim um dos maiores exemplos de dedicação, ética e conduta na pesquisa e ensino.

Aos demais professores que conduzem o Grupo de Pesquisa em Toxicologia Celular, pela dedicação no ensino, nas orientações, e em levantar os recursos necessários à continuidade das pesquisas. Em especial à profa. Maritana pelo auxílio com a Microscopia Eletrônica de Varredura, processada no Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná.

Ao prof. Frank, por tornar possível que parte desse estudo fosse desenvolvido no exterior, durante o doutorado-sanduíche, dando todo o suporte necessário e buscando novas colaborações para que o experimento com as larvas de *zebrafish* fosse desenvolvido, além de acompanhar sempre de perto cada etapa do projeto.

Aos professores da banca examinadora: Wanessa, Izonete, Daniel e Taynah, por dedicarem seu tempo e conhecimento à avaliação minuciosa, que foram fundamentais para o aprimoramento da tese.

Aos funcionários técnicos e administrativos da Universidade Federal do Paraná. Em especial ao Israel, técnico do Centro de Tecnologias Avançadas em Fluorescência, pelo suporte na obtenção das imagens da Imunocitoquímica, e ao Lucas, secretário do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, pelo suporte com os trâmites burocráticos.

Aos funcionários técnicos e administrativos da *University of Southern Denmark*. Em especial, à Katrine, Vibeke, Pia e Eva, pelo auxílio com a obtenção dos ovos usados nos experimentos e com as análises de *Western Blot* e LC-MS/MS. À Lene, secretária do *Protein Research Group*, pelo suporte com a trâmites burocráticos. E ao Vladimir, pelo conhecimento compartilhado no universo da Proteômica e por toda contribuição, desde a otimização dos protocolos até o processamento das amostras e análise dos resultados.

Ao prof. Elvis e às colegas Xiaoyu e Cecilia, do *Ecotoxicology Group*, pelo auxílio com os experimentos usando as larvas de *zebrafish*.

Ao prof. Kaare e à Lilian, do Departamento de Física, pela tentativa em quantificar o zinco nas amostras.

Aos colegas do Grupo de Pesquisa em Toxicologia Celular, Flávia, Dámaso, Erick, Luiza, Yuri, Tobias, etc., pela contribuição direta ou indireta no desenvolvimento desse estudo e por dividirem comigo toda a insegurança e ansiedade inerentes à pós-graduação. Em especial, ao Tugstênio, pelas frustrações compartilhadas em razão do desafio que foi implementar um novo modelo experimental no grupo, e pelo conhecimento compartilhado, principalmente em relação aos experimentos para avaliação dos biomarcadores bioquímicos e à diferentes análises de bioinformática. À Aliciane, por ter tido a iniciativa de organizar os protocolos, espaço e reagentes para as análises de RT-qPCR, e por todas as conversas, sobre ciência ou não, que deixaram esses mais de quatro anos muito mais leves. Ao Claudemir, pelo conhecimento compartilhado no universo das Técnicas Imunológicas, ELISA e *Western Blot*, e Cromatografia Líquida. À Micheli, Camila e Roberta pelo auxílio durante os experimentos.

Aos colegas do *Protein Research Group*, Camila, Pelayo, Belén, Lucrezia, Joel, Marie, Ana, etc., pelo conhecimento compartilhado no universo da Proteômica, que até então era um mundo novo para mim. Em especial ao Lucas, pelo auxílio com a análise dos resultados.

À Renata, aluna egressa do Programa, pela contribuição em relação ao doutorado-sanduíche, desde a escrita do projeto, recomendações de diferentes naturezas, até análise dos resultados.

Aos alunos e professores dos laboratórios de Matriz Extracelular e Biotecnologia de Venenos, de Investigação de Polissacarídeos Sulfatados e de Células Inflamatórias e Neoplásicas do departamento de Biologia Celular da UFPR, pelo auxílio com empréstimo de equipamentos, materiais e reagentes.

Às agências fomentadoras, pelo repasse dos recursos financeiros. Em especial, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão das bolsas no país e no exterior, durante o doutorado-sanduíche e à Companhia Paranaense de Energia, pelo recurso usado para compra de equipamentos, materiais e reagentes usados nesse estudo.

À minha família nuclear: meus pais Marlei e Hélia, e meus irmãos/melhores amigos, Janaina e Eliton, pelos ideais e valores construídos, que foram os maiores responsáveis pelo que eu sou hoje, e por dar suporte nas minhas escolhas até aqui. Também aos demais da minha família extensa: tios, tias, babcia, dziadek (*In Memoriam*), padrinho (*In Memoriam*), madrinha, chrzestna, primos, primas, e afilhadas, pelos valores compartilhados e pelo suporte de sempre.

Aos amigos de longa e curta data, pelas vivências, estórias, crenças e morais compartilhadas, que me fazem entender que a vida, quanto mais diversa, mais bonita é.

Aos que entendem a importância da biodiversidade, se preocupam com o futuro e tentam ajustar a moral e cultura já consolidadas com novas ideias, que poderiam diminuir o impacto que causamos na natureza, por me fazerem acreditar em um mundo melhor.

Por fim, ao meu círculo social, porque, como descreve o provérbio zulu, "sou porque somos".

“You cannot get through a single day without having an impact on the world around you. What you do makes a difference, and you have to decide what kind of difference you want to make.”

Jane Goodall

RESUMO

O acúmulo de diferentes contaminantes e poluentes em ecossistemas aquáticos, decorrentes de processos naturais e principalmente da atividade humana, vem se tornando um problema mundial. No biomonitoramento, a saúde da biota também é avaliada para determinar o nível seguro de resíduos despejados em corpos d'água. Uma proteína que pode ser detectada na biota e tem sido indicada como biomarcador de contaminação por metais é a metalotioneína (MT). Observar a responsividade em relação aos níveis basais da MT em peixes depois de expostos a múltiplos contaminantes ambientais é importante para validar a MT enquanto biomarcador de contaminação e poluição de ecossistemas aquáticos por metais. Dessa forma, esse estudo buscou integrar abordagens *in silico* e *in vitro* e as espécies de peixes *Oreochromis niloticus* e *Danio rerio* com o objetivo de avaliar a indução da MT por metais e entender como outras classes de contaminantes ambientais interferem no mecanismo geral de indução da MT por metais. Para isso, esse estudo foi dividido em três capítulos. No capítulo I, o objetivo foi implementar o cultivo primário de hepatócitos de *O. niloticus* como ferramenta na toxicologia ambiental. No capítulo II, buscou-se avaliar o cádmio enquanto indutor da MT em peixes, usando abordagens *in silico* e *in vitro*. E no capítulo III, buscou-se distinguir como agrotóxicos interferem na resposta celular normalmente observada frente à exposição a metais, usando larvas de *D. rerio* como modelo e uma abordagem proteômica. Foi possível isolar as células e proceder com o cultivo primário de hepatócitos de *O. niloticus* utilizando recursos e métodos simples, bem como manter as células viáveis por tempo suficiente para avaliar o potencial tóxico de contaminantes ambientais. Além disso, os metais pesados tiveram diferentes potenciais para induzir a expressão da MT e o cádmio foi um potente indutor de MT em hepatócitos de *O. niloticus*. Por fim, foi sugerido que agrotóxicos também podem contribuir para a regulação da MT por meio do aumento nos níveis de EROs. Portanto, os resultados deste estudo não desencorajam o uso da MT como biomarcador na avaliação da contaminação e poluição por metais em programas de monitoramento da qualidade da água e em estudos ecotoxicológicos. Porém, novos estudos são recomendados para a melhor compreensão e interpretação dos dados obtidos ao empregar este biomarcador.

Palavras-chave: Contaminação aquática. Metal pesado. Cultivo primário de hepatócitos. Tilápia do Nilo. *Zebrafish*.

ABSTRACT

The accumulation of different contaminants and pollutants in aquatic ecosystems, resulting from natural processes and mainly human activities, has become a global problem. In biomonitoring, the health of the biota is also assessed to determine the safe level of waste discharged into water bodies. A protein that can be detected in biota and has been indicated as a biomarker of metal contamination is metallothionein (MT). Observing responsiveness to baseline levels of MT in fish after exposure to multiple environmental contaminants is important to validate MT as a biomarker of contamination and pollution of aquatic ecosystems by metals. Therefore, this study aims to integrate *in silico* and *in vitro* approaches using the fish species *Oreochromis niloticus* and *Danio rerio* to evaluate MT induction by metals in these species and understand how other classes of environmental contaminants interfere with the general metal induction mechanism. This study was divided into three stages. In chapter I, the aim was to implement the primary culture of *O. niloticus* hepatocytes as a tool in environmental toxicology. In chapter II, the aim was to evaluate cadmium as an inducer of MT in fish, using *in silico* and *in vitro* approaches. In chapter III, the aim was to distinguish how pesticides interfere with the cell response commonly observed after exposure to metals, using *D. rerio* larvae as a model and a proteomic approach. Cell isolation and culture of *O. niloticus* primary hepatocytes were possible using simple resources and methods, in addition to keeping the cells viable long enough to assess the toxic potential of environmental contaminants. Furthermore, heavy metals had different potentials to induce MT expression in fish and cadmium was a potent MT inducer in *O. niloticus* hepatocytes. Finally, it was suggested that pesticides may contribute to MT regulation by increasing ROS levels. Therefore, the results of this study do not discourage the use of MT as a biomarker in the assessment of metal contamination and pollution in water quality monitoring programs and in ecotoxicological studies. However, new studies are recommended for a better understanding and interpretation of the data obtained when using this biomarker.

Keywords: Aquatic contamination. Heavy metal. Hepatocyte primary culture. Nile tilapia. Zebrafish.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Fluxograma das etapas I, II E III do estudo.....	26
FIGURA 2 – Interação entre metais e substratos	28
FIGURA 3 – Tabela periódica com metais pesados em destaque.....	29
FIGURA 4 – Estrutura simplificada da metalotioneína	32
FIGURA 5 – Via de síntese da metalotioneína	33
FIGURA 6 – Cultivo primário de hepatócitos de <i>O. niloticus</i> sob microscopia de luz .	50
FIGURA 7 – Cultivo primário de hepatócitos de <i>O. niloticus</i> sob microscopia eletrônica e de fluorescência	51
FIGURA 8 – Viabilidade dos hepatócitos após descongelamento.....	52
FIGURA 9 – Ensaio de adesão celular após 24, 48 e 72 horas de exposição ao cádmio em hepatócitos de <i>O. niloticus</i>	52
FIGURA 10 – Hepatócitos corados com cristal violeta no ensaio de adesão celular	53
FIGURA 11 – Ensaio do metabolismo do MTT após 24, 48 e 72 horas de exposição ao cádmio em hepatócitos de <i>O. niloticus</i>	54
FIGURA 12 – Hepatócitos corados com cristais de formazan no ensaio do metabolismo do MTT.....	54
FIGURA 13 – Ensaio da retenção de vermelho neutro após 24, 48 e 72 horas de exposição ao cádmio em hepatócitos de <i>O. niloticus</i>	55
FIGURA 14 – Hepatócitos corados com vermelho neutro no ensaio da retenção de vermelho neutro	55
FIGURA 15 – Atividade da superóxido dismutase após 24, 48 e 72 horas de exposição ao cádmio em hepatócitos de <i>O. niloticus</i>	56
FIGURA 16 – Atividade da glutathione s-transferase após 24, 48 e 72 horas de exposição ao cádmio em hepatócitos de <i>O. niloticus</i>	57
FIGURA 17 – Atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase após 24, 48 e 72 horas de exposição ao cádmio em hepatócitos de <i>O. niloticus</i>	57
FIGURA 18 – Atividade da catalase após 24, 48 e 72 horas de exposição ao cádmio em hepatócitos de <i>O. niloticus</i>	58
FIGURA 19 – Níveis de espécies reativas de oxigênio após 24, 48 e 72 horas de exposição ao cádmio em hepatócitos de <i>O. niloticus</i>	59
FIGURA 20 – Níveis de espécies reativas de nitrogênio após 24, 48 e 72 horas de exposição ao cádmio em hepatócitos de <i>O. niloticus</i>	59

FIGURA 21 – Peroxidação lipídica após 24, 48 e 72 horas de exposição ao cádmio em hepatócitos de <i>O. niloticus</i>	60
FIGURA 22 – Níveis de tióis não proteicos após 24, 48 e 72 horas de exposição ao cádmio em hepatócitos de <i>O. niloticus</i>	60
FIGURA 23 – Resposta integrada de biomarcadores após 24, 48 e 72 horas de exposição ao cádmio em hepatócitos de <i>O. niloticus</i>	61
FIGURA 24 – Esquema resumindo como o cádmio interferiu no sistema antioxidante dos hepatócitos de <i>O. niloticus</i>	65
FIGURA 25 – Rede construída com a ferramenta STRING mostrando as 251 proteínas que formam redes de interação funcional com a metalotioneína	81
FIGURA 26 – <i>Docking</i> molecular entre metais pesados e proteínas de ligação ao zinco	82
FIGURA 27 – <i>Docking</i> molecular entre Zn ²⁺ e Cd ²⁺ e proteínas com sítios de ligação ao Zn ²⁺	82
FIGURA 28 – <i>Docking</i> molecular entre Zn ²⁺ , Cd ²⁺ e metalotioneína	83
FIGURA 29 – Ensaio de adesão celular após 24, 48 e 72 horas de exposição ao cádmio em hepatócitos de <i>O. niloticus</i>	84
FIGURA 30 – Ensaio do metabolismo de MTT após 24, 48 e 72 horas de exposição ao cádmio em hepatócitos de <i>O. niloticus</i>	84
FIGURA 31 – Ensaio da retenção de vermelho neutro após 24, 48 e 72 horas de exposição ao cádmio em hepatócitos de <i>O. niloticus</i>	85
FIGURA 32 – Imagens dos ensaios de viabilidade celular dos hepatócitos de <i>O. niloticus</i> expostos ao cádmio.....	85
FIGURA 33 – Ensaio de adesão celular após 72 horas de exposição aos metais em hepatócitos de <i>O. niloticus</i>	86
FIGURA 34 – Ensaio do metabolismo de MTT após 72 horas de exposição aos metais em hepatócitos de <i>O. niloticus</i>	86
FIGURA 35 – Ensaio do metabolismo de resazurin após 72 horas de exposição aos metais em hepatócitos de <i>O. niloticus</i>	87
FIGURA 36 – Ensaio do metabolismo de retenção do vermelho neutro após 72 horas de exposição aos metais em hepatócitos de <i>O. niloticus</i>	87
FIGURA 37 – Indução da metalotioneína em hepatócitos de <i>O. niloticus</i> expostos ao cádmio a nível de RNAm	88

FIGURA 38 – Indução da metalotioneína em hepatócitos de <i>O. niloticus</i> expostos ao cádmio a nível proteico.....	88
FIGURA 39 – Indução de fatores de transcrição metálica em hepatócitos de <i>O. niloticus</i> expostos ao cádmio.....	89
FIGURA 40 – Teste inicial dos anticorpos IgG policlonais anti metalotioneína no ensaio de ELISA	89
FIGURA 41 – Ensaio de ELISA para níveis de metalotioneína em hepatócitos de <i>O. niloticus</i> expostos ao cádmio.....	90
FIGURA 42 – Ensaio de <i>western blot</i> em hepatócitos de <i>O. niloticus</i> expostos ao cádmio	91
FIGURA 43 – Indução da metalotioneína em hepatócitos de <i>O. niloticus</i> expostos à metais a nível de RNAm.....	91
FIGURA 44 – Ensaio de adesão celular após 72 horas de exposição a múltiplos contaminantes ambientais em hepatócitos de <i>O. niloticus</i>	112
FIGURA 45 – Ensaio do metabolismo do resazurin após 72 horas de exposição a múltiplos contaminantes ambientais em hepatócitos de <i>O. niloticus</i>	113
FIGURA 46 – Ensaio da retenção do vermelho neutro após 72 horas de exposição a múltiplos contaminantes ambientais em hepatócitos de <i>O. niloticus</i>	113
FIGURA 47 – Expressão gênica após 72 horas de exposição a múltiplos contaminantes ambientais em hepatócitos de <i>O. niloticus</i>	114
FIGURA 48 – Ensaio de <i>western blot</i> para níveis de metalotioneína em larvas de <i>D. rerio</i> expostos até 96 hpf.....	115
FIGURA 49 – Eficiência da digestão usando tripsina.....	116
FIGURA 50 – Cromatograma das frações de amostras de peptídeos marcados com TMT para proteoma total	117
FIGURA 51 – <i>Volcano plot</i> para o proteoma total nas larvas de <i>D. rerio</i> expostas ao cádmio	117
FIGURA 52 – <i>Volcano plot</i> para o proteoma total nas larvas de <i>D. rerio</i> expostas ao diclorvós	118
FIGURA 53 – <i>Volcano plot</i> para o proteoma total nas larvas de <i>D. rerio</i> expostas à deltametrina	118
FIGURA 54 – Diagrama de Venn para as proteínas diferencialmente expressas no proteoma total das larvas de <i>D. rerio</i>	119

FIGURA 55 – <i>Heatmap</i> representando <i>fold change</i> das proteínas diferencialmente expressas no proteoma total das larvas de <i>D. rerio</i> expostas ao cádmio e ao diclorvós	120
FIGURA 56 – Anotações considerando as proteínas diferencialmente expressas nas larvas de <i>D. rerio</i> expostas ao cádmio	120
FIGURA 57 – Anotações considerando as proteínas diferencialmente expressas nas larvas de <i>D. rerio</i> expostas ao diclorvós	121
FIGURA 58 – Anotações considerando as proteínas diferencialmente expressas nas larvas de <i>D. rerio</i> expostas a deltametrina	121
FIGURA 59 – Rede formada com proteínas reguladas nas larvas expostas ao cádmio e ao diclorvós	122
FIGURA 60 – Cromatograma das frações de amostras de peptídeos marcados com TMT para o fosfoproteoma	122
FIGURA 61 – <i>Volcano plot</i> para o fosfoproteoma nas larvas de <i>D. rerio</i> expostas ao cádmio	123
FIGURA 62 – <i>Volcano plot</i> para o fosfoproteoma nas larvas de <i>D. rerio</i> expostas ao diclorvós	123
FIGURA 63 – <i>Volcano plot</i> para o fosfoproteoma nas larvas de <i>D. rerio</i> expostas à deltametrina	124
FIGURA 64 – Diagrama de Venn para as proteínas diferencialmente expressas no fosfoproteoma.....	124
FIGURA 65 – Anotações considerando as fosfoproteínas diferencialmente expressas nas larvas expostas ao cádmio	125
FIGURA 66 – Anotações considerando as fosfoproteínas diferencialmente expressas nas larvas expostas ao diclorvós	125
FIGURA 67 – Rede formada com a fosfoproteína LRRFIP-1 e a proteína FTHL27 ..	126

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Parâmetros para cultivo primário de hepatócitos de <i>O. niloticus</i> utilizados em estudos anteriores.....	42
TABELA 2 – Valores de RIB para cada condição de exposição ao Cd.....	61
TABELA 3 – Dados dos <i>primers</i>	77
TABELA 4 – Lista de potenciais indutores da MT.....	104
TABELA 5 – Teste Q de Cochran para testar subletalidade dos potenciais contaminantes ambientais.....	115

LISTA DE SIGLAS

3,4-DCA	– 3,4-dicloroanilina
AANAT1	– Arilalquilamina N-acetiltransferase 1
ACN	– Acetonitrila
ACTB	– Actina β
ADCY6B	– Adenilato ciclase 6b
AF	– Ácido fórmico
ATF	– Ácido trifluoroacético
ANOVA	– Análise de variância
BOD1L1	– Biorientação dos cromossomos na divisão celular 1, tipo 1
BSA	– Albumina de soro bovino (do inglês <i>bovine serum albumine</i>)
CARS	– Cisteína-tRNA ligase
CAT	– Catalase
5-CFDA-AM	– Diacetato de 5-carboxifluoresceína, éster acetoximetílico
CI	– Concentração intermediária
CV	– Cristal violeta
DAPI	– 4',6-diamidino-2-fenilindol
DDPV	– Diclorvós
DMEM	– <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	– Ácido desoxirribonucleico (do inglês <i>Deoxyribonucleic acid</i>)
CDNB	– 1-Cloro-2,4-dinitrobenzeno
DTM	– Deltametrina
ELISA	– <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ERM	– Elementos de regulação metálica
ERN	– Espécie reativa de nitrogênio
ERO	– Espécie reativa de oxigênio
FDR	– <i>False discovery rate</i>
FET	– <i>Fish Embryo Acute Toxicity</i>
FITC	– <i>Fluorescein isothiocyanate</i>
FLX	– Fludioxonil
FTHL27	– Ferritina 27
FTM	– Fator de transcrição metálica
G6PDH	– Glicose-6-fosfato desidrogenase

GnRH-A	– Agonista do hormônio liberador de gonadotropina
GSH	– Glutationa
GSSG	– Dissulfeto de glutaciona
GST	– Glutationa S-transferase
H3K4	– Lisina 4 da histona H3 metilada
HEPES	– Ácido (4-(2-hidroxi-1-piperazino)etano) sulfônico
HPA	– Hidrocarboneto policíclico aromático
HPLC	– Cromatografia líquida de alta performance
HRP	– Peroxidase de rábano
ICP-MS	– Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado
IDA	– Ingestão diária aceitável
IgG	– Imunoglobulina G
IgY	– Imunoglobulina Y
IQR	– Intervalo interquartil
KCNK3	– Canal de potássio 3
kDa	– Kilodalton
LC-MS/MS	– Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa em tandem
LPO	– Peroxidação lipídica
LRRFIP1	– Proteína de interação com <i>Flightless I</i> rica em repetições de leucina 1
LZTFL1	– Fator de transcrição zíper de leucina, tipo I
M6A	– Modificação química N6-metiladenosina
METTL3	– N6-adenosina-metiltransferase, subunidade 70 kD
MEV	– Microscopia eletrônica de varredura
MIB	– <i>Metal ion-binding</i>
MOD	– Matéria orgânica dissolvida
MS222	– Mesilato de triclaína
MT	– Metalotioneína
MTT	– Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NAD	– Nicotinamida adenina dinucleótideo
NADK2	– NAD quinase 2
NADP ⁺	– Nicotinamida adenina dinucleótideo fosfato
NADPH	– Nicotinamida adenina dinucleótideo fosfato reduzida
NAMPT	– Nicotinamida fosforibosiltransferase
NLRP3	– Família de receptores do tipo NOD contendo o domínio pirina 3

NOX	– NADPH oxidase
OECD	– Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
ON	– Óxido nítrico
PBS	– <i>Phosphate-buffered saline</i>
PBS-EDTA	– PBS com adição de ácido etilenodiaminotetracético
PBS-T	– PBS com adição de <i>Tween 20</i>
PIH1D1	– Proteína 1 contendo o domínio PIH1
POLR3K	– Subunidade RPC10 da RNA polimerase III direcionada ao DNA
PVDF	– Fluoreto de polivinilideno
RIB	– Resposta integrada de biomarcadores
RNA	– Ácido ribonucleico
RNA _m	– RNA mensageiro
PCR	– Reação em cadeia da polimerase
RT-qPCR	– PCR quantitativa de transcrição reversa
TUBA	– Tubulina α em cadeia
SDS	– Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	– Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS
SETD1A	– Proteína modificadora de cromatina 1A
SFB	– Soro fetal bovino
SH	– grupo tiol ou sulfidril
SLC6A18	– Família de transportadores de solutos 6 membro 18
SOD	– Superóxido dismutase
SPHK1	– Esfingosina quinase 1
STRING	– <i>Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins</i>
TBS	– <i>Tris Buffered Saline</i>
TBS-T	– TBS com adição de <i>Tween 20</i>
TMT	– <i>Tandem mass tag</i>
TNP	– Tióis não proteicos
TRIS-EDTA	– TBS com adição de ácido etilenodiaminotetracético
UBCE	– Enzima de conjugação de ubiquitina
VN	– Vermelho neutro
WTAP	– Proteína associada ao tumor de Wilms

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
1.1	CONTEXTUALIZAÇÃO	23
1.2	HIPÓTESE	25
1.3	OBJETIVOS	25
1.3.1	<i>Objetivo geral</i>	25
1.3.2	<i>Objetivos específicos</i>	25
1.4	DELINEAMENTO METODOLÓGICO.....	25
2	REVISÃO DA LITERATURA	27
2.1	ECOTOXICOLOGIA AQUÁTICA	27
2.2	CONTAMINAÇÃO DE ECOSISTEMAS AQUÁTICOS POR METAIS	27
2.3	NOMENCLATURA PARA METAIS NA TOXICOLOGIA AMBIENTAL ...	28
2.4	REALIDADE BRASILEIRA EM RELAÇÃO A CONTAMINAÇÃO DE ECOSISTEMAS AQUÁTICOS POR METAIS.....	30
2.5	BIOMARCADORES E A METALOTIONEÍNA.....	31
2.6	HEPATÓCITOS DE <i>Oreochromis niloticus</i> E LARVAS DE <i>Danio rerio</i> COMO MODELOS EXPERIMENTAIS	33
	CAPÍTULO I	35
	RESUMO	36
	ABSTRACT	37
1	INTRODUÇÃO	38
1.1	CONTEXTUALIZAÇÃO	38
1.2	OBJETIVOS	40
1.2.1	<i>Objetivo geral</i>	40
1.2.2	<i>Objetivos específicos</i>	40
2	MATERIAL E MÉTODOS	41
2.1	OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DOS PEIXES	41
2.2	ISOLAMENTO, CULTIVO E CONGELAMENTO DE CÉLULAS HEPÁTICAS	41
2.3	MORFOLOGIA.....	44
2.3.1	<i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</i>	44
2.3.2	<i>Microscopia de fluorescência</i>	44
2.4	EXPOSIÇÃO AO CÁDMIO	44

2.5	ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR.....	45
2.5.1	<i>Metabolismo do MTT</i>	45
2.5.2	<i>Retenção do vermelho neutro e adesão celular</i>	45
2.6	BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS	46
2.6.1	<i>Enzimas antioxidantes</i>	46
2.6.1.1	Atividade de superóxido dismutase (SOD)	46
2.6.1.2	Atividade de glutathione S-transferase (GST).....	47
2.6.1.3	Atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH)	47
2.6.1.4	Atividade da catalase (CAT)	47
2.6.2	<i>Níveis de tióis não proteicos (TNP)</i>	47
2.6.3	<i>Peroxidação lipídica (LPO)</i>	48
2.6.4	<i>Níveis de espécies reativas de oxigênio</i>	48
2.6.5	<i>Níveis de espécies reativas de nitrogênio</i>	48
2.7	RESPOSTA INTEGRADA DE BIOMARCADORES (RIB).....	49
2.8	TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS.....	49
3	RESULTADOS	50
3.1	ISOLAMENTO, CULTIVO E CONGELAMENTO DAS CÉLULAS DO FÍGADO.....	50
3.2	VIABILIDADE CELULAR.....	52
3.3	ENZIMAS ANTIOXIDANTES	56
3.4	RESPOSTA INTEGRADA DE BIOMARCADORES	60
4	DISCUSSÃO	62
4.1	CULTIVO PRIMÁRIO 2D DE HEPATÓCITOS.....	62
4.2	METABOLISMO DO MTT COMO TESTE DE CITOTOXICIDADE	63
4.3	POTENCIAL CITOTÓXICO DE Cd.....	64
4.4	Cd INDUZIU DESEQUILÍBRIO NO SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE.....	64
5	CONCLUSÃO	67
	CAPÍTULO II	68
	RESUMO	69
	ABSTRACT	70
1	INTRODUÇÃO	71
1.1	CONTEXTUALIZAÇÃO	71
1.2	OBJETIVOS	73

1.2.1	<i>Objetivo geral</i>	73
1.2.2	<i>Objetivos específicos</i>	73
2	MATERIAL E MÉTODOS	74
2.1	<i>DOCKING MOLECULAR</i>	74
2.2	OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DOS EXEMPLARES DE <i>Oreochromis niloticus</i>	74
2.3	ISOLAMENTO, CULTIVO E EXPOSIÇÃO DE CÉLULAS DO FÍGADO....	74
2.4	VIABILIDADE CELULAR.....	75
2.5	INDUÇÃO DE METALOTIONEÍNA.....	76
2.5.1	<i>Expressão gênica</i>	76
2.5.2	<i>Expressão proteica</i>	77
2.5.2.1	<i>Método bioquímico</i>	77
2.5.2.2	ELISA.....	78
2.5.2.3	<i>Western blot</i>	79
2.6	IMUNOCITOQUÍMICA	80
2.7	TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS.....	80
3	RESULTADOS	81
3.1	<i>DOCKING MOLECULAR</i>	81
3.2	ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR.....	83
3.3	INDUÇÃO DE METALOTIONEÍNA.....	87
4	DISCUSSÃO	92
4.1	MODELOS DE ESTUDO EM ECOTOXICOLOGIA	92
4.2	IMUNOENSAIOS	92
4.3	ESTUDO DE SÍTIOS DE LIGAÇÃO DE METAIS, <i>DOCKING MOLECULAR</i> E EXPRESSÃO GÊNICA DA MT	93
4.4	PAPEL DO ZINCO NO MECANISMO DE INDUÇÃO DA MT E <i>INSIGHTS</i> SOBRE COMO O CÁDMIO INTERFERE.....	94
5	CONCLUSÃO	96
	CAPÍTULO III	97
	RESUMO	98
	ABSTRACT	99
1	INTRODUÇÃO	100
1.1	CONTEXTUALIZAÇÃO	100
1.2	OBJETIVOS	102

1.2.1	<i>Objetivo geral</i>	102
1.2.2	<i>Objetivos específicos</i>	102
2	MATERIAL E MÉTODOS	103
2.1	SELEÇÃO DOS AGROTÓXICOS USANDO O MODELO DE HEPATÓCITOS DE <i>O. niloticus</i>	103
2.2	CRIAÇÃO DOS EXEMPLARES DE <i>D. rerio</i> E COLETA DOS OVOS	104
2.3	TESTE DE TOXICIDADE	105
2.4	EXPOSIÇÃO DOS EMBRIÕES PARA AS ANÁLISES DE PROTEÔMICA, WESTERN BLOT E QUANTIFICAÇÃO DE ZINCO	105
2.5	EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNA TOTAL	106
2.6	WESTERN BLOT	106
2.7	PROTEÔMICA E FOSFOPROTEÔMICA	107
2.7.1	<i>Redução e alquilação</i>	107
2.7.2	<i>Digestão de proteínas</i>	108
2.7.3	<i>Dessalinização</i>	108
2.7.4	<i>Marcação de peptídeos, enriquecimento de fosfopeptídeos e fracionamento de amostras</i>	108
2.8	QUANTIFICAÇÃO DE ZINCO	110
2.9	TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS	110
3	RESULTADOS	112
3.1	SELEÇÃO DOS AGROTÓXICOS COM HEPATÓCITOS DE <i>O. niloticus</i> ..	112
3.1.1	<i>Viabilidade celular</i>	112
3.1.2	<i>Expressão gênica</i>	114
3.2	TESTE DE TOXICIDADE NAS LARVAS DE <i>D. rerio</i>	114
3.3	INDUÇÃO DA MT EM LARVAS DE <i>D. rerio</i>	115
3.4	QUANTIFICAÇÃO DO ZINCO	116
3.5	ANÁLISE PROTEÔMICA	116
3.6	ANÁLISE FOSFOPROTEÔMICA	122
4	DISCUSSÃO	127
4.1	A EXPOSIÇÃO DAS LARVAS DE <i>D. rerio</i> AO Cd E DDPV PODE CAUSAR DESEQUILÍBRIO DO SISTEMA ANTIOXIDANTE.....	127
4.2	A EXPOSIÇÃO DAS LARVAS DE <i>D. rerio</i> AO Cd INTERFERIU COM A HOMEOSTASE DO FERRO.....	128
4.3	OUTRAS POSSÍVEIS VIAS ALTERADAS PELO Cd E DDPV	129

5	CONCLUSÃO	131
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	132
	REFERÊNCIAS	134
	ANEXO 1 – CERTIFICADO DO CEUA/BIO-UFPR	149
	ANEXO 2 – PROTOCOLOS DETALHADOS-CAPÍTULO I	150
	ANEXO 3 – PROTOCOLOS DETALHADOS-CAPÍTULO II	159
	ANEXO 4 – PROTOCOLOS DETALHADOS-CAPÍTULO III	180
	ANEXO 5 – TABELA DE PROTEÍNAS REGULADAS	197
	ANEXO 6 – TABELA DE FOSFOPROTEÍNAS REGULADAS	203

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONTEXTUALIZAÇÃO

A população global ultrapassou 8 bilhões e as projeções sugerem que ela poderá crescer para cerca de 10,4 bilhões em 2100 (WORLD POPULATION PROSPECTS, 2022). Como consequência, as atividades humanas que produzem resíduos também aumentarão e contribuirão para o aumento da contaminação e consequente poluição dos ecossistemas, sendo que os ecossistemas aquáticos estão sujeitos a uma carga adicional de contaminantes e poluentes por serem o destino final destes (LYONS, 2014; WALTERS et al., 2011). Entre esses contaminantes e poluentes estão os metais, agrotóxicos e produtos usados na indústria, que podem persistir no solo, alimentos e água, expondo tanto a população humana como a biota, o que evidencia a importância de um monitoramento contínuo para permitir a tomada de decisões que permitam garantir a preservação desse recurso bem como a saúde humana e da biota (CARVALHO, 2006).

A avaliação da qualidade da água é um processo complexo, contínuo, com monitoramento regular em diferentes locais ao longo do tempo e que envolve diferentes etapas e métodos de análise. Com a avaliação é possível detectar mudanças, tendências e possíveis impactos ao longo do tempo, o que fornece informações para a gestão e proteção dos ecossistemas aquáticos e do consumo de água (ADAMS; GREELEY, 2000).

Existem várias abordagens e parâmetros que podem ser utilizados na avaliação da qualidade da água. Nesse contexto, para uma avaliação dos riscos de exposição em uma perspectiva holística, além da detecção química de contaminantes, bioindicadores e biomarcadores de contaminação aquática também são empregados (PARMAR et al., 2016; STRIMBU; TAVEL, 2010). Para o monitoramento por meio de bioindicadores são adotados dois níveis de organização biológica: o organismo e a população. O primeiro é útil para avaliar efeitos agudos de exposição, e o segundo para os efeitos crônicos, sendo que quanto maior é o conhecimento sobre a relação do organismo com o ambiente, melhor será o bioindicador (PARMAR et al., 2016). Já o monitoramento por meio de biomarcadores baseia-se em alterações biológicas em nível molecular, celular ou fisiológico (STRIMBU; TAVEL, 2010). Ao contrário de análises químicas convencionais, que medem diretamente a presença de contaminantes, os biomarcadores avaliam os efeitos desses contaminantes nos organismos vivos, podendo revelar danos moleculares, bioquímicos ou fisiológicos, e fornecendo informações sobre o estresse

ambiental e a saúde dos organismos expostos (STRIMBU; TAVEL, 2010). Os biomarcadores permitem um monitoramento integrado da qualidade da água, avaliando os efeitos simultâneos da exposição a múltiplos contaminantes e condições ambientais, e dessa forma podem fornecer uma visão abrangente dos impactos combinados e interações entre diferentes substâncias químicas presentes na água (AMORIM, 2003). Além disso, os biomarcadores podem ser altamente sensíveis e específicos para determinados contaminantes ou condições ambientais, contribuindo com a identificação da presença de contaminantes em concentrações muito baixas e até diferentes fontes de poluição, o que é especialmente útil quando há múltiplas fontes de poluição ou quando os efeitos de diferentes contaminantes precisam ser diferenciados (HOOK et al., 2014).

Dentre os possíveis biomarcadores de contaminação aquática em programas de biomonitoramento está a metalotioneína (MT). Em organismos como peixes a MT é considerada um tipo de proteína de estresse que é principalmente responsiva a metais (ATLI; CANLI, 2008; CHATTERJEE et al., 2016; NURSANTI et al., 2017; VIARENGO et al., 1999; YUDKOVSKI et al., 2008). Mas apesar dos metais constituírem os indutores mais comuns da MT, existem outros agentes capazes de induzir a síntese na célula, p. ex., xenobióticos como os agrotóxicos (BAUMAN et al., 1991; BAUMAN et al., 1992; CARVALHO et al., 2012; CEYHUN et al., 2012; ERDOĞAN et al., 2011; MOSLEH et al., 2005; THUMMABANCHA et al., 2016). Dessa forma, esse estudo propõe verificar a indução da MT em peixes por contaminantes ambientais para entender e validar essa proteína enquanto biomarcador de contaminação e poluição por metais.

1.2 HIPÓTESE

- Dentre as diferentes classes de contaminantes, alguns metais são indutores muito mais potentes da metalotioneína que outros compostos químicos potencialmente tóxicos em peixes, de modo que é possível identificar a classe de contaminantes baseado na expressão dessa proteína.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 *Objetivo geral*

- Avaliar o potencial de indução da metalotioneína em peixes por diferentes classes de contaminantes ambientais.

1.3.2 *Objetivos específicos*

- Implementar um modelo *in vitro*, de hepatócitos primários de *Oreochromis niloticus*, que permita avaliar a indução da MT;
- Comparar a indução da MT por metais usando ferramenta *in silico* com base em proteínas de *Danio rerio*, além de avaliar a expressão gênica e proteica da MT em hepatócitos primários de *Oreochromis niloticus*;
- Distinguir como agrotóxicos atuam na indução da MT em comparação com o mecanismo normalmente observado de indução da MT por metais.

1.4 DELINEAMENTO METODOLÓGICO

O delineamento metodológico do estudo está apresentado no fluxograma a seguir (FIGURA 1). Estão apresentados os títulos de cada etapa na primeira linha, na linha seguinte o que foi avaliado e na última os métodos utilizados.

FIGURA 1 – FLUXOGRAMA DAS ETAPAS I, II E III DO ESTUDO

Metalotioneína como biomarcador de contaminação aquática em peixes



FONTE: O autor (2023).

2 REVISÃO DA LITERATURA

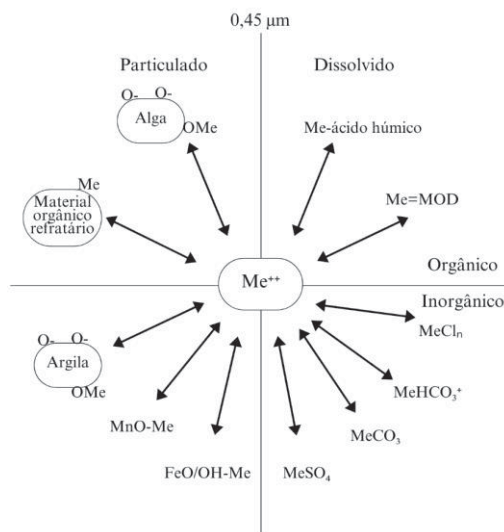
2.1 ECOTOXICOLOGIA AQUÁTICA

A ecotoxicologia aquática, subárea da toxicologia ambiental, é um campo de estudo interdisciplinar que investiga os efeitos dos poluentes e outros contaminantes nos ecossistemas aquáticos e na biota. Essa área de pesquisa é fundamental para avaliar os riscos ambientais e a saúde dos organismos marinhos e de água doce, bem como para entender os impactos das atividades humanas nos ecossistemas aquáticos. Por meio de abordagens experimentais e modelagem, é possível identificar respostas fisiológicas, comportamentais e ecológicas dos organismos expostos a diferentes níveis de contaminação, ajudando a estabelecer diretrizes para a proteção do ambiente e a tomada de decisões relacionadas à gestão sustentável dos recursos hídricos (CONNON et al., 2012).

2.2 CONTAMINAÇÃO DE ECOSSISTEMAS AQUÁTICOS POR METAIS

A mineração, a atividade industrial, o uso de agrotóxicos e fertilizantes e o descarte inadequado de resíduos são fontes comuns de metais pesados, como mercúrio, chumbo, cádmio e cobre, encontrados em corpos d'água. A erosão e lixiviação química dos solos e rochas são as principais fontes naturais dos metais presentes nos ecossistemas aquáticos e em menor escala, detritos de organismos e produtos de decomposição da matéria orgânica (TCHOUNWOU et al., 2012). Os metais estão presentes nos corpos d'água em diferentes formas, como íons livres, complexos orgânicos e inorgânicos e ligados a partículas (FIGURA 2).

FIGURA 2 – INTERAÇÃO ENTRE METAIS E SUBSTRATOS



NOTA: Desenho esquemático do equilíbrio entre íons metálicos livres e diferentes quelantes orgânicos e inorgânicos, incluindo ligantes particulados e dissolvidos. O termo "material dissolvido" se refere a qualquer substância que passa por um filtro com um tamanho de poro de $0,45 \mu m$. Nem todos os possíveis quelantes estão representados na figura. Sigla MOD representa a matéria orgânica dissolvida. A superfície de partículas inorgânicas (p. ex., partículas de argila, ferro e óxidos de manganês) e partículas orgânicas (p. ex., algas unicelulares) está dominada como grupos O^- . FONTE: Adaptado de Bjerregaard et al. (2015).

A presença de partículas inorgânicas, como argila, ferro e óxidos de manganês e partículas orgânicas e algas unicelulares, influencia na distribuição dos metais. A maioria dos metais é transportada ligada a partículas suspensas com diâmetro inferior a $100 \mu m$, sendo que, proporcionalmente, as concentrações mais altas são encontradas nas partículas menores devido ao aumento da relação superfície-volume. A interação dos metais com o sedimento é influenciada por uma série de fatores físico-químicos, como a composição do sedimento, o estado redox, a forma do metal e o conteúdo orgânico do sedimento, que afetam a transferência dos metais para a água e a biodisponibilidade, sendo que os metais biodisponíveis podem entrar na cadeia alimentar e causar danos a organismos aquáticos, afetando sua reprodução, crescimento e sobrevivência (BJERREGAARD et al., 2015; GOVIND; SHARMA, 2014).

2.3 NOMENCLATURA PARA METAIS NA TOXICOLOGIA AMBIENTAL

O termo "metais pesados" é amplamente usado na literatura científica voltada a área ambiental para descrever metais e metaloides associados à poluição ambiental, toxicidade e efeitos adversos na biota (ALI; KHAN, 2018; DUFFUS, 2002; POURRET; HURSTHOUSE, 2019). Como a definição tem sido variada, envolvendo densidade,

massa atômica relativa e número atômico, há questionamentos sobre a nomenclatura desses elementos (ALI; KHAN, 2018). Alguns consideram o termo sem sentido, impreciso e mal definido, defendendo o abandono de seu uso (DUFFUS, 2002; POURRET et al., 2021). Embora o termo em si possa ser adequado, o uso descuidado e inconsistente tem causado confusão quanto ao seu significado (ALI; KHAN, 2018).

Conforme proposto por Hübner et al. (2010), há soluções para evitar o uso impreciso do termo "metais pesados" na literatura científica. Algumas sugestões incluem formular uma única definição científica, embora seja improvável que seja adotada, devido à dificuldade em chegar a um acordo geral sobre critérios específicos, como massa atômica ou densidade. Tentativas anteriores resultam em uma definição ampla que inclui quase metade da tabela periódica (FIGURA 3). Outra sugestão é designar os dez elementos mais comumente considerados como "metais pesados" (Cr, Co, Ni, Cu, Zn, As, Cd, Sn, Hg e Pb) e os demais elementos como não pertencentes a essa categoria (HÜBNER et al., 2010). Alguns autores propõem substituir o termo "metais pesados" por termos como "elemento potencialmente tóxico", "elemento metálico traço", "metal" ou "metaloide" em estudos ambientais ou evitar o uso desse termo genérico e se referir simplesmente a "metais" ou "elementos" (DUFFUS, 2002; POURRET et al., 2021).

FIGURA 3 – TABELA PERIÓDICA COM METAIS PESADOS EM DESTAQUE

1																	2																																																												
H																	He																																																												
3	4											5	6	7	8	9	10																																																												
Li	Be											B	C	N	O	F	Ne																																																												
11	12											13	14	15	16	17	18																																																												
Na	Mg											Al	Si	P	S	Cl	Ar																																																												
19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36																																																												
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr																																																												
37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54																																																												
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I	Xe																																																												
55	56	57	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86																																																												
Cs	Ba	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At	Rn																																																													
87	88	89	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116																																																														
Fr	Ra	Rf	Db	Sg	Bh	Hs	Mt	Ds	Rg																																																																				
<table border="1"> <tbody> <tr> <td>57</td> <td>58</td> <td>59</td> <td>60</td> <td>61</td> <td>62</td> <td>63</td> <td>64</td> <td>65</td> <td>66</td> <td>67</td> <td>68</td> <td>69</td> <td>70</td> <td>71</td> </tr> <tr> <td>La</td> <td>Ce</td> <td>Pr</td> <td>Nd</td> <td>Pm</td> <td>Sm</td> <td>Eu</td> <td>Gd</td> <td>Tb</td> <td>Dy</td> <td>Ho</td> <td>Er</td> <td>Tm</td> <td>Yb</td> <td>Lu</td> </tr> <tr> <td>89</td> <td>90</td> <td>91</td> <td>92</td> <td>93</td> <td>94</td> <td>95</td> <td>96</td> <td>97</td> <td>98</td> <td>99</td> <td>100</td> <td>101</td> <td>102</td> <td>103</td> </tr> <tr> <td>Ac</td> <td>Th</td> <td>Pa</td> <td>U</td> <td>Np</td> <td>Pu</td> <td>Am</td> <td>Cm</td> <td>Bk</td> <td>Cf</td> <td>Es</td> <td>Fm</td> <td>Md</td> <td>No</td> <td>Lr</td> </tr> </tbody> </table>																		57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	La	Ce	Pr	Nd	Pm	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb	Lu	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	Ac	Th	Pa	U	Np	Pu	Am	Cm	Bk	Cf	Es	Fm	Md	No	Lr
57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71																																																															
La	Ce	Pr	Nd	Pm	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb	Lu																																																															
89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103																																																															
Ac	Th	Pa	U	Np	Pu	Am	Cm	Bk	Cf	Es	Fm	Md	No	Lr																																																															

NOTA: Os metais e alguns metaloides incluídos no termo “metais pesados” de acordo com Appenroth (2010) estão destacados. Adaptado de Appenroth (2010).

No presente estudo, foi optado por continuar usando o termo “metal pesado” como definição para os dez elementos mais comumente considerados como "metais pesados": Cr, Co, Ni, Cu, Zn, As, Cd, Sn, Hg e Pb, como sugere Hübner et al. (2010).

Embora seja uma abordagem básica e arbitrária, ela pode proporcionar uniformidade e um entendimento mútuo, ainda que inclua os metaloides.

2.4 REALIDADE BRASILEIRA EM RELAÇÃO A CONTAMINAÇÃO DE ECOSISTEMAS AQUÁTICOS POR METAIS

O Brasil detém reservas naturais consideráveis de minérios de significância industrial, abrangendo elementos como alumínio, cobre, cromo, estanho, ferro, manganês, nióbio, níquel, vanádio, zinco e ouro (ANUÁRIO MINERAL BRASILEIRO, 2020). Ao mesmo tempo, o país enfrenta uma série de desafios ligados à desigualdade social e a falhas em relação a preservação ambiental, o que facilita a contaminação dos ecossistemas brasileiros por metais pesados, provenientes de diversas fontes (ELLWANGER; CHIES, 2023). Além das possíveis fontes de metais já citadas anteriormente: mineração, atividade industrial, uso de agrotóxicos e fertilizantes e descarte inadequado de resíduos, o Brasil também enfrenta problemas relacionados ao garimpo ilegal e derramamentos de rejeitos ricos em metais, decorrentes de rompimento de barragens de minas (ELLWANGER; CHIES, 2023; MARTINS; TAKAHASHI, 2022).

O primeiro derramamento, evento que ficou conhecido como “O desastre de Mariana”, aconteceu em 2015, com o rompimento da barragem do Fundão, pertencente a uma empresa mineradora situada na cidade de Mariana, Minas Gerais, Brasil (MARTINS; TAKAHASHI, 2022). 39,2 milhões de metros cúbicos de rejeitos atingiram a bacia do Rio Doce, causando impactos na vida aquática e terrestre ao longo das margens do rio e impactando diretamente 36 municípios, de forma que muitos especialistas e instituições consideram esse evento como o maior desastre ambiental já registrado no país, além de ser o maior incidente global envolvendo barragens de rejeitos. O segundo derramamento, evento que ficou conhecido como “O desastre de Brumadinho”, aconteceu em 2019, com o rompimento da barragem B1 no município de Brumadinho, Minas Gerais, Brasil e foi menor em proporção, mas ainda causando danos irreparáveis para os ecossistemas aquáticos e terrestres (MARTINS; TAKAHASHI, 2022).

2.5 BIOMARCADORES E A METALOTIONEÍNA

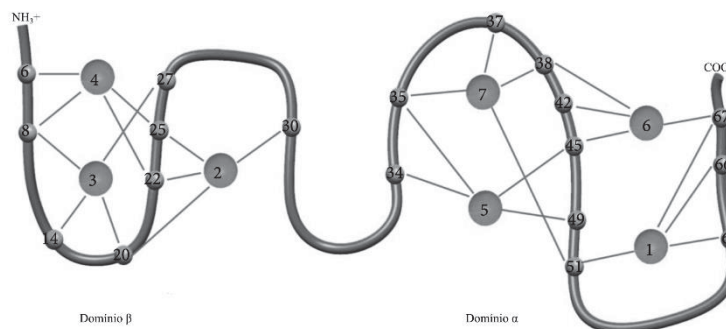
Biomarcador é qualquer substância, estrutura ou processo que possa ser quantificado no organismo ou em seus metabólitos em diferentes níveis de organização biológica, podendo assim prever a incidência de alterações ou doença (STRIMBU; TAVEL, 2010). Em termos moleculares, os biomarcadores podem ser avaliados por meio de diferentes metodologias baseadas em análises do DNA, perfil de expressão do RNA, proteico ou metabólico (HARIHARAN et al., 2016). Podem ser utilizados para extrapolar da unidade viva (célula) ou organismo permitindo uma abordagem ecológica do risco de exposição ambiental (LIVINGSTONE, 1993).

O uso de biomarcadores na ecotoxicologia e avaliação do risco ambiental enfrenta algumas limitações, pois em geral, eles servem como marcadores de exposição e não de efeito, e com isso novos estudos são necessários para estabelecer relações quantitativas entre os biomarcadores e o risco de efeitos adversos. Além disso, biomarcadores também têm suas limitações na ecotoxicologia devido à dificuldade de extrapolar seus sinais do nível individual para níveis organizacionais superiores e à falta de conhecimento sobre seu significado ecológico específico. Enquanto técnicas moleculares como genômica, proteômica e metabolômica têm sido usadas com sucesso para desenvolver potenciais biomarcadores na avaliação de risco para a saúde humana, o progresso na avaliação de risco ecológico é limitado pelo baixo grau de sequenciamento em muitas espécies-chave. Portanto, é necessário avançar nesse campo para uma melhor compreensão dos impactos dos contaminantes no meio ambiente (BJERREGAARD et al., 2015).

Uma proteína que vem sendo indicada como biomarcador de contaminação por metais é a metalotioneína (MT), proteína de baixo peso molecular, tipicamente 6 kDa, que desempenha um importante papel na homeostase e destoxificação de metais em muitos organismos (ROESIJADI, 1992). A primeira proteína apresentando as características das MTs foi detectada no córtex renal do cavalo (MARGOSHES; VALLEE, 1957). Essas proteínas apresentam características específicas, como alto teor de cisteínas, ausência de elementos de estrutura secundária, ausência de resíduos de aminoácidos aromáticos, arranjo característico de resíduos de cisteína (Cys-X-Cys ou Cys-X-X-Cys) e alto teor de metais (FIGURA 4). Todos os resíduos de cisteína estão envolvidos na formação de complexos metal-tiolato organizados em dois domínios: o domínio β do terminal amino, incluindo nove cisteínas e três equivalentes metálicos, e o

domínio α do terminal carboxi, com onze cisteínas e quatro equivalentes metálicos (KÄGI et al., 1979; KÄGI; VALEE, 1960).

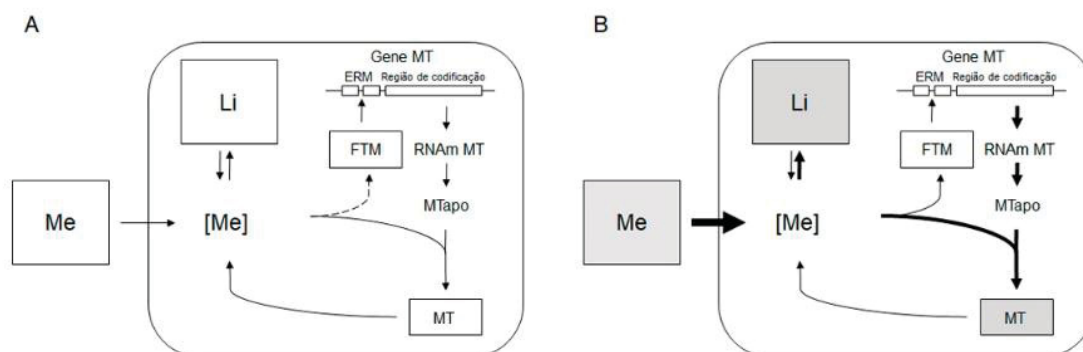
FIGURA 4 – ESTRUTURA SIMPLIFICADA DA METALOTIONEÍNA



NOTA: Domínio β encontra-se localizado na região N-terminal da proteína. O domínio α está localizado na região C-terminal. FONTE: Adaptado de Yuan et al. (2021).

Roesijadi (1992) descreveu a indução da síntese de MTs pelos metais: a transcrição do gene das MTs depende da concentração intracelular de metais, sendo controlada pelas interações entre fatores de transcrição metálica (FTM) e elementos de regulação metálica (ERM). O zinco (Zn) apresenta um papel fundamental ao se ligar ao FTM, deixando-o ativo e com a possibilidade de interação com as sequências dos ERMs do promotor de MT, que ativa a transcrição. Outros metais não agem diretamente nos fatores que controlam a transcrição, mas por apresentarem grande afinidade pelos ligantes do Zn, substituem esse metal, gerando aumento da concentração de Zn intracelular e deixando-o livre para se ligar ao FTM (FIGURA 5). Podem existir algumas particularidades nesse mecanismo geral dependendo da espécie. A mobilidade de Zn, p. ex., é maior para MT de peixe do que para MT de camundongo, com uma diferença na reatividade (CAPASSO et al., 2003).

FIGURA 5 – VIA DE SÍNTESE DA METALOTIONEÍNA



NOTA: Via de síntese da MT em estado não induzido (A) e induzido por metal (B). MT - metalotioneína; ERM - elementos de regulação metálica; FTM - fator de transcrição metálica; Me - metal; Li - ligantes. No estado não induzido, a síntese de MT é baixa. No estado induzido, os metais, por apresentarem alta afinidade pelos ligantes do zinco (Zn), substituem o mesmo, liberando o Zn intracelular que se liga ao FTM. O FTM ativo pode então interagir com as sequências dos ERM do promotor do gene da MT, aumentando a taxa de transcrição e, conseqüentemente, da síntese da MT. Adaptado de Serafim (2004).

Estudos vêm mostrando que a MT pode ser usada como biomarcador de contaminação aquática por metais em programas de biomonitoramento, pois é uma proteína de estresse principalmente responsiva a metais em organismos como os peixes (ATLI; CANLI, 2008; CHATTERJEE et al., 2016; NURSANTI et al., 2017; VIARENGO et al., 1999; YUDKOVSKI et al., 2008).

2.6 HEPATÓCITOS DE *Oreochromis niloticus* E LARVAS DE *Danio rerio* COMO MODELOS EXPERIMENTAIS

Diferentes espécies de peixes podem ser usadas no monitoramento do potencial tóxico e na avaliação qualitativa e quantitativa de efluentes quanto à presença de contaminantes, sendo que a seleção de espécies está principalmente relacionada à presença no local de estudo (KADIM; RISJANI, 2022; STEGEMAN et al., 2010).

Oreochromis niloticus (tilápia), que foi introduzida no Brasil na década de 70, é útil para uso como modelo experimental devido a características como resistência a diferentes sistemas de manejo, doenças e alta densidade no cultivo, ao rápido crescimento e a facilidade de obtenção em pisciculturas (VICENTE et al., 2014). Embora a MT possa ser expressa em outros órgãos, o fígado é crucial quando se trata de destoxificação de metais (CHATTERJEE et al., 2016). Linhagens celulares e hepatócitos primários são os principais modelos de testes *in vitro* de toxicidade hepática, com vantagens e desvantagens. Hepatócitos primários são particularmente úteis considerando que são mais

sensíveis e poderiam apresentar respostas ambientalmente mais relevantes (SOLDATOW et al., 2013).

Danio rerio (zebrafish ou paulistinha) vem sendo usado em toda a toxicologia ambiental, e há um enorme potencial para esse uso crescer (STEGEMAN et al., 2010). Considerando a produção de ovos em larga escala e o rápido desenvolvimento, que permitem uma avaliação mais rápida da toxicidade em um sistema inteiro, larvas de *D. rerio* têm sido consideradas um excelente modelo para investigar os mecanismos de ação de poluentes ambientais (BAMBINO et al., 2019).

CAPÍTULO I

CULTIVO PRIMÁRIO DE HEPATÓCITOS DE *Oreochromis niloticus* COMO FERRAMENTA NA TOXICOLOGIA AMBIENTAL

RESUMO

Estudos de avaliação de risco sobre a poluição aquática, uma ameaça à qualidade da água e à biota aquática, geralmente dependem da captura e experimentação com animais. No entanto, preocupações éticas em torno do uso de animais levaram ao desenvolvimento e uso de métodos alternativos. O presente estudo estabeleceu o cultivo primário de hepatócitos de *Oreochromis niloticus* como uma ferramenta *in vitro* para a triagem de contaminantes ambientais, com foco no Cádmio (Cd) como poluente. Os hepatócitos isolados foram cultivados usando uma mistura dos meios L15/F12 suplementados com soro fetal bovino e insulina. Várias condições de congelamento foram testadas para a preservação das células. Os hepatócitos cultivados foram expostos a 0,5, 5 e 50 μM de Cd para avaliar a viabilidade celular, os níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs) e moléculas antioxidantes. Foi observada uma redução dependente da concentração e tempo de exposição na viabilidade celular após a exposição ao Cd. A exposição ao Cd induziu um desequilíbrio no sistema de defesa antioxidante, levando ao aumento dos níveis de EROs e peroxidação lipídica. Esses achados validam a toxicidade do Cd para hepatócitos primários e confirmam a aplicabilidade de biomarcadores comumente usados em estudos de avaliação de risco e ecotoxicologia usando animais. A replicação bem-sucedida do uso desses biomarcadores em cultivo primário de hepatócitos fornece uma alternativa ética para reduzir os testes em animais na ecotoxicologia aquática. O estudo destaca o potencial do cultivo primário de hepatócitos como uma ferramenta *in vitro* para avaliar a toxicidade de contaminantes ambientais e apoia a integração de cultivo primário de hepatócitos em futuros estudos de avaliação de risco ambiental, o que pode promover o gerenciamento sustentável dos recursos hídricos e reduzir a dependência da experimentação animal.

Palavras-chave: Cultivo de células. Fígado. Tilápia do Nilo. Cádmio. Modelo *in vitro*.

ABSTRACT

Risk assessment studies on aquatic pollution, a threat to water quality and aquatic biota, often rely on animal capture and experimentation. However, ethical concerns surrounding animal use have prompted the development and use of alternative methods. This study investigates the viability of primary hepatocyte cultures from *Oreochromis niloticus* as an *in vitro* tool for environmental contaminant screening, focusing on Cadmium (Cd) as a pollutant. Isolated hepatocytes were cultured on plates using a mixture of supplemented L15/F12 media. Various freezing conditions were tested for cell stock preservation. The cultured hepatocytes were exposed to 0.5, 5, and 50 μM of Cd to assess cell viability, reactive oxygen species (ROS), reactive nitrogen species (RNS), and antioxidant molecules. Results demonstrated a concentration and time-dependent decrease in cell viability upon Cd exposure. Cd exposure induced an imbalance in the antioxidant defense system, leading to increased ROS levels and lipid peroxidation. These findings validate the toxicity of Cd to primary hepatocytes and confirm the applicability of commonly used biomarkers in animal-based ecotoxicology and risk assessment studies. The successful replication of these biomarkers in primary hepatocyte cultures provides an ethical alternative to reduce animal testing in ecotoxicology. The study highlights the potential of primary hepatocyte cultures as an *in vitro* tool for evaluating the toxicity of environmental contaminants. By advancing research practices, this study supports the integration of primary hepatocyte cultures in future environmental risk assessment studies, promoting sustainable water resource management while reducing reliance on animal experimentation.

Keywords: Cell culture. Liver. Nile tilapia. Cadmium. *in vitro* model.

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONTEXTUALIZAÇÃO

O aumento da população humana e a expansão das atividades agrícolas e industriais ao longo dos anos levaram ao acúmulo de contaminantes nos ecossistemas aquáticos (LYONS, 2014; WALTERS et al., 2011), como metais, agrotóxicos e produtos que podem persistir no solo, alimentos e água (CARVALHO, 2006). Considerando a complexidade dos ecossistemas aquáticos, a análise química isolada pode não representar o real potencial tóxico dos contaminantes e poluentes (BOLIS et al., 2001). Conseqüentemente, o uso de sistemas biológicos é necessário para determinar o nível seguro de resíduos despejados em rios, lagos e mares (BOLIS et al., 2001). Os peixes podem fornecer um excelente modelo para servir a esse propósito, pois são vertebrados que vivem todas as fases da vida na água (BOLIS et al., 2001; ZHOU et al., 2019).

Historicamente, estudos toxicológicos e ecotoxicológicos têm usado testes em animais, mas cultivo primário e linhagens celulares surgiram como boas ferramentas eticamente aceitas (SCOTT; MINGHETTI, 2020). No entanto, como apontam SCOTT e MINGHETTI (2020), o uso de alternativas depende do desenvolvimento de ensaios *in vitro* eficientes e de baixo custo. Ensaio *in vitro* úteis são geralmente aqueles que dependem de órgãos, tecidos ou células com alta relevância *in vivo* em toxicologia, como o fígado e o intestino delgado (SCOTT; MINGHETTI, 2020).

O fígado é o primeiro órgão interno dos vertebrados a entrar em contato com produtos químicos provenientes de alimentos e da água (YANG et al., 2014) e, portanto, pode ser afetado adversamente por exposições químicas agudas e crônicas (ZHOU et al., 2019). Assim, linhagens e hepatócitos primários são modelos *in vitro* validados. Os hepatócitos primários são particularmente úteis, pois são mais sensíveis e tendem a apresentar respostas ambientalmente mais relevantes do que as linhagens celulares, que podem perder algumas características fenotípicas e funcionais do tecido hepático ao longo do tempo em cultivo (SOLDATOW et al., 2013).

Considerando os contaminantes e poluentes presentes no ambiente aquático, os níveis de metais pesados são frequentemente uma preocupação (FILIPÍČ, 2012; GOVIND; SHARMA, 2014; TCHOUNWOU et al., 2012). Embora esses elementos possam ter origem natural, a fonte mais relevante em muitos ecossistemas aquáticos deriva de atividades humanas, como a exploração e processamento de minérios, efluentes

domésticos e industriais, queima de combustíveis fósseis e lixiviação de bacias hidrográficas que arrastam produtos utilizados na agricultura (TCHOUNWOU et al., 2012). Traços de metais podem se acumular em organismos vivos quando são absorvidos e armazenados mais rapidamente do que excretados (GOVIND; SHARMA, 2014).

Dentre os metais presentes nos ecossistemas aquáticos, o cádmio (Cd) é altamente tóxico mesmo em baixas concentrações e ainda é amplamente utilizado na fabricação de baterias e fertilizantes (DALA-PAULA et al., 2018; FILIPIČ, 2012). O Cd está presente de forma ubíqua no meio ambiente, com valor máximo permitido no lançamento de efluentes de $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ de acordo com a Resolução CONAMA nº 397 e, com concentração máxima diária variando de $0,0172$ a $1,2 \text{ mg L}^{-1}$, dependendo da fonte, de acordo com a Agência de Proteção Ambiental Americana - EPA (banco de dados ELG, 2022). Ainda, Naka et al. (2020) relataram níveis elevados de Cd (média e mediana dos níveis sanguíneos de Cd: $0,27$ e $0,43 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) em pessoas próximas à área industrial na Amazônia (Brasil). Devido a essas razões ambientais ou ocupacionais, o Cd é um importante metal de interesse toxicológico que se acumula no fígado devido a exposições de curto e longo prazo (RENU et al., 2021).

Oreochromis niloticus (tilápia do Nilo) pode ser um modelo de peixe tropical bastante relevante para estudos experimentais, uma vez que a espécie não corre risco de extinção, é resistente a muitas doenças e geralmente está disponível em pisciculturas (VICENTE et al., 2014). Além disso, o estabelecimento de um protocolo para o uso de cultivos celulares primários reduz a necessidade de testes em animais em estudos de toxicidade e atende às preocupações éticas associadas à experimentação animal, permitindo obter dados toxicológicos relevantes, que estão alinhados com os princípios dos 3Rs (*Replacement, Reduction and Refinement*) em pesquisas com animais. O uso desse tipo de modelo pode ser valioso para realizar triagem de alto rendimento e compreensão mecanicista de como os compostos químicos podem ser prejudiciais à saúde. Portanto, o presente estudo teve como objetivo implementar o cultivo primário de hepatócitos de *O. niloticus* como um modelo *in vitro* para triagem de contaminantes e poluentes ambientais, usando o metal Cd como poluente-teste.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 *Objetivo geral*

- Implementar um modelo *in vitro*, de hepatócitos primários de *Oreochromis niloticus*, que permita avaliar a indução da MT.

1.2.2 *Objetivos específicos*

- Testar e ajustar os procedimentos de isolamento e cultivo de hepatócitos de *O. niloticus* disponíveis na literatura para as condições do laboratório;
- Selecionar as melhores condições para o cultivo dos hepatócitos de *O. niloticus*;
- Avaliar a citotoxicidade e a resposta do sistema antioxidante nos hepatócitos expostos a um poluente-teste (cádmio).

2 MATERIAL E MÉTODOS¹

2.1 OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DOS PEIXES

Exemplares de *O. niloticus* foram obtidos de piscicultura no município de Araucária (Brasil) e mantidos em tanque com água filtrada, aeração constante e alimentação a cada 2 dias. Em seguida, exemplares em jejum de 2 dias foram anestesiados com MS222 0,02% (Tricáina metanossulfonato, Sigma-Aldrich) em água, e mortos por seção da medula espinhal logo abaixo da cabeça. Todos os procedimentos foram submetidos, aprovados e certificados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR) com o certificado número 1286 (ANEXO 1).

2.2 ISOLAMENTO, CULTIVO E CONGELAMENTO DE CÉLULAS HEPÁTICAS

O isolamento e cultivo das células de fígado de *O. niloticus* foram realizados utilizando um protocolo adaptado de outros estudos, mostrados na TABELA 1 (DONG et al., 2021; GRÖNER et al., 2015; JIAO et al., 2020; JUNG'A et al., 2005; KIM; TAKEMURA, 2003; LIU et al., 2007; THANGARAJ et al., 2018; ZHOU et al., 2006).

¹ Para protocolos detalhados, consulte o anexo 2.

TABELA 1 – PARÂMETROS PARA CULTIVO PRIMÁRIO DE HEPATÓCITOS DE *O. niloticus* UTILIZADOS EM ESTUDOS ANTERIORES

Autores	Peso do exemplar	Meio de cultivo e suplementação	Perfusão	Condições básicas de cultivo	Armazenamento das células (congelamento)	Material específico para cultivo primário
Kim e Takemura (2003)	200-400 g	L-15, WE e M199 Suplementação: NaHCO ₃	Sim, após excisão do fígado com collagenase (0,3 mg mL ⁻¹)	Densidade: 2.1×10 ⁵ /cm ² 23, 28 e 30°C e 4% de CO ₂	Não	Sim
Jung'a et al. (2005)	Não descrito	DMEM/F-12 Suplementação: SFB	Sim, após excisão do fígado com collagenase (0,5 mg mL ⁻¹)	Densidade: 1.3×10 ⁵ /cm ² 25°C e 5% de CO ₂	Não	Sim
Zhou et al. (2006)	60–150 g	L-15 Suplementação: NaHCO ₃ , insulina, transferrina, selênio	Não. Digestão com collagenase (1 mg mL ⁻¹)	Densidade: 3.6×10 ⁵ /cm ² 25°C e ar	Não	Sim
Liu et al. (2007)	50–100 g	DMEM/F12 Suplementação: NaHCO ₃ , HEPES, insulina, transferrina, selênio	Não. Digestão com collagenase (1 mg mL ⁻¹)	Densidade: 3.6×10 ⁵ /cm ² Não descrito	Não	Sim
Gröner et al. (2015)	100-200 g	MEM Suplementação: Não	Sim, antes da excisão do fígado com collagenase D and H (0,25 mg mL ⁻¹)	Densidade: Não ficou claro 20°C e ar	Não	Não descrito
Thangaraj et al. (2018)	Não descrito	L-15 Suplementação: SFB	Não. Digestão com collagenase IV (500 U mL ⁻¹)	Densidade: Não descrito 28°C	Não	Não descrito
Jiao et al. (2020)	900-1000 g	DMEM Suplementação: SFB	Não. Digestão com collagenase IV (1 mg mL ⁻¹)	Densidade: Não ficou claro 28°C e 5% de CO ₂	Não	Não descrito
Dong et al. (2021)	90-110 g	DMEM Suplementação: Não	Não. Digestão com collagenase (1 mg mL ⁻¹)	Densidade: Não ficou claro Não descrito	Não	Não descrito

FONTE: O autor (2023).

Após a eutanásia, os peixes foram limpos com clorexidina alcoólica 2% e a cavidade corporal foi aberta com bisturi. O fígado foi extraído, mantido em placa de Petri e perfundido diretamente com PBS-EDTA (tampão fosfato salino com ácido etilenodiaminotetracético 2,5 mM, pH 7,6), utilizando uma seringa de 20 mL e agulha 22g para a retirada do sangue. O órgão foi cortado em pequenos pedaços (~2 mm³) usando um bisturi e pinça, e então os pedaços foram transferidos para um tubo de centrífuga de 50 mL com 20 mL de tampão (NaCl 136,9 mM, KCl 5,4 mM, MgSO₄ 0,81 Mm, KH₂PO₄ 0,44 mM, Na₂HPO₄ 0,33 mM, NaHCO₃ 5,0 mM, pH 7,6) contendo 0,3 mg mL⁻¹ de colagenase IV (Sigma-Aldrich, ref. C5138), incubado por 30 min a 25° C e homogeneizado por 10 min usando uma pipeta *Pasteur* com a ponta cortada para aumentar o diâmetro. A suspensão celular foi filtrada em peneira de aço inoxidável com malha de 100 µm, centrifugada a 50 g por 3 min em temperatura ambiente e lavada duas vezes em meio de cultivo L15 suplementado com 100 unidades mL⁻¹ de penicilina, 0,1 mg mL⁻¹ de estreptomicina, e 0,25 µg mL⁻¹ de anfotericina B (Sigma-Aldrich, ref. A5955). As células foram cultivadas em placas de cultivo de 96 e 6 poços (2,1x10⁵ e 3,1x10⁵ células por cm², respectivamente) com uma mistura de L15 (85%, Gibco, ref. 41300-021) e F12 (15%, Gibco, ref. 21700-026) suplementado com 0,075 g L⁻¹ de NaHCO₃, (Exodus, ref. BS06129RA), HEPES 7,5 mM (ácido 2-[4-(2-hidroxi-etil)piperazin-1-il]etanossulfônico, Sigma- Aldrich, ref. H4034), 0,01 mg mL⁻¹ de insulina (Sigma-Aldrich, ref. I6634), soro fetal bovino (5%, SFB, Gibco, ref. 12657029), 10 unidades mL⁻¹ de penicilina, 0,01 mg mL⁻¹ de estreptomicina e 0,025 µg mL⁻¹ de anfotericina B, e cultivadas por até 3 dias a 25°C.

Para definir a melhor composição do meio de cultivo, foram testadas as seguintes composições: 1) L15, antibióticos e antimicótico; 2) L15, antibióticos, antimicótico e 2% de SFB; 3) L15, antibióticos, antimicótico e 5% de SFB; 4) DMEM 85% (Cultilab, ref. 1599), F12 15%, antibióticos, antimicótico, 5% de SFB e 0,01 mg mL⁻¹ de insulina; 5) L15 42,5%, DMEM 42,5%, F12 15%, antibióticos, antimicótico, 5% de SFB e 0,01 mg mL⁻¹ de insulina e 6) L15 85%, F12 15%, antibióticos, antimicótico, 5% de SFB e 0,01 mg mL⁻¹ de insulina. Além disso, foram testadas placas de cultivo de células comuns de diferentes marcas (Corning®, Costar®, Biofil®, Kasvi®, TPP®, Sarstedt®).

Diferentes condições de congelamento também foram testadas (HEWITT; LI, 2015): 1) DMSO 10% + SFB 90% (Mix 1), 2) DMSO 20% + SFB 80% (Mix 2), 3) DMSO 10% + SFB 50% + L15 40% (mistura 3) e 4) DMSO 20% + SFB 40% + L15 40% (mistura 4). Células recém-extraídas foram armazenadas em duas condições: *ultrafreezer*

(-80°C) e nitrogênio líquido por duas semanas. Todo o processo de congelamento foi realizado da seguinte forma: 1) primeiro, as células permaneceram a -20 °C para congelamento lento por 2 h; 2) após esse período, o material foi colocado em *ultrafreezer* ou nitrogênio líquido para o devido congelamento. Após o descongelamento, a viabilidade celular foi avaliada usando ensaio do azul de tripan (Sigma-Aldrich, ref. T8154).

2.3 MORFOLOGIA

As células do fígado foram cultivadas em lâminas circulares, colocadas nos poços de placas de 24 poços, por 6 dias a uma densidade de $3,1 \times 10^5$ células por cm^2 , depois foram fixadas com paraformaldeído 4% (Sigma-Aldrich, ref. P6148) em PBS por 30 min à temperatura ambiente.

2.3.1 *Microscopia eletrônica de varredura (MEV)*

Após fixação, as células foram desidratadas com etanol 100%, submetidas ao ponto crítico (secagem em CO_2 líquido) e metalizadas com ouro para observação em microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-6360LV.

2.3.2 *Microscopia de fluorescência*

Após a etapa de fixação, as células foram permeabilizadas com Triton-X 0,2% em PBS por 10 min, lavadas uma vez com PBS, incubadas com DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindole $5 \mu\text{g mL}^{-1}$, Sigma-Aldrich, ref. D1306) por 1 min e com faloidina-FITC ($66 \mu\text{M}$, Life Technologies, ref. F432) por 20 min. As lâminas foram montadas em resina *Fluormount* (EMS, ref. 17984) e, em seguida, as imagens foram capturadas em microscópio confocal (microscópio Nikon Eclipse Ti, Japão).

2.4 EXPOSIÇÃO AO CÁDMIO

Para testar o modelo experimental, foram selecionadas concentrações de cádmio potencialmente citotóxicas (0,5, 5 e $50 \mu\text{M}$). Estoques de Cd concentrados (1.000x) foram preparados em água esterilizada. Após determinação das melhores condições de cultivo,

as células do fígado foram isoladas e cultivadas por 3 dias. Em seguida, o meio de cultivo contendo Cd (ou água no caso do grupo controle) foi adicionado aos poços, e as células foram cultivadas por 24, 48 e 72 h a 25°C.

2.5 ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR

Para os ensaios de viabilidade, as células do fígado foram cultivadas em placas de cultivo celular de 96 poços a uma densidade de $2,1 \times 10^5$ células por cm^2 , expostas ao Cd por 24, 48 e 72 h e, em seguida, avaliadas quanto ao metabolismo do MTT (MOSMANN, 1983; REILLY et al., 1998), retenção de vermelho neutro (SVENDSEN et al., 2004) e adesão celular (GILLIES et al., 1986; VEGA-AVILA; PUGSLEY, 2011).

2.5.1 *Metabolismo do MTT*

Após o tempo de exposição de 24, 48, 72 h, foi adicionado ao poço a solução de MTT (Amresco, ref. 0793), concentração final de $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$, e os hepatócitos foram incubados por 2 h a 25 °C. Depois foi removido o meio de cultura e adicionado 100 μL de DMSO (Synt, ref. D1011.01BJ) para dissolver os cristais. Por fim, foi medida a absorvância a 540 nm.

2.5.2 *Retenção do vermelho neutro e adesão celular*

Foi usado um protocolo em que é possível fazer os dois ensaios na mesma placa de hepatócitos expostos. Após o tempo de exposição, foi adicionado ao meio a solução de vermelho neutro (Sigma-Aldrich, ref. N4638), concentração final de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. Após incubação por 2 h a 25°C, o meio foi removido, em seguida adicionado solução de extração e fixação (ácido acético a 1% e etanol a 50%) e a placa agitada até a homogeneização. Então foi medida a absorvância a 540 nm. Em seguida a solução foi removida e adicionada uma solução de $0,25 \text{ mg mL}^{-1}$ de cristal violeta (Millipore, ref. 1159400025) em água destilada. Depois de 10 min, a solução de cristal violeta foi removida e os poços lavados duas vezes com água destilada. Para a extração do corante, foi adicionado ácido acético (Synth, ref. A101901BJ) 33% e a placa foi agitada até a homogeneização. Por fim, foi feita medida a absorvância a 570 nm.

2.6 BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS

Para os ensaios de enzimas antioxidantes e tióis não proteicos (TNP), as células foram cultivadas em placas de cultivo de 6 poços em uma densidade de $3,1 \times 10^5$ células por cm^2 . Após a exposição ao Cd, as células foram removidas com um raspador de células (*cell scraper*), centrifugadas a 50 g por 3 min, e o *pellet* foi armazenado em *ultrafreezer*. Para análise, as células foram ressuspensas em tampão Tris-EDTA (Tris-HCl 20 mM, EDTA 1 mM, pH 7,4) contendo fluoreto de fenilmetilsulfonil 1 mM (PMSF, Sigma-Aldrich, ref. 93482) e β -mercaptoetanol 0,01% (Fluka, ref. 63689), seguida de centrifugação a 12000 g por 20 min a 4 °C. O conteúdo de proteína foi medido a 595 nm usando o sobrenadante (10 μL) e reagente de Bradford (250 μL) misturados em uma microplaca de 96 poços (BRADFORD, 1976). Os níveis de proteína do lisado foram calculados com base em uma curva padrão de albumina de soro bovino (BSA), e ajustados para $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ para determinação da atividade enzimática.

Para quantificar os níveis de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e peroxidação lipídica, as células foram cultivadas em placas de cultivo celular de 96 poços na densidade de $2,1 \times 10^5$ células por cm^2 . Após a exposição ao Cd, os ensaios foram realizados.

2.6.1 Enzimas antioxidantes

2.6.1.1 Atividade de superóxido dismutase (SOD)

O sobrenadante (30 μL , $1,0 \text{ mg}$ de proteína mL^{-1}) ou tampão (Tris-HCl 20 mM, EDTA 1 mM, pH 7,4, para o branco) e 70 μL de cloreto azul de nitrotetrazólio (NBT 572 μM em EDTA 0,1 mM, Acros organics, ref. 128590010) foram misturados em uma microplaca de 96 poços. Em seguida, foram adicionados 100 μL de cloreto de hidroxilamina (cloreto de hidroxilamina 51 mM em carbonato de sódio 0,5 M, pH 10,2, Acros organics, ref. 270102500). A redução de NBT por $\text{O}_2^{\cdot-}$ para azul de formazan foi medida a 560 nm por 30 min. Uma unidade de SOD foi definida como a atividade enzimática capaz de inibir a redução do NBT para 50% da taxa de referência (CROUCH et al., 1981; KONO, 1978).

2.6.1.2 Atividade de glutathiona S-transferase (GST)

O sobrenadante (20 μL , 1,0 mg de proteína mL^{-1}) e 180 μL do meio de reação (glutathiona 1,5 mM (GSH, Vetec, ref. 1843) e 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno 2,0 mM (CDNB, Sigma -Aldrich, ref. C6396) em tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,5) foram adicionados em uma microplaca de 96 poços e a absorvância foi medida a 340 nm por 5 min. O coeficiente de extinção molar para CDNB ($9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) foi usado para calcular a atividade da GST (KEEN et al., 1976).

2.6.1.3 Atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH)

O sobrenadante (30 μL , 1,0 mg de proteína mL^{-1}) e 170 μL do meio de reação (NADP⁺ a 1 mM (Fluka, ref. 93210), D-glicose-6-fosfato 2 mM (Sigma-Aldrich, ref. G7879), e MgCl_2 10 mM em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0) foram adicionados em uma microplaca de 96 poços e a absorvância foi medida a 340 nm por 6 min. Uma unidade de atividade de G6PDH foi definida como a quantidade de enzima que catalisou a formação de 1 μmol NADPH $\text{min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína presente (GLOCK; MCLEAN, 1953).

2.6.1.4 Atividade da catalase (CAT)

O sobrenadante (20 μL , 1,0 mg de proteína mL^{-1}) e 180 μL de meio de reação (H_2O_2 20 mM (Synth, ref. P2233) em Tris-base 50 mM, EDTA 0,25 mM, pH 8,0) foram adicionados em um 96-well UV-star® microplate (Greiner Bio-One), e a absorvância foi medida imediatamente a 240 nm por 5 min. O coeficiente de extinção molar para H_2O_2 ($40 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) foi usado para calcular a atividade da catalase (AEBI, 1984).

2.6.2 Níveis de tióis não proteicos (TNP)

As amostras foram tratadas com ácido tricloroacético 10% para precipitação seguida de centrifugação (1.000 g por 15 min e 4 °C). Em seguida, 50 μL do sobrenadante, 230 μL de tampão Tris-base 0,4 M, pH 8,9, e 20 μL de 5,5'-ditio-bis-(ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB, Sigma-Aldrich, ref. D8130) 2,5 mM foram adicionados em microplaca de 96 poços. A absorvância foi medida a 415 nm e a concentração de TNP foi

calculada com base em uma curva padrão de GSH (glutathiona) (SEDLAK; LINDSAY, 1968).

2.6.3 *Peroxidação lipídica (LPO)*

Após exposição ao Cd, o meio em que as células estavam cultivadas foi substituído por meio de cultivo contendo difenil-1-pirenilfosfina 100 μM (DPPP, Cayman chem, ref. 62237). Em seguida, as células foram incubadas por 15 min a 25° C e protegidas da luz, o meio de cultivo foi removido e 100 μL de DMSO foram adicionados. A formação de óxido de DPPP, derivado da reação de DPPP e hidroperóxidos lipídicos, foi determinada medindo a fluorescência (excitação/emissão = 351/380 nm) (OKIMOTO et al., 2000).

2.6.4 *Níveis de espécies reativas de oxigênio*

As células foram incubadas em um meio de cultivo fresco contendo diacetato de 2,7-diclorodihidrofluoresceína 10 μM (H2DCFDA, Thermo Fisher, ref. D399), o meio de cultivo foi removido e foi adicionado 200 μL de PBS. A formação de 2',7'-diclorofluoresceína (DCF), derivada da clivagem dos grupos acetato por esterases intracelulares e oxidação, foi determinada medindo a fluorescência (Excitação/Emissão = 488/530 nm) (WU; YOTNDA, 2011).

2.6.5 *Níveis de espécies reativas de nitrogênio*

Os níveis de Óxido nítrico (ON) foram determinados conforme descrito por MISKO et al. (1993) e GLINSKI et al. (2016). Após a exposição ao Cd, 150 μL do meio de cultivo foram transferidos para uma microplaca preta, e 10 μL de DAN (2,3-diaminonaftaleno, Invitrogen, ref. D7918), 0,5 mg mL⁻¹ em HCl 0,62 M, foram adicionados aos poços. As microplacas foram agitadas suavemente e incubadas a 25°C, protegidas da luz. Após 30 min, 5 μL de NaOH 2,8 M foram adicionados aos poços. A formação de 1-naftotriazol fluorescente, derivado da reação de nitrito e DAN, foi determinada pela medição da fluorescência (excitação/emissão = 365/450 nm).

2.7 RESPOSTA INTEGRADA DE BIOMARCADORES (RIB)

Os resultados para cada *endpoint* foram plotados em um gráfico de radar com valores positivos (indução), negativos (inibição) e zero (controle) (BELIAEFF; BURGEOT, 2002; SANCHEZ et al., 2013). Em seguida, os índices de RIB foram calculados para cada grupo, os valores foram convertidos para números absolutos e somados para estimar quais concentrações promoveram maiores alterações no sistema de defesa antioxidante.

2.8 TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS

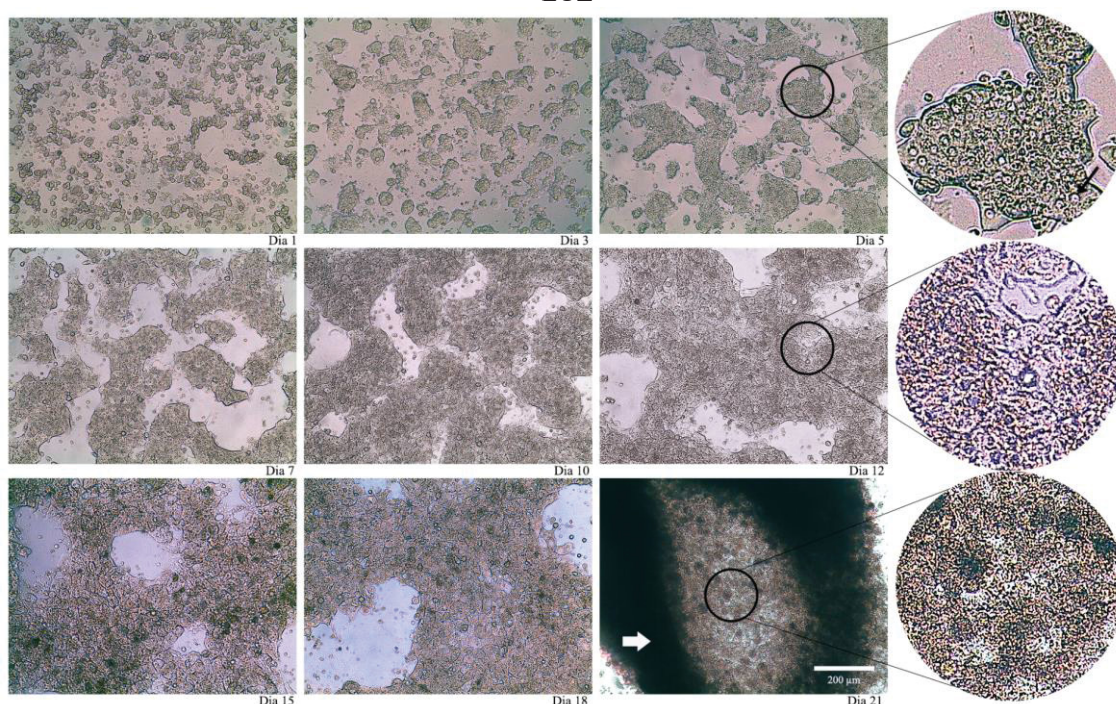
Para análise dos resultados, foram utilizadas as médias das réplicas técnicas de cada grupo experimental. Nesse sentido, os dados apresentados equivalem a 4 experimentos independentes, que foram normalizados de acordo com o grupo controle. Para a análise, os dados foram primeiramente testados quanto à homocedasticidade das variâncias e normalidade dos resíduos, utilizando os testes de Bartlett e Shapiro-Wilk, respectivamente. Nos casos em que as premissas do teste foram atendidas, foi realizada a decomposição da hipótese efetiva da ANOVA de duas vias, seguida do pós-teste de Fisher para comparar os grupos. Caso contrário, foi realizada análise não paramétrica, por meio do teste de Kruskal-Wallis seguido de teste de comparações múltiplas. Um $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

3 RESULTADOS

3.1 ISOLAMENTO, CULTIVO E CONGELAMENTO DAS CÉLULAS DO FÍGADO

O cultivo primário de células do fígado é composto principalmente por hepatócitos, que representam 70% das células hepáticas (GAO et al., 2008) e por isso será apenas referido como cultivo de hepatócitos a partir daqui. Após os procedimentos de isolamento, a viabilidade celular observada foi superior a 95% e os hepatócitos cultivados de tilápia do Nilo foram devidamente estabelecidos em ~75% dos procedimentos, formando aglomerados característicos (FIGURA 6). Não houve diferença na morfologia celular com as diferentes marcas de frascos de cultivo, mas após 15 dias de cultivo, as células começaram a se desprender. Com base nesses dados, o terceiro dia após o isolamento celular foi selecionado para iniciar a exposição ao Cd por 24, 48 e 72 h.

FIGURA 6 – CULTIVO PRIMÁRIO DE HEPATÓCITOS DE *O. niloticus* SOB MICROSCOPIA DE LUZ

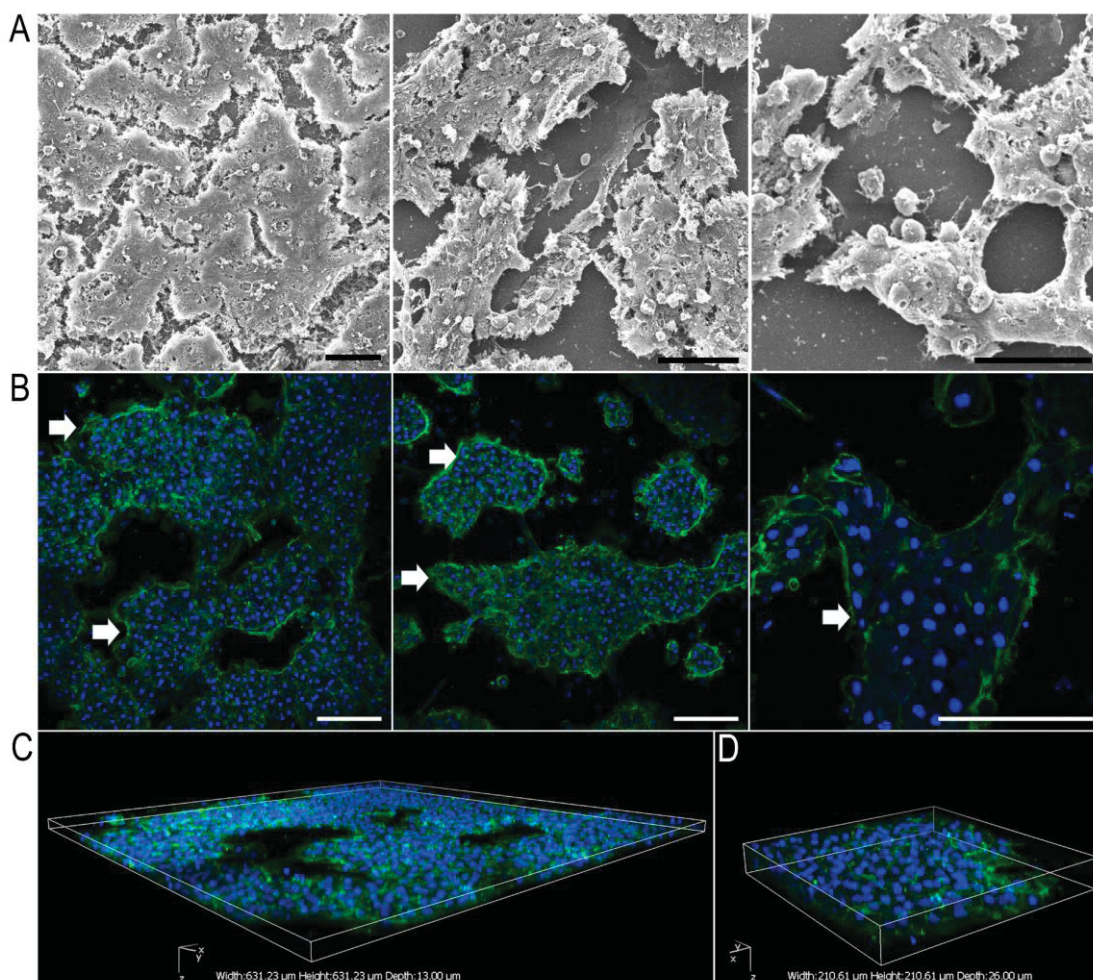


NOTA: As células foram cultivadas por até 21 dias a 25°C com trocas de meio a cada 3 dias. A adesão celular completa levou cerca de 2-3 dias e as células começaram a se desprender após 15 dias em cultivo. As imagens foram capturadas em um microscópio de luz invertida. Inserções: detalhes dos aglomerados de células no dia 5, dia 12 e dia 21. Seta branca no dia 21: região do aglomerado de células que se destacou da superfície da placa de cultivo. Barra = 200 μm. FONTE: O autor (2023).

Os *clusters* característicos também foram observados por microscopia de fluorescência (FIGURA 7A) e microscopia eletrônica de varredura (FIGURA 7B). As

células se sobrepõem formando aglomerados numa estrutura tridimensional (FIGURA 7C-D).

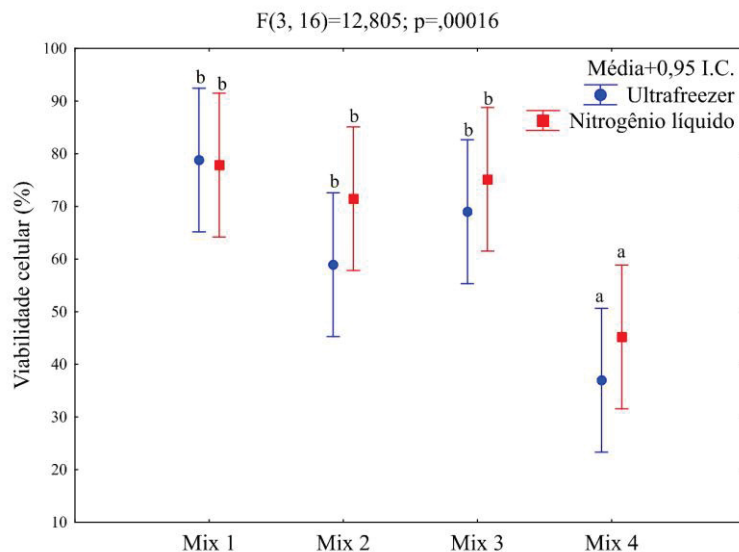
FIGURA 7 – CULTIVO PRIMÁRIO DE HEPATÓCITOS DE *O. niloticus* SOB MICROSCOPIA ELETRÔNICA E DE FLUORESCÊNCIA



NOTA: As células foram cultivadas por 6 dias e visualizadas por microscopia eletrônica de varredura (A) e microscopia confocal (B, C e D). A: aglomerados/*clusters* de células formados por migração celular e adesão célula-célula. B: Imagens 2D de aglomerados de células (setas). Azul: núcleo celular marcado com DAPI. Verde: citoesqueleto de actina marcado com faloidina-FITC. C e D: imagens 3D dos mesmos grupos de células de B. Barras pretas = 50 μm e barras brancas = 100 μm. FONTE: O autor (2023).

Não foi possível estabelecer o cultivo após descongelamento das células. Embora as células apresentaram alta viabilidade (70-80%) após o descongelamento, elas não aderiram e não se agruparam em aglomerados, perdendo a viabilidade em todas as condições testadas (FIGURA 8).

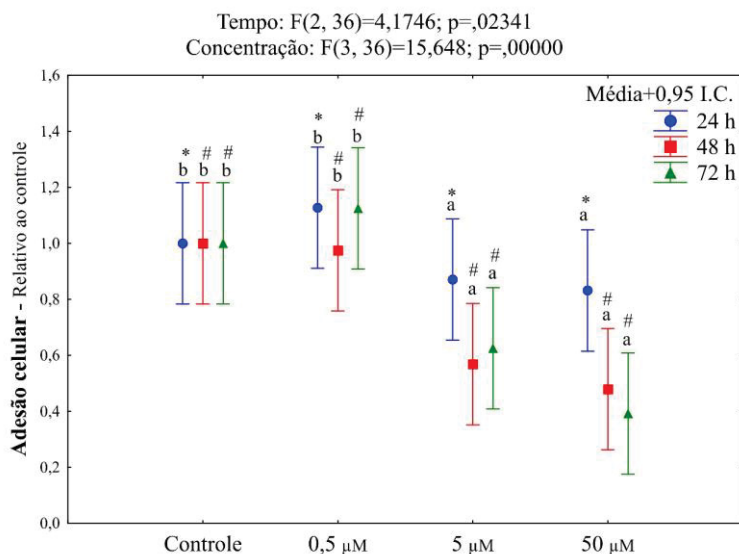
FIGURA 8 – VIABILIDADE DOS HEPATÓCITOS APÓS DESCONGELAMENTO



NOTA: Decomposição efetiva da hipótese de ANOVA de duas vias para viabilidade celular de hepatócitos de *O. niloticus*. O ensaio do azul de tripan foi realizado após o descongelamento dos hepatócitos criopreservados em diferentes condições (A). Mistura 1: DMSO 10% + SFB 90%. Mistura 2: DMSO 20% + SFB 80%. Mistura 3: DMSO 10% + SFB 50% + L15 40%. Mistura 4: DMSO 20% + SFB 40% + L15 40%. As letras indicam diferenças entre as concentrações. Média+0,95 C.I. Barra = 200 μ m. FONTE: O autor (2023).

3.2 VIABILIDADE CELULAR

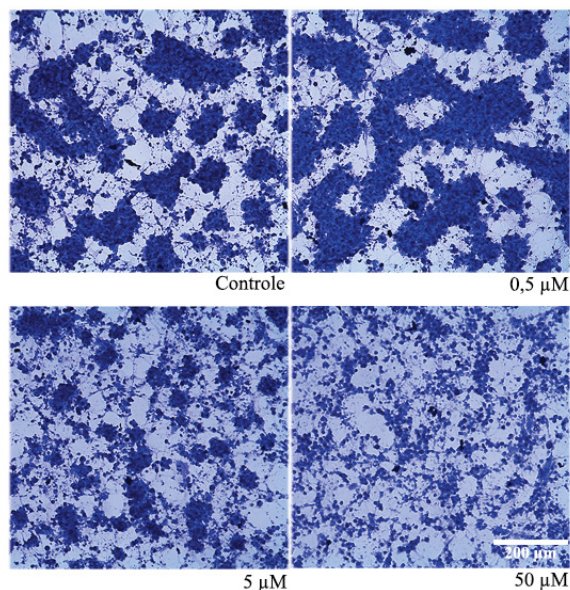
A exposição ao Cd induziu a perda de adesão celular nas concentrações de 5 μ M (32%) e 50 μ M (44%), e após 48 h (21%) e 72 h de exposição (18%), em comparação com 24 h de exposição (FIGURA 9, 10).

FIGURA 9 – ENSAIO DE ADESÃO CELULAR APÓS 24, 48 E 72 HORAS DE EXPOSIÇÃO AO CÁDMIO EM HEPATÓCITOS DE *O. niloticus*

NOTA: Decomposição efetiva da hipótese de ANOVA de duas vias para viabilidade celular de hepatócitos de *O. niloticus*. Ensaio de adesão celular após 24, 48 e 72 h de exposição ao Cd. As letras indicam diferenças

entre as concentrações de Cd e os símbolos (* e #) indicam diferenças entre os tempos de exposição quando não foi observada a interação entre os fatores. Média+0,95 C.I. FONTE: O autor (2023).

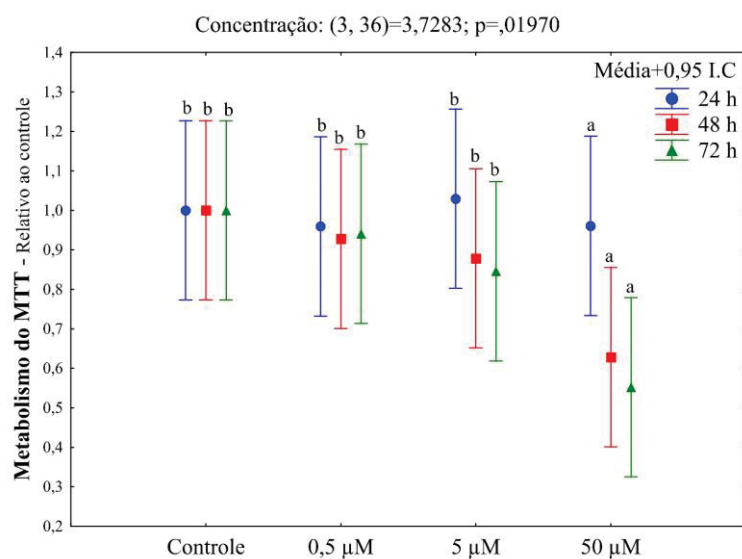
FIGURA 10 – HEPATÓCITOS CORADOS COM CRISTAL VIOLETA NO ENSAIO DE ADESÃO CELULAR



NOTA: As imagens foram capturadas em um microscópio de luz invertido (Leica Microsystems, Alemanha) após 72 h de exposição ao Cd e exemplificam campos de cultivo logo antes da extração do corante para quantificação por meio de medição de absorvância em um espectrofotômetro. Barra = 200 μm . FONTE: O autor (2023).

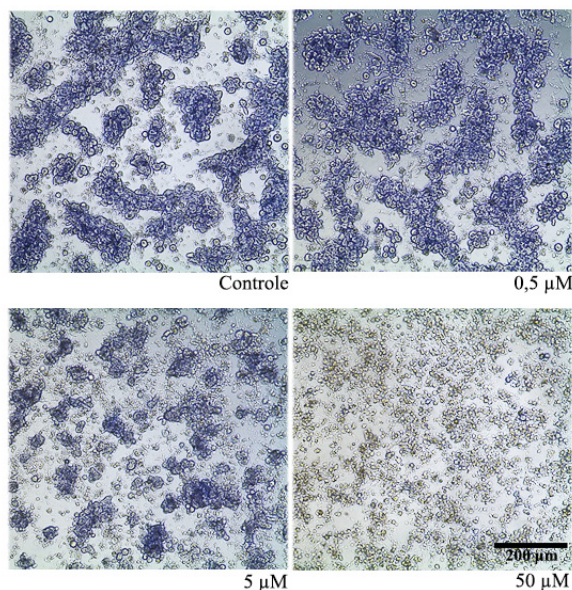
Assim, para os ensaios de MTT e vermelho neutro, os valores foram normalizados pelos resultados de adesão celular, de forma que a viabilidade não foi subestimada por ter menos células nos grupos expostos às maiores concentrações de Cd. Uma redução de 29% no metabolismo do MTT foi observada em hepatócitos expostos a 50 μM de Cd (FIGURA 11, 12).

FIGURA 11 – ENSAIO DO METABOLISMO DO MTT APÓS 24, 48 E 72 HORAS DE EXPOSIÇÃO AO CÁDMIO EM HEPATÓCITOS DE *O. niloticus*



NOTA: Decomposição efetiva da hipótese de ANOVA de duas vias para viabilidade celular de hepatócitos de *O. niloticus*. Ensaio de metabolismo do MTT após 24, 48 e 72 h de exposição ao Cd. As letras indicam diferenças entre as concentrações de Cd. Média+0,95 C.I. FONTE: O autor (2023).

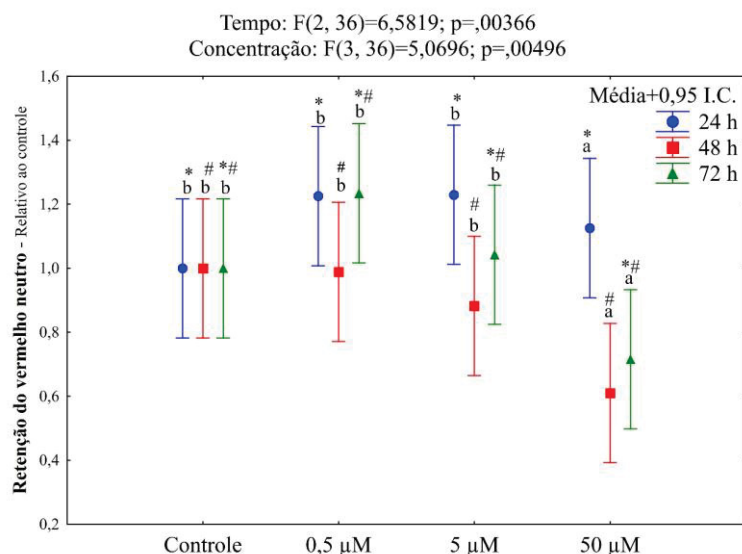
FIGURA 12 – HEPATÓCITOS CORADOS COM CRISTAIS DE FORMAZAN NO ENSAIO DO METABOLISMO DO MTT



NOTA: As imagens foram capturadas em um microscópio de luz invertido (Leica Microsystems, Alemanha) após 72h de exposição e exemplificam campos de cultivo logo antes da extração do corante para quantificação por meio de medição de absorvância em um espectrofotômetro. Barra = 200 µm. FONTE: O autor (2023).

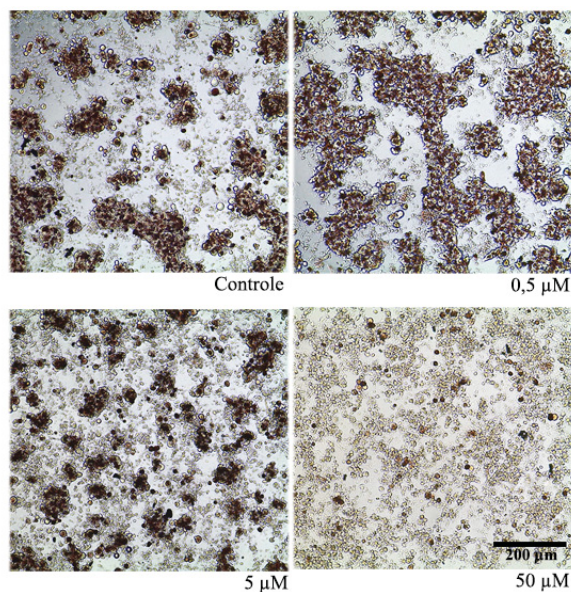
Uma redução na retenção de vermelho neutro também foi observada em hepatócitos expostos ao Cd por 72 h (18%) e por 48 h (24%) em comparação com 24 h de exposição (FIGURA 13, 14).

FIGURA 13 – ENSAIO DA RETENÇÃO DE VERMELHO NEUTRO APÓS 24, 48 E 72 HORAS DE EXPOSIÇÃO AO CÁDMIO EM HEPATÓCITOS DE *O. niloticus*



NOTA: Decomposição efetiva da hipótese de ANOVA de duas vias para viabilidade celular de hepatócitos de *O. niloticus*. Ensaio da retenção de vermelho neutro após 24, 48 e 72 h de exposição ao Cd. As letras indicam diferenças entre as concentrações de Cd e os símbolos (* e #) indicam diferenças entre os tempos de exposição quando não foi observada a interação entre os fatores. Média+0,95 C.I. FONTE: O autor (2023).

FIGURA 14 – HEPATÓCITOS CORADOS COM VERMELHO NEUTRO NO ENSAIO DA RETENÇÃO DE VERMELHO NEUTRO

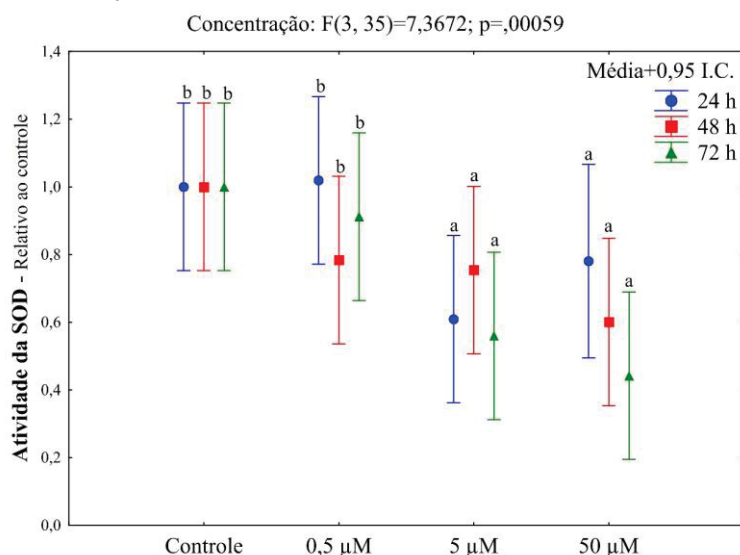


NOTA: As imagens foram capturadas em um microscópio de luz invertido (Leica Microsystems, Alemanha) após 72h de exposição ao Cd e exemplificam campos de cultivo logo antes da extração do corante para quantificação (resultados plotados em B, C e D) por meio de medição de absorvância em um espectrofotômetro. Barra = 200 µm. FONTE: O autor (2023).

3.3 ENZIMAS ANTIOXIDANTES

Foi observada uma redução de 36% e 41% na atividade de superóxido dismutase (SOD) em hepatócitos expostos a 5 e 50 μM de Cd, respectivamente (FIGURA 15).

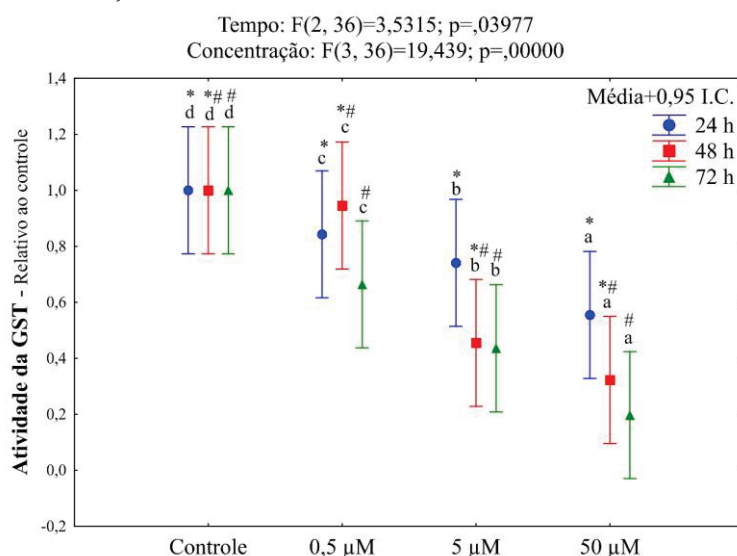
FIGURA 15 – ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE APÓS 24, 48 E 72 HORAS DE EXPOSIÇÃO AO CÁDMIO EM HEPATÓCITOS DE *O. niloticus*



NOTA: Decomposição efetiva da hipótese de ANOVA de duas vias para a atividade da superóxido dismutase em hepatócitos de *O. niloticus* após 24, 48 e 72 h de exposição ao Cd. ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Fisher. As letras indicam diferenças entre as concentrações de Cd. Média+0,95 C.I. FONTE: O autor (2023).

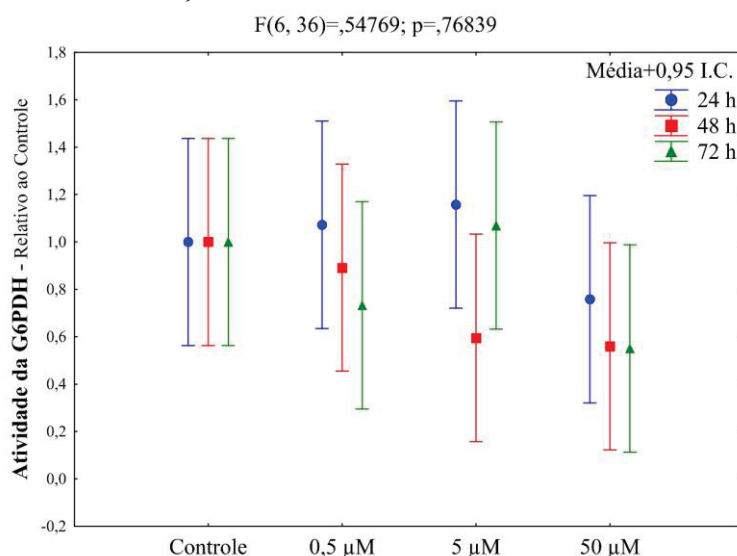
Da mesma forma, foi observada redução na atividade da glutathiona *S*-transferase (GST) para 5 μM (46%) e 50 μM (64%) de Cd, bem como para exposição de 72 h (27%) em comparação com exposição de 24 h (FIGURA 16). Nenhuma diferença na atividade de G6PDH foi observada (FIGURA 17).

FIGURA 16 – ATIVIDADE DA GLUTATIONA S-TRANSFERASE APÓS 24, 48 E 72 HORAS DE EXPOSIÇÃO AO CÁDMIO EM HEPATÓCITOS DE *O. niloticus*



NOTA: Decomposição efetiva da hipótese de ANOVA de duas vias para a atividade da glutatona S-transferase em hepatócitos de *O. niloticus* após 24, 48 e 72 h de exposição ao Cd. ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Fisher. As letras indicam diferenças entre as concentrações de Cd. Os símbolos (* e #) indicam diferenças entre os tempos de exposição quando não foi observada a interação entre os fatores. Média+0,95 C.I. FONTE: O autor (2023).

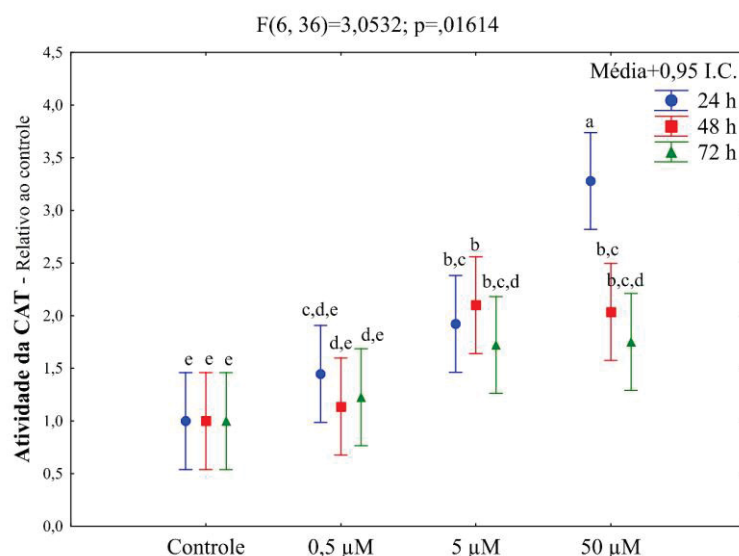
FIGURA 17 – ATIVIDADE DA GLICOSE-6-FOSFATO DESIDROGENASE APÓS 24, 48 E 72 HORAS DE EXPOSIÇÃO AO CÁDMIO EM HEPATÓCITOS DE *O. niloticus*



NOTA: Decomposição efetiva da hipótese de ANOVA de duas vias para a atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase em hepatócitos de *O. niloticus* após 24, 48 e 72 h de exposição ao Cd. ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Fisher. Não foi observada diferença significativa. Média+0,95 C.I. FONTE: O autor (2023).

Para a catalase (CAT), a exposição ao Cd levou a aumento da atividade após 24 h (5 µM: 92%, 50 µM: ~230%), 48 h (5 µM: ~110%, 50 µM: 103%) e 72 h (5 µM: 72%, 50 µM: 75%, FIGURA 18) de exposição.

FIGURA 18 – ATIVIDADE DA CATALASE APÓS 24, 48 E 72 HORAS DE EXPOSIÇÃO AO CÁDMIO EM HEPATÓCITOS DE *O. niloticus*

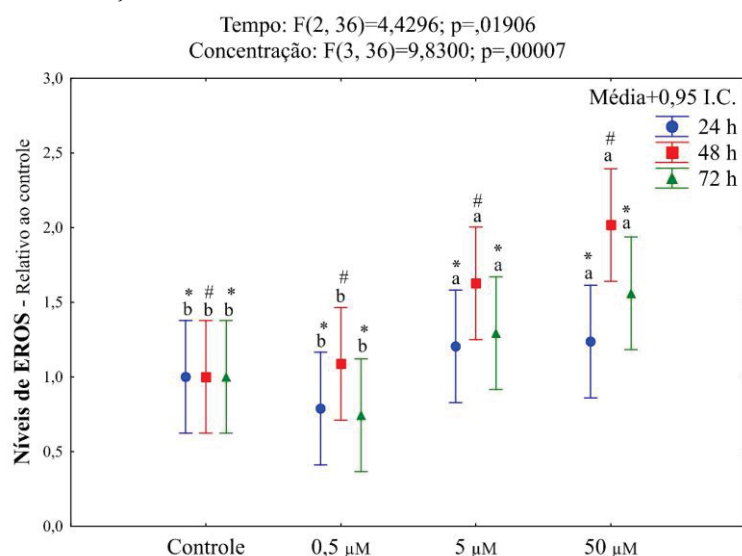


NOTA: Decomposição efetiva da hipótese de ANOVA de duas vias para a atividade da catalase em hepatócitos de *O. niloticus* após 24, 48 e 72 h de exposição ao Cd. ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Fisher. As letras indicam diferenças entre a interação de concentração e tempo de exposição. Média+0,95 C.I. FONTE: O autor (2023).

3.4 ESPÉCIES REATIVAS, TIÓIS NÃO PROTEICOS E PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

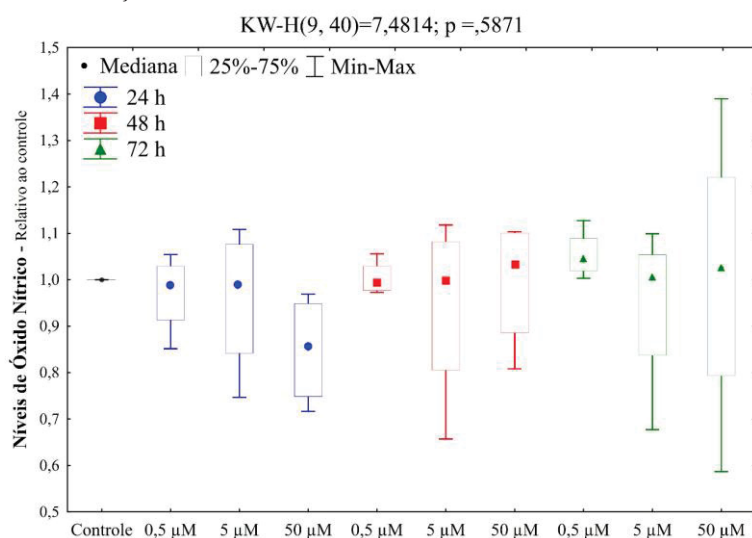
Para os ensaios de quantificação dos níveis de EROs e peroxidação lipídica (LPO), os valores foram normalizados pelos resultados de adesão celular para evitar interferência nos resultados pelo menor número de células aderidas nos grupos expostos às maiores concentrações de Cd. Aumento nos níveis de EROs foram observados em hepatócitos expostos a 5 µM (38%), 50 µM (60%) e em 48 h de exposição (43%) em comparação com 24 h de exposição (FIGURA 19). Nenhuma diferença nos níveis de espécies reativas de nitrogênio foi observada (FIGURA 20).

FIGURA 19 – NÍVEIS DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO APÓS 24, 48 E 72 HORAS DE EXPOSIÇÃO AO CÁDMIO EM HEPATÓCITOS DE *O. niloticus*



NOTA: Decomposição efetiva da hipótese de ANOVA de duas vias para níveis de espécies reativas de oxigênio em hepatócitos de *O. niloticus* após 24, 48 e 72 h de exposição ao Cd. ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Fisher. As letras indicam a diferença entre as concentrações de Cd. Os símbolos (* e #) indicam diferenças entre os tempos de exposição quando não foi observada a interação entre os fatores. Média+0,95 C.I. FONTE: O autor (2023).

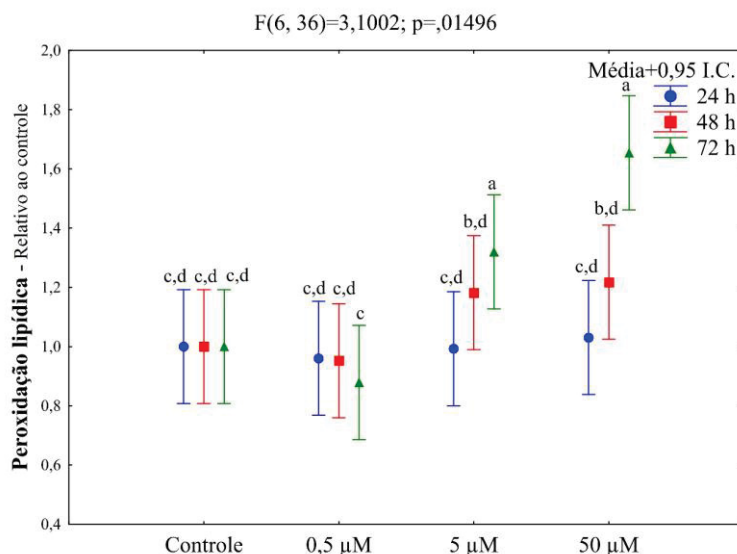
FIGURA 20 – NÍVEIS DE ESPÉCIES REATIVAS DE NITROGÊNIO APÓS 24, 48 E 72 HORAS DE EXPOSIÇÃO AO CÁDMIO EM HEPATÓCITOS DE *O. niloticus*



NOTA: Teste de Kruskal-Wallis seguido por teste de comparação múltipla para níveis de espécies reativas de nitrogênio em hepatócitos após 24, 48 e 72 h de exposição ao Cd. Não foi observada diferença significativa. Mediana+IQR 25-75%. FONTE: O autor (2023).

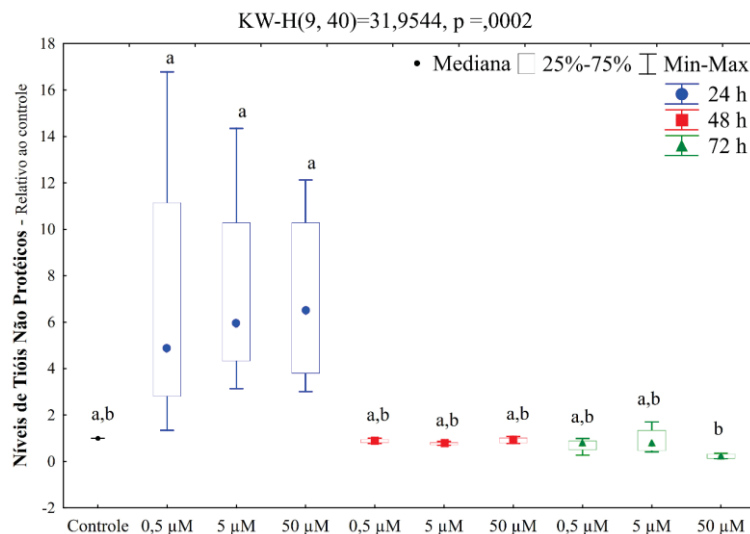
A exposição ao Cd por 72 h levou a aumento na LPO nas maiores concentrações de Cd (5 µM: 32%, 50 µM: 65%) (FIGURA 21) e leve redução na LPO na menor concentração de Cd (0,5 µM: 12%). Nos níveis de tióis não proteicos (TNP) foi observado aumento em 72 h (~290%) em comparação com 24 h de exposição (FIGURA 22).

FIGURA 21 – PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA APÓS 24, 48 E 72 HORAS DE EXPOSIÇÃO AO CÁDMIO EM HEPATÓCITOS DE *O. niloticus*



NOTA: Decomposição efetiva da hipótese de ANOVA de duas vias para peroxidação lipídica/hidroperóxidos lipídicos em hepatócitos de *O. niloticus* após 24, 48 e 72 h de exposição ao Cd. ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Fisher. As letras indicam diferenças entre a interação de concentração e tempo de exposição. Média+0,95 C.I. FONTE: O autor (2023).

FIGURA 22 – NÍVEIS DE TIÓIS NÃO PROTEICOS APÓS 24, 48 E 72 HORAS DE EXPOSIÇÃO AO CÁDMIO EM HEPATÓCITOS DE *O. niloticus*



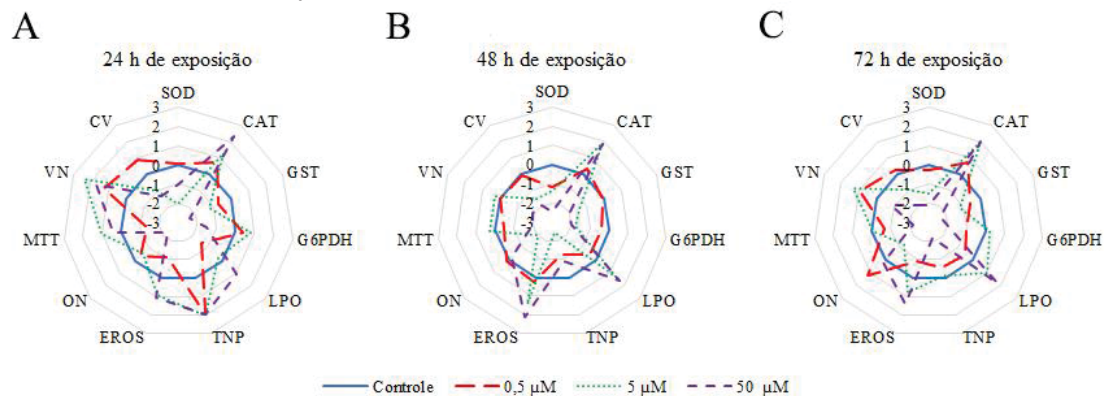
NOTA: Teste de Kruskal-Wallis seguido por teste de comparação múltipla para níveis de tióis não proteicos em hepatócitos após 24, 48 e 72 h de exposição ao Cd. As letras indicam a diferença entre as concentrações de Cd. Mediana+IQR 25-75%. FONTE: O autor (2023).

3.4 RESPOSTA INTEGRADA DE BIOMARCADORES

A avaliação da viabilidade, de biomarcadores do sistema de defesa antioxidante, EROs e peroxidação lipídica mostrou que a concentração de 50 µM promoveu maior

alteração nos biomarcadores e, conseqüentemente, maior RIB (TABELA 2): 17,0 em 24 h de exposição, 19,1 em 48 h e 18,9 em 72 h (FIGURA 23), seguido por 5 μM e 0,5 μM .

FIGURA 23 – RESPOSTA INTEGRADA DE BIOMARCADORES APÓS 24, 48 E 72 HORAS DE EXPOSIÇÃO AO CÁDMIO EM HEPATÓCITOS DE *O. niloticus*



NOTA: Resposta integrada de biomarcadores em hepatócitos de *O. niloticus* após 24 h (A), 48 h (B) e 72 h (C) de exposição ao Cd. O gráfico demonstra a oscilação dos biomarcadores nos grupos expostos ao Cd em relação ao grupo controle (linha azul). A área abaixo de zero indica redução do biomarcador, enquanto valores acima de zero indicam indução do biomarcador. SOD: superóxido dismutase; CAT: catalase; GST: glutathione S-transferase; G6PDH: glicose-6-fosfato desidrogenase; LPO: peroxidação lipídica; TNP: tióis não proteicos; EROS: espécies reativas de oxigênio; ON: óxido nítrico; MTT: teste MTT; VN: vermelho neutro; CV: cristal violeta. FONTE: O autor (2023).

TABELA 2 – VALORES DE RIB PARA CADA CONDIÇÃO DE EXPOSIÇÃO AO Cd

	0,5 μM	5 μM	50 μM
24 h	10,2	13,5	17
48 h	4,5	15,8	19,1
72 h	7,6	10,5	18,9
Σ (soma)	22,3	39,8	55,0

FONTE: O autor (2023).

4 DISCUSSÃO

4.1 CULTIVO PRIMÁRIO 2D DE HEPATÓCITOS

Em estudos experimentais em diversas áreas, como na ecotoxicologia, os pesquisadores têm lidado com diferentes desafios relacionados ao uso de animais, tanto práticos quanto éticos (GAO et al., 2008). Nesse contexto, cultivo de células de diferentes organismos têm sido amplamente utilizados, pois possuem forte apelo ético para substituir e reduzir o uso de animais (REVEL et al., 2021). Em particular, o cultivo de células permite uma pré-seleção rápida para citotoxicidade de contaminantes e poluentes ambientais antes de uma análise mais completa por meio de testes *in vivo*. Além disso, vários estudos mostraram uma correlação entre os testes *in vivo* e *in vitro*, sugerindo que o cultivo de células pode ser um método alternativo para experimentos com animais (BARRICK et al., 2019; CASTAÑO et al., 1996; KNAUER et al., 2007; REVEL et al., 2021).

Linhagens celulares contínuas são os modelos *in vitro* mais utilizados, pois são fáceis de manter e fornecem um suprimento ilimitado de material sem preocupações éticas, mas, a maioria dessas linhagens celulares tem sido cultivada por décadas em condições que selecionam as células mais ativas e proliferativas e, como resultado, podem diferir genética e fenotipicamente do tecido de origem. Embora as células de cultivo primário tenham algumas limitações, como a ocorrência de senescência replicativa, ou seja, capacidade de crescimento limitada, uma grande vantagem em toxicologia é a preservação *in vitro* de importantes características e funções presentes *in vivo* (ALGE et al., 2006; PAN et al., 2009). Nesse sentido, o presente estudo teve como objetivo estabelecer o cultivo primário de hepatócitos de *O. niloticus* como modelo de estudo para triagem do potencial tóxico de contaminantes e poluentes ambientais.

Nas primeiras etapas da implementação do modelo, foram testadas placas de cultivo comuns de diferentes marcas, sem diferença na viabilidade celular. Esse resultado é interessante do ponto de vista econômico, pois não é necessário utilizar as placas para cultivo primário, mais caras e com tratamento especial para adesão, o que facilita a implementação do modelo nos grupos de pesquisa. Os resultados demonstraram que a perfusão manual do fígado é um método simples e fácil de obter boas condições de cultivo de hepatócitos, não sendo necessária exclusivamente a utilização de sistemas de fluxo automatizados, como feito em alguns estudos (KIM; TAKEMURA, 2003; UCHEA et al.,

2015). Com base nas alterações morfológicas observadas durante o cultivo, recomenda-se que a exposição aos xenobióticos seja realizada 72 h após o cultivo celular, para que os hepatócitos tenham tempo suficiente para aderir e formar aglomerados – morfologia semelhante à encontrada no fígado intacto. Além disso, o tratamento com qualquer composto-teste não deve exceder 96 h, pois o cultivo de células de *O. niloticus* pode deteriorar após 7 dias. Segundo Figueiredo et al. (2021), hepatócitos extraídos de diferentes espécies de peixes mantêm alta viabilidade por até seis dias de cultivo; após este tempo é possível que a viabilidade celular seja perdida progressivamente.

Tentativas de congelamento de hepatócitos de *O. niloticus* não foram bem-sucedidas em diferentes condições, o que inviabilizou o armazenamento e a manutenção do cultivo celular. Porém, estudos com hepatócitos da truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) mostram que essas podem ser criopreservadas com sucesso – mantendo aproximadamente 80% de viabilidade após o descongelamento e uma alta capacidade de metabolizar xenobióticos (MINGOIA et al., 2010). Esses resultados indicam diferentes sensibilidades dos hepatócitos primários após o congelamento entre diferentes espécies de peixes. Além disso, o método de cultivo utilizado (2D ou 3D) pode influenciar no estabelecimento da cultivo, principalmente considerando que os esferoides apresentam maior taxa metabólica em relação às células em monocamadas quando expostas a xenobióticos (MINGOIA et al., 2010).

4.2 METABOLISMO DO MTT COMO TESTE DE CITOTOXICIDADE

O MTT é amplamente utilizado como o único ensaio na maioria dos estudos encontrados para medir a citotoxicidade em hepatócitos de peixes em linhagens celulares imortalizadas e cultivo primário após exposição a xenobióticos (BONOMO et al., 2019; LAVILLE et al., 2004; ZHU et al., 2014). No entanto, os resultados desse estudo mostram uma baixa capacidade de metabolismo do MTT em hepatócitos de *O. niloticus*, com baixos valores de absorvância em relação ao branco (absorvância de 0,1-0,2), mesmo sendo possível encontrar uma diferença entre os grupos tratado e controle no cálculo do valor relativo, devido à capacidade do Cd de afetar as desidrogenases celulares. Portanto, esses resultados indicam que, se o MTT for usado, não deve ser o único teste usado para avaliar o potencial citotóxico em hepatócitos de peixes, mas em conjunto com outros ensaios (p. ex., retenção do vermelho neutro e adesão celular com cristal violeta) para uma avaliação mais robusta da citotoxicidade.

Outros métodos para a avaliação da citotoxicidade, como o resazurin e o diacetato acetoximetil éster de 5-carboxifluoresceína (5CFDA-AM) demonstraram bons resultados para a avaliação do metabolismo e da integridade da membrana, respectivamente, em hepatócitos de truta arco-íris (SCHREER et al., 2005) e também poderiam apresentar resultados interessantes para os hepatócitos de *O. niloticus*.

4.3 POTENCIAL CITOTÓXICO DE Cd

O Cd alterou significativamente vários parâmetros avaliados nos ensaios de citotoxicidade. Para o ensaio de adesão celular, a interferência com moléculas de adesão célula-célula é um possível mecanismo que levou às alterações morfofisiológicas observadas em hepatócitos expostos ao Cd, diminuindo a adesão celular. Foi relatado que o Cd interfere na localização da E-caderina na membrana, na integridade da junção das células aderentes e na estabilidade do complexo E-caderina/ β -catenina (BRUSCALUPI et al., 2009; PROZIALECK et al., 2002).

Considerando os resultados do ensaio de metabolismo de MTT e captação de vermelho neutro, Athmouni et al. (2018) também observaram redução do metabolismo celular na linhagem HepG2 (hepatocarcinoma humano) exposta ao Cd na faixa de concentração de 25-60 μ M, e Fotakis et al. (2005) observaram que o Cd interfere na atividade lisossômica de hepatócitos da linhagem HTC expostos a 20 μ M por apenas 8 h.

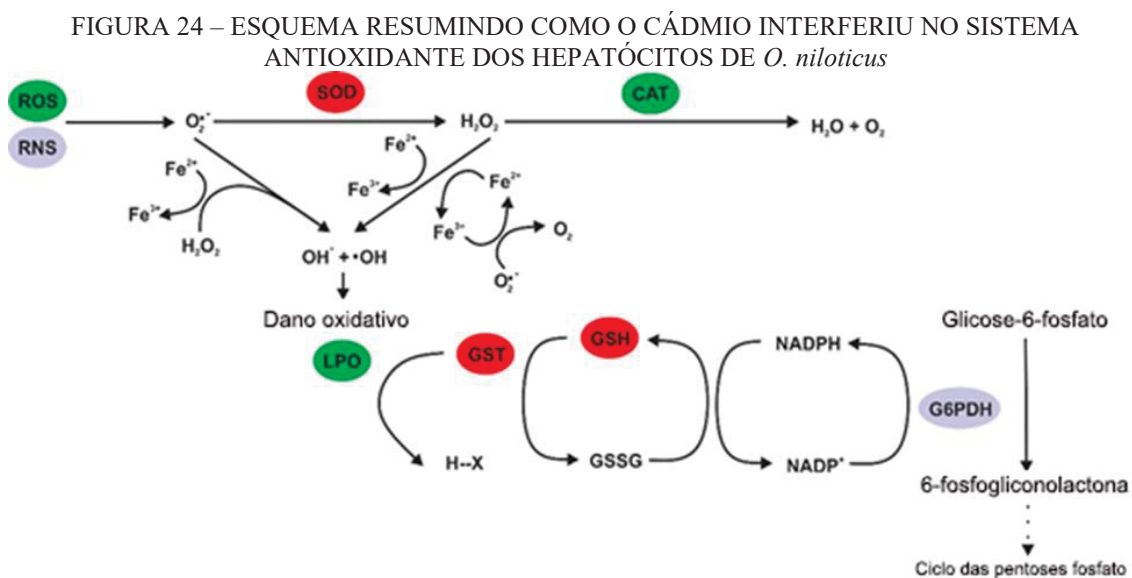
A exposição a metais por um curto período ou em concentrações mais baixas pode ativar o sistema de defesa antioxidante e aumentar a atividade das enzimas antioxidantes, mas longos períodos ou concentrações mais altas geralmente estão relacionadas à diminuição da capacidade antioxidante (ZHANG et al., 2021). A redução da capacidade antioxidante pode resultar no acúmulo de EROs, levando a uma série de eventos, como dano tecidual e apoptose (SEVCIKOVA et al., 2011).

4.4 Cd INDUZIU DESEQUILÍBRIO NO SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE

No presente estudo, a estratégia utilizada para avaliar a atividade das enzimas de defesa antioxidante foi remover os hepatócitos com auxílio de *cell scraper*, centrifugar e armazenar o *pellet* em *ultrafreezer* até as análises. Em seguida, foi necessário quantificar as concentrações de proteínas totais e normalizá-las para prosseguir com as análises. No

entanto, existem outras possibilidades, como congelar a microplaca de 96 poços após o tempo de exposição até a análise (LIEBEL et al., 2011).

Após exposição ao Cd, estudos anteriores relataram um aumento na peroxidação lipídica, depleção de glutatona, aumento na geração de EROs e redução na atividade da GST e CAT (RENU et al., 2021; WANG et al., 2014). Wu et al. (2013) observaram que a atividade da SOD aumentou após exposição a 7,25 mg L⁻¹ de Cd em caranguejos, mas diminuiu em 29 mg L⁻¹. No presente estudo, uma redução da atividade da SOD foi observada nos hepatócitos expostos às maiores concentrações de Cd (5 e 50 μM). De acordo com os resultados, é possível inferir: i) apesar do aumento das EROs após a exposição ao Cd, o sistema de defesa antioxidante não foi capaz de mitigar os danos; ii) a redução da atividade da SOD e acúmulo de radicais superóxido na célula pode ter aumentado a formação de radicais hidroxila pela reação de Haber-Weiss (reação dirigida por superóxido) (KAJARABILLE; LATUNDE-DADA, 2019) iii) além disso, o aumento intracelular do peróxido de hidrogênio pode favorecer a formação de radicais hidroxila pela reação de Fenton, mesmo com o aumento da atividade da CAT. Assim, todas essas alterações e possíveis vias resultaram em aumento do dano induzindo a peroxidação lipídica. O mecanismo de ação sugerido é ilustrado na FIGURA 24.



NOTA: Esquema resumindo como o Cd interferiu no sistema antioxidante dos hepatócitos de *O. niloticus*. Verde indica aumento, vermelho redução e cinza sem alterações. SOD: superóxido dismutase; CAT: catalase; GST: glutatona S-transferase; G6PDH: glicose-6-fosfato desidrogenase; GSH: glutatona; GSSG: dissulfeto de glutatona; LPO: peroxidação lipídica; NADPH: Dinucleotídeo fosfato de nicotinamida adenina reduzido; NADP⁺: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato; NPT: tíóis não proteicos; ROS: espécies reativas de oxigênio; RNS: espécies reativas de nitrogênio. O₂⁻: ânion superóxido; H₂O₂: peróxido de hidrogênio; OH⁻: ânion hidroxila; ·OH: radical hidroxila; GS-X: xenobiótico conjugado com glutatona. FONTE: O autor (2023).

A avaliação global da atividade das enzimas antioxidantes e dos efeitos do estresse oxidativo mostrou que a concentração de 50 μM promoveu maior alteração nos biomarcadores e, conseqüentemente, maior RIB. Era esperado que as alterações fossem maiores nas células expostas a 50 μM de Cd e, de fato, houve uma clara relação dose-resposta na modulação dos biomarcadores bioquímicos ao analisar os índices gerados pelo RIB. Além disso, é possível observar que nas duas maiores concentrações, 5 e 50 μM , houve modulação semelhante independente do tempo de exposição, em suas respectivas concentrações. Nesse sentido, Koizumi et al. (1996) observaram que na concentração de 50 μM de Cd, EROs são geradas muito precocemente (5 min após a exposição) em hepatócitos de ratos, atingindo um platô em 15 min, com efeitos nas membranas plasmáticas. Portanto, os efeitos observados podem estar mais relacionados à concentração utilizada do que ao tempo de exposição. Por fim, embora as concentrações, os tempos de exposição e os ensaios toxicológicos possam variar entre os estudos usando modelos *in vivo* e *in vitro*, algumas respostas, como a redução da atividade da SOD, foram descritas por alguns autores usando *O. niloticus* (HU et al., 2021) ou outras espécies de peixes como modelos biológicos (CHEN et al., 2022; YANG et al., 2022).

5 CONCLUSÃO

Esse estudo demonstrou que é possível isolar as células e proceder com o cultivo primário de hepatócitos de *O. niloticus* utilizando recursos e métodos simples, bem como manter as células viáveis por tempo suficiente para avaliar o potencial tóxico de contaminantes ambientais. Cultivo de hepatócitos de *O. niloticus* obtidos por meio desses protocolos podem ser úteis para estudos bioquímicos e celulares, podendo auxiliar na elucidação de mecanismos de toxicidade de contaminantes ambientais. Também é importante destacar que alguns efeitos encontrados neste estudo são semelhantes aos descritos em estudos *in vivo* usando o organismo inteiro de peixes, mostrando que algumas respostas celulares ao estresse químico (p. ex., sistema de defesa antioxidante) são preservadas *in vitro*. Finalmente, esse estudo forneceu dados que suportam o uso de cultivo primário de hepatócitos de peixes neotropicais na investigação ecotoxicológica da resposta a contaminantes ambientais.

CAPÍTULO II

**CÁDMIO COMO UM POTENTE INDUTOR DE BIOMARCADOR DE
CONTAMINAÇÃO AQUÁTICA POR METAIS EM PEIXES: UMA
ABORDAGEM *IN SILICO* E *IN VITRO***

RESUMO

As atividades humanas levam à contaminação e conseqüente poluição dos ecossistemas aquáticos. As atividades industriais, mineradoras, agrícolas e domésticas são responsáveis pelo lançamento de milhões de toneladas de metais pesados nos corpos d'água. Como os peixes são sensíveis às mudanças ambientais, eles são um bom modelo para monitorar os ecossistemas aquáticos. A expressão de um biomarcador de contaminação por metais, bastante usado em estudos ecotoxicológicos, a metalotioneína (MT), pode variar dependendo do metal ao qual o peixe é exposto. Em suma, a transcrição do gene da MT depende da concentração intracelular de metais e é controlada pela interação entre fatores de transcrição metálica (FTM) e elementos de regulação metálica (ERM). O zinco desempenha um papel fundamental ao se ligar ao FTM, deixando-o ativo e com a possibilidade de interagir com as sequências ERM do promotor MT, o que ativa a transcrição. Assim, o presente estudo teve como objetivo investigar quais metais pesados são os indutores mais potentes da MT em espécies de peixes. Inicialmente, estruturas de proteínas de *D. rerio* com sítios de ligação ao zinco e com diferentes funções celulares foram utilizadas para avaliar a diferença entre os *scores* de ligação dos metais com as proteínas por meio de *docking* molecular e então inferir quais poderiam ser os indutores mais potentes. Em seguida, hepatócitos primários de *O. niloticus* foram utilizados para confirmar os resultados gerados na etapa *in silico*. Dados *in vitro* e *in silico* mostraram que o cádmio é um potente indutor da MT. Uma possível explicação sugerida é que o cádmio tem alta afinidade pelos ligantes de zinco e substitui esse metal, gerando um aumento na concentração intracelular dele e deixando-o livre para interagir com o FTM.

Palavras-chave: Metalotioneína. *Zebrafish*. Tilápia do Nilo. Cádmio. *Docking* molecular. Cultivo primário de hepatócitos.

ABSTRACT

Human activities lead to contamination and subsequent pollution in aquatic ecosystems. Industrial, mining, agricultural, and domestic activities are responsible for dumping millions of tons of toxic metals into water bodies. As fish are sensitive to environmental changes, they are a good model for monitoring aquatic ecosystems. Expression of a biomarker for aquatic metal contamination, widely used in ecotoxicological studies, metallothionein (MT), may vary depending on the metal the fish is exposed to. In short, the transcription of the MT gene depends on the intracellular concentration of metals, and it is controlled by the interactions between metal transcription factors (MTF) and metal regulatory elements (MRE). Zinc plays a key role by binding to the MTF, leaving the MTF active and with the possibility of interacting with the MRE sequences of the MT promoter, which activates transcription. Thus, the current study aimed to investigate which heavy metals are the most potent inducers in fish species. Initially, *D. rerio* Zn-binding proteins structures with different cell functions were used to evaluate the difference between the binding scores of metals with the proteins through molecular docking and from there to infer which could be the most potent inducers. Then, primary hepatocytes from *O. niloticus* were used to confirm the results generated in the *in silico* step. *In vitro* and *in silico* data showed that cadmium is a potent MT inducer. A possible explanation suggested is: as cadmium has a high affinity for Zn ligands and replaces it, generating an increase in intracellular Zn concentration and leaving it free to interact with the MTF.

Keywords: Metallothionein. Zebrafish. Nile tilapia. Cadmium. Molecular docking. Hepatocyte primary culture.

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONTEXTUALIZAÇÃO

Atualmente, a população global é de 8 bilhões e as projeções sugerem que ela poderá crescer para cerca de 8,5 bilhões em 2030, 9,7 bilhões em 2050 e 10,4 bilhões em 2100 (WORLD POPULATION PROSPECTS, 2022). Como consequência, as atividades humanas que produzem resíduos também aumentarão, o que pode contribuir para o aumento da contaminação e consequente poluição de vários ecossistemas (VAGHELA et al., 2017). É estimado que 80% das águas residuais não tratadas são despejadas em corpos d'água em todo o mundo (MATEO-SAGASTA et al., 2017).

A erosão e a lixiviação química de solos e rochas são as principais fontes naturais de metais e, em menor escala, os detritos de organismos e produtos de decomposição de matéria orgânica (TCHOUNWOU et al., 2012). No entanto, o nível de certos metais nos ecossistemas aquáticos aumentou devido às atividades humanas, como industrial, de mineração, de agricultura e doméstica, que são responsáveis por despejar milhões de toneladas de metais pesados em corpos d'água (MATEO-SAGASTA et al., 2017).

A análise química da água pode não representar o real potencial de toxicidade de contaminantes e poluentes nos ecossistemas aquáticos para a biota, de modo que análises adicionais são necessárias para determinar o nível seguro de resíduos despejados em corpos d'água (BOLIS et al., 2001). Biomarcadores podem ser detectados na biota e contribuir para o estudo do potencial tóxico de contaminantes e poluentes em ecossistemas aquáticos (STRIMBU; TAVEL, 2010). Em nível molecular, os biomarcadores podem ser avaliados por meio de diferentes metodologias baseadas na análise de DNA, perfil de expressão de RNA, proteína ou perfil metabólico (HARIHARAN et al., 2016). Eles podem ser usados para extrapolar dados obtidos a partir da unidade viva (célula) ou organismo, permitindo uma abordagem ecológica do risco de exposição ambiental (LIVINGSTONE, 1993).

Entre os possíveis biomarcadores de contaminação e poluição aquática em programas de biomonitoramento, está a metalotioneína (MT), considerada uma proteína responsiva principalmente ao estresse causado por metais em organismos como peixes (VIARENGO et al., 1999). A MT, uma proteína pequena e rica em resíduos de cisteína, foi detectada pela primeira vez no córtex renal equino, e se liga a íons metálicos específicos (MARGOSHES; VALLEE, 1957). Após o primeiro isolamento da MT em

equinos, demorou quase 20 anos para a proteína ser identificada em espécies de teleósteos e, desde então, estudos focaram na possibilidade de usar MT como um biomarcador de contaminação por metais (GÜNTHER et al., 2012; OLSSON, 1996).

A indução da MT pela exposição a diferentes metais não é a mesma; alguns metais são indutores mais potentes que outros (ATLI; CANLI, 2008). Roesijadi (1992) descreveu a indução da expressão de MTs por metais: a transcrição do gene da MT depende da concentração intracelular de metais e é controlada pelas interações entre fatores de transcrição de metais (FTM) e elementos reguladores de metais (ERM). O zinco (Zn) desempenha um papel fundamental ao se ligar ao FTM, deixando-o com uma configuração ativa para interagir com as sequências ERM do promotor MT, o que ativa a transcrição (DONG et al., 2015; GÜNTHER et al., 2012). Outros metais não atuam diretamente em fatores que controlam a transcrição, mas, por possuírem alta afinidade por ligantes de Zn, substituem esse metal, gerando um aumento na concentração intracelular e deixando-o livre para interagir com o FTM (DONG et al., 2015). Pode haver pequenas peculiaridades neste mecanismo geral dependendo da espécie. A mobilidade do Zn, p. ex., é maior para MT de peixe do que para MT de camundongo (CAPASSO et al., 2003).

O estudo de sítios de ligação a metais em proteínas, como na metalotioneína, é importante para entender os processos celulares em que as proteínas estão envolvidas (WALDRON et al., 2009). No entanto, esse estudo pode ser experimentalmente desafiador, considerando o número de etapas ou técnicas especializadas, como cromatografia em coluna de afinidade por metal e ensaios de mudança de mobilidade eletroforética, espectroscopia de ressonância magnética nuclear, espectroscopia de absorção e eletroforese em gel (LIN et al., 2016; LU et al., 2022). Nesse contexto, a biologia computacional pode ser usada para investigar a possível interação entre metais pesados e riscos à saúde dos organismos (GUPTA et al., 2020) e, em contraste com as técnicas experimentais de laboratório, permite uma análise relativamente fácil e rápida dos sítios de ligação a metais (LIN et al., 2016; LU et al., 2022). MIB2, p. ex., é um servidor para modelagem e previsão de sítios de ligação a íons metálicos, baseado no método de transformação de fragmentos (LU et al., 2022).

Portanto, diferentes abordagens podem ser aplicadas para investigar como os metais interferem na expressão da MT, como abordagens *in silico*, *in vitro* e *in vivo*, e contribuir para uma interpretação adequada dos resultados de detecção da MT (ATLI; CANLI, 2008; CHAN et al., 2006; LU et al., 2022). Assim, o presente estudo teve como

objetivo investigar quais metais pesados são os indutores mais potentes em espécies de peixes. Inicialmente, estruturas de proteínas de *D. rerio* foram utilizadas para avaliar a diferença entre os *scores* de ligação de metais com proteínas com sítios de ligação ao Zn por meio de *docking* molecular e então inferir quais poderiam ser os indutores mais potentes. Em seguida, hepatócitos primários de *O. niloticus* foram utilizados para confirmar os resultados gerados na etapa *in silico*.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

- Comparar a indução da MT por metais pesados usando ferramenta *in silico* com base em proteínas de *Danio rerio*, além de avaliar a expressão gênica e proteica da MT em hepatócitos primários de *Oreochromis niloticus*.

1.2.2 Objetivos específicos

- Analisar o potencial de ligação de diferentes metais pesados a sítios de ligação ao zinco de proteínas de *Danio rerio* por meio de ferramenta *in silico* (*docking* molecular);
- Avaliar a expressão gênica e proteica da metalotioneína em hepatócitos de *O. niloticus* expostos aos metais pesados cádmio, cobre, chumbo, manganês e mercúrio, usando técnicas de RT-qPCR, ELISA e método bioquímico.

2 MATERIAL E MÉTODOS²

2.1 DOCKING MOLECULAR

Primeiramente, uma rede de interação funcional de proteínas foi construídas com *Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins* – algoritmo STRING (SZKLARCZYK et al., 2020) usando Metalotioneína-2 como a proteína de consulta e *Danio rerio* como a espécie. A espécie foi selecionada pelo fato de que a quantidade de informação nos bancos de dados moleculares é superior em relação as demais. Em seguida, o servidor PredZinc (SHU et al., 2008) foi usado para identificar as proteínas que possuem sítios de ligação ao Zn. Então, as proteínas de ligação ao zinco foram selecionadas e o modelo 3D obtido por meio do banco de dados AlphaFold (JUMPER et al., 2021; VARADI et al., 2022). Para análises de *docking* molecular o servidor MIB2 foi usado (LU et al., 2022). Finalmente, o maior *score* de ligação entre o Zn e a proteína foi escolhido e os *scores* para os outros metais para o sítio de ligação com pelo menos um resíduo semelhante foram usados para comparação.

2.2 OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DOS EXEMPLARES DE *Oreochromis niloticus*

Os peixes foram obtidos em piscicultura e mantidos em tanque com água filtrada, aeração constante e alimentados a cada 2 dias. Os procedimentos foram previamente descritos no capítulo anterior e foram aprovados e certificados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR) com o certificado número 1286 (ANEXO 1).

2.3 ISOLAMENTO, CULTIVO E EXPOSIÇÃO DE CÉLULAS DO FÍGADO

O isolamento e o cultivo dos hepatócitos foram realizados conforme procedimento descrito no capítulo I. Para os ensaios de viabilidade, as células foram cultivadas em placas de cultivo celular de 96 poços na densidade de $2,1 \times 10^5$ células por cm^2 , expostas ao Cd por 24, 48 e 72 h. Para os ensaios de detecção indireta da MT, as células foram cultivadas em placas de cultivo de células de 6 poços em uma densidade de

² Para protocolos detalhados, consulte o anexo 3.

$2,1 \times 10^5$ células por cm^2 , expostas ao Cd por 24, 48 e 72 h. Para o ensaio de RT-qPCR, as células foram cultivadas em placas de cultivo de 6 poços em uma densidade de $3,1 \times 10^5$ células por cm^2 , expostas ao Cd por 72 h. Para o ensaio de imunocitoquímica, as células do fígado foram cultivadas em placas de cultivo de células de 24 poços contendo lamínulas de vidro circulares numa densidade de $3,1 \times 10^5$ células por cm^2 e expostas ao Cd por 72 h.

2.4 VIABILIDADE CELULAR

As células foram expostas a cinco concentrações de cloreto de cádmio, CdCl_2 (0,02; 0,04; 0,2; 1 e 2 mg L^{-1}), próximas ao valor máximo permitido para o lançamento de efluentes de acordo com a Resolução CONAMA nº 397, com o grupo controle mantido em paralelo (meio de cultivo com o volume de água correspondente ao volume de água+Cd dos grupos expostos). Após 24, 48 e 72 h de exposição, o metabolismo do MTT, a retenção de vermelho neutro e a adesão celular foram avaliados conforme descrito no capítulo I. Além disso, foi realizado o ensaio do metabolismo do resazurin. Esse método é baseado na capacidade das células viáveis em reduzirem enzimaticamente o resazurin para resorufin (KUMAR et al., 2018). Essa atividade metabólica pode ser determinada ao monitorar a absorvância a 570 nm e 600 nm. Para esse ensaio, as células foram expostas ao Cd e então foi adicionado solução de resazurin (Sigma-Aldrich, ref. R70017), concentração final de 44 μM em meio de cultivo, seguido da quantificação da absorvância a 570 e 600 nm no tempo de 72 h. Para calcular o valor relativo ao controle de redução do resazurin nos grupos expostos, foi usada a fórmula: $(\text{Oxi}2 \times \text{T1}) - (\text{Oxi}1 \times \text{T2}) / (\text{Oxi}2 \times \text{pC1}) - (\text{Oxi}1 \times \text{pC2})$, em que: $\text{Oxi}1$ = coeficiente de extinção molar do resazurin oxidado a 570nm, $\text{Oxi}2$ = coeficiente de extinção molar do resazurin oxidado a 600nm, T1 = absorvância dos grupos expostos em 570nm e T2 = absorvância dos grupos expostos em 600nm.

Também foi avaliada a viabilidade celular dos hepatócitos expostos aos metais chumbo (5 mg L^{-1} , $\text{Pb}(\text{OOCCH}_3)$, Alfa aesar, ref. 10719), cobre (10 mg L^{-1} , CuCl , Química moderna, ref. 13050), manganês 10 mg L^{-1} , MnCl_2 , Sigma-Aldrich, ref. 244589) e mercúrio (0,1 mg L^{-1} , HgCl_2 , Alfa aesar, 10808), em concentrações similares ao valor máximo permitido para o lançamento de efluentes de acordo com a Resolução CONAMA nº 397.

2.5 INDUÇÃO DE METALOTIONEÍNA

2.5.1 Expressão gênica

Os grupos experimentais para o ensaio de RT-qPCR foram duas concentrações diferentes de Cd (0,2 e 1 mg L⁻¹), além de um grupo controle experimental (meio de cultivo com volume de água correspondente ao volume de água+Cd dos grupos expostos). Como controle negativo para indução de MT, um agonista do hormônio liberador de gonadotropina (GnRH-A, Sigma-Aldrich, ref. SCP0180) foi usado em uma concentração de 100 nM, que apresentou um efeito inibitório na produção de RNAm da MT induzida por zinco em HepG2 e células HuH7 (PATI et al., 1996). Após 72 h de exposição, os hepatócitos foram coletados de 2 poços das placas de cultivo celular de 6 poços por grupo experimental. Além disso, foi avaliada a expressão gênica da MT nos hepatócitos expostos as concentrações de 2 mg L⁻¹ de cádmio, 5 mg L⁻¹ de chumbo, 10 mg L⁻¹ de cobre, 10 mg L⁻¹ de manganês e 0,1 mg L⁻¹ de mercúrio.

Depois de expostas, as células foram removidas das placas com o auxílio de *cell scrapers* e a suspensão de células foi transferida para um microtubo de 2 mL e centrifugada a 50 g por 3 min à temperatura ambiente. Depois de remover o sobrenadante, 100 µL de RNAlater™ (Invitrogen, ref. AM7021) foram adicionados às amostras. O PureLink™ RNA Mini Kit (Invitrogen, ref. 12183018A) foi usado para extração de RNA com uma etapa adicional usando o reagente Trizol (Invitrogen, ref. 15596026). Para remover possível contaminação com DNA genômico, TURBO DNA-free™ (Invitrogen, ref. AM1907) foi usado. Para quantificar o RNA extraído, foi utilizado Quantifluor® (Promega, ref. E2671). Além disso, foi realizada avaliação da qualidade do RNA verificando a pureza, utilizando as razões Abs260/Abs280 para contaminação por proteínas e Abs260/Abs230 para contaminação por fenol e outros contaminantes, e integridade do RNA por eletroforese em gel de agarose. Em seguida, a conversão de RNA para cDNA foi feita usando o SuperScript™ IV First-Strand Synthesis System (Invitrogen, ref. 18091050) e Veriti™ Thermal Cycler. 10 ng de cDNA e 500 µM de *primers* foram usados por reação em 10 µL. Para amplificação em tempo real, foi utilizado o PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (Invitrogen, ref. A25776) e o sistema de PCR em tempo real StepOnePlus™. Para a análise, foi utilizado o servidor *Web-based LinRegPCR* (UNTERGASSER et al., 2021).

Os RNAm de referência utilizados foram a enzima de conjugação de ubiquitina (UBCE), tubulina α em cadeia (TUBA) e actina β (ACTB) (YANG et al., 2013). O RNAm alvo foi a metalotioneína (MT) (ZHANG, F. et al., 2022) (TABELA 3). Quatro experimentos independentes foram realizados.

TABELA 3 – DADOS DOS PRIMERS

Gene de interesse	Abreviatura	Sequência (5'-3')	Amplicon (pb)	Número de acesso – GenBank
Enzima de Conjugação de Ubiquitina	ECUB	F: CTCTCAAATCAATGCCACTTCC	130	XM_003460024
		R: CCCTGGTGGAGGTTCTTGT		
Tubulina α em cadeia	TUBA	F: AGCCAGACGGACAGATGCC	153	XM_003445344
		R: TTCCTGCACGCACCTCATC		
Actina β	ACTB	F: GTACCCCATGAGCACGGTA	122	XM_003455949
		R: GAGCCTCTGTGAGCAGGACT		
Metalotioneína	MT	F: AAGAGCCACTCCTACACCGT	139	XM_003447045.5
		R: TTGCAGGTTCCAGTCTTGGC		

FONTE: O autor (2023).

2.5.2 Expressão proteica

2.5.2.1 Método bioquímico

Os grupos experimentais para o ensaio de comparação dos níveis de proteína MT foram quatro diferentes concentrações de Cd (0,02; 0,04; 0,2 e 1 mg L⁻¹), além de um grupo controle experimental (meio de cultivo com o volume de água correspondente ao volume de água+ Cd dos grupos expostos). Após 48 e 72 h de exposição, os hepatócitos foram coletados de 2 poços das placas de cultivo celular de 6 poços por grupo experimental. As células foram removidas das placas utilizando *cell scrappers*, e suspensão celular foi transferida para um microtubo de 2 mL e centrifugada a 50 g por 3 min à temperatura ambiente. Depois de remover o sobrenadante, as amostras foram homogeneizadas em tampão Tris-HCl 20 mM, pH 8,6, usando *beads* de metal de 3 mm e *TissueLyser II*, depois centrifugadas (15.000 g por 30 min, 4 °C). As proteínas totais no sobrenadante foram quantificadas usando reagente de Bradford (Bio-rad, ref. 5000006). Em seguida, 300 μ L do sobrenadante foram transferidos para um novo microtubo e adicionados 342 μ L de etanol/clorofórmio (13,3:1). Em seguida, as amostras foram centrifugadas (6.000 g por 10 min, 4 °C), 490 μ L do sobrenadante foram transferidos para um novo microtubo e adicionados 1,502 mL de etanol/HCl (45:1). As amostras foram

mantidas em -20°C por 1 h e centrifugadas usando os mesmos parâmetros. O sobrenadante foi removido e 1 mL de clorofórmio/etanol/Tris-HCl 20mM (1:87:12) foi adicionado. Após centrifugação, o sobrenadante foi removido, 50 μL de solução de NaCl 250 mM e 50 μL de 1N HCl contendo EDTA 4 mM foram adicionados e as amostras foram misturadas em vórtex. Em seguida, 1 mL de DTNB 0,43 mM (ácido 5,5-ditio-bis-2-nitrobenzoico, Sigma-Aldrich, ref. D8130) dissolvido em metanol foi adicionado e depois tampão fosfato de sódio 0,2 M e as amostras centrifugadas (3.000 g por 5 min). O sobrenadante foi adicionado às microplacas de 96 poços, incluindo concentrações conhecidas de GSH (Vetec, ref. 1843) como curva padrão e a absorbância foi lida a 412 nm. Considerando que a MT possui entre 20-30% de cisteína, o teor de MT foi estimado como sendo igual a 0,3 x teor de -SH (VIARENGO et al., 1997).

2.5.2.2 ELISA

ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) é uma técnica usada para detectar e quantificar moléculas como peptídeos, proteínas, anticorpos e hormônios, baseada na interação anticorpo-antígeno altamente específica (LEQUIN, 2005). A detecção é realizada avaliando a atividade da enzima conjugada com o anticorpo por meio da incubação com um substrato para produzir um composto mensurável. Assim, a técnica de ELISA foi empregada para detectar os níveis de metalotioneína nas células.

Após o tempo de exposição de 24, 48 e 72 h ao cádmio, os hepatócitos foram desaderidos com *cell scraper* e armazenados em *ultrafreezer*. As amostras foram sonicadas para recuperar o conteúdo de proteína das células e centrifugadas a 15.000 g por 30 min, $0-4^{\circ}\text{C}$. As proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford que se baseia na mudança de cor do corante de cor avermelhada *Coomassie Blue G-250* em solução ácida (Bio-rad, ref. 5000006) para cor azulada na presença de proteínas, com a comparação com uma curva padrão de albumina de soro bovino (BSA, Sigma-Aldrich, ref. A4503). Inicialmente foi feito um teste dos anticorpos IgGs policlonais anti-MT usando uma amostra do controle e outra exposta por 72 h a $0,5\ \mu\text{M}$ de cádmio, em que as variáveis testadas foram: amostra aquecida e não aquecida e sensibilização com 0,5 e 1 mg mL^{-1} de proteínas totais. Foi testado amostra aquecida porque há relato que o aquecimento funcionaria como uma pré-purificação da MT (WU; TSAI; YAN, 2012), sendo que dessa forma poderia melhorar a sensibilidade dos anticorpos. Foi testado a

sensibilização do poço com $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$, porque se houvesse resultado satisfatório, facilitaria na logística dos experimentos, em que seria possível usar a placa de 24 poços para expor e coletar as células.

Depois do teste, foi dada sequência aos experimentos, em que os poços da placa de ELISA foram sensibilizados com as amostras a $0,5$ e 1 mg mL^{-1} em tampão carbonato-bicarbonato por 40 min a 37°C . Depois, os poços foram lavados com PBS-T 0,1 % e foi feito o bloqueio com BSA 2% em PBS-T 0,05% por 60 min. Os poços foram lavados novamente e então foi feita a detecção primária com anticorpo anti-MT biotilado diluído a $2 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ em PBS-T 0,05% por 90 min. Para a detecção secundária foi usada SA-HRP em uma diluição 1:6000 em PBS e incubado por 45 min. Então foi feita a revelação com o substrato TMB por 15-20 min. Para parar a reação foi usado ácido sulfúrico 2M e então foi lida a absorbância em 450nm.

2.5.2.3 Western blot

A técnica de *western blot* é usada para identificar proteínas específicas em uma mistura complexa de proteínas extraídas das células e segue três etapas: separação por tamanho, transferência para um suporte sólido e marcação de proteína alvo usando anticorpos primários e secundários adequados para a visualização (MAHMOOD; YANG, 2012).

Feita a centrifugação e adicionado o tampão de amostra, as proteínas foram separadas por meio da técnica de eletroforese (20 mA para cada gel) em gel de SDS-poliacrilamida 15% (SDS-PAGE; SDS: Sigma-Aldrich, ref. L3771; acrilamida: Sigma-Aldrich, ref. 146072), então feita a transferência semi-seca por eletroforese (20V por 30 min) para uma membrana de PVDF ativada em metanol 100% por 20 s. A membrana foi corada com *Ponceau* (Sigma-Aldrich, ref. P3504) para confirmar a transferência. Por fim, foi feito o bloqueio dos sítios inespecíficos de ligação aos anticorpos e, para visualizar a MT, a membrana foi incubada com anticorpos anti-MT *overnight* a 4°C , depois lavada com tampão para retirar os anticorpos que não estavam ligados à MT, incubadas com anticorpos secundários conjugados com fosfatase alcalina (revelação colorimétrica) ou HRP (revelação quimioluminescente) para evidenciar as regiões onde os anticorpos ligaram.

2.6 IMUNOCITOQUÍMICA

O grupo experimental para ensaio de imunocitoquímica foi 1 mg L^{-1} de Cd, além de um grupo controle (meio de cultivo com volume de água correspondente ao volume de água+Cd dos grupos expostos). Após 72 h de exposição, o meio de cultivo em que as células foram expostas foi removido, as células foram fixadas em paraformaldeído 4% (Sigma-Aldrich, ref. 158127) em PBS por 30 min, permeabilizadas com Triton-X 0,2% em PBS por 10 min e lavadas uma vez com PBS por 5 min. Para bloquear os sítios inespecíficos, as células foram incubadas com BSA 1% e $22,52 \text{ mg mL}^{-1}$ de glicina em PBS-T (PBS + Tween 20 0,1%) por 30 min. Para a detecção dos alvos (MT e FTM), as células foram incubadas com os anticorpos primários anti-FTM (ABCAM, ref. AB183897) e anti-MT (NAGAMATSU et al., 2020) diluídos 1:200 em 1% BSA em PBS-T por 1 h em temperatura ambiente. Em seguida, as células foram lavadas três vezes em PBS por 5 min. Finalmente, as células foram incubadas com os anticorpos secundários conjugados com Cy 3 (1:150, Jackson, ref. 305166047) em BSA 1% por 1 h à temperatura ambiente no escuro e lavadas três vezes. Para marcação de núcleo e citoesqueleto de actina, as células foram incubadas com DAPI ($5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, Sigma-Aldrich, ref. D1306) por 1 min e com faloidina-FITC ($66 \text{ } \mu\text{M}$, Invitrogen, ref. F432) por 20 min. As lâminas foram montadas em resina *Fluormount* (EMS, ref. 17984) e, em seguida, as imagens foram capturadas em microscópio confocal (microscópio Nikon Eclipse Ti, Japão).

2.7 TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS

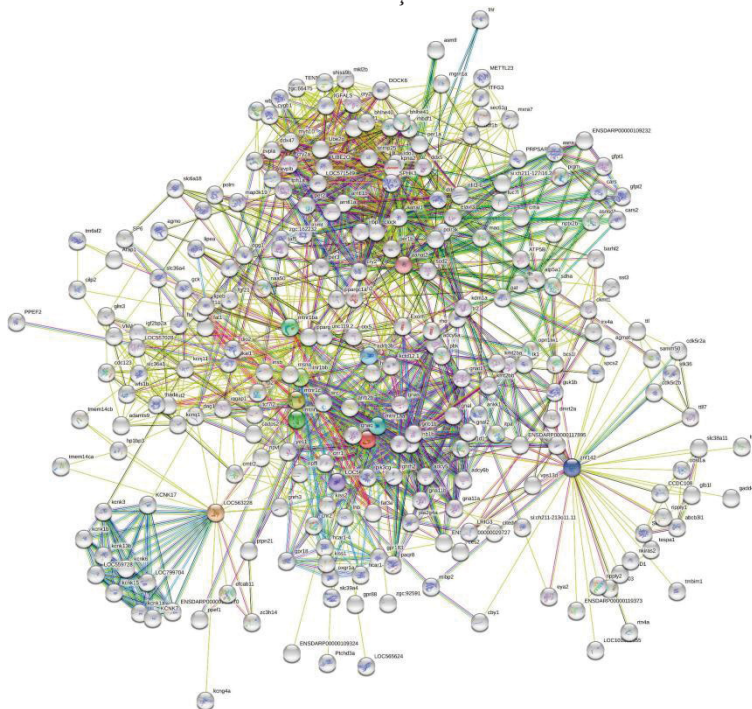
Foram utilizadas as médias das réplicas técnicas de cada grupo experimental. Os dados apresentados são equivalentes a 4 experimentos independentes, que foram normalizados de acordo com o grupo controle. Para a análise, os dados foram primeiramente testados quanto à homocedasticidade das variâncias e normalidade dos resíduos, sendo utilizado os testes de Bartlett e Shapiro-Wilk, respectivamente. ANOVA de uma ou duas vias foi usada, seguida do pós-teste de Fisher para comparar os grupos. Um $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

3 RESULTADOS

3.1 DOCKING MOLECULAR

Um total de 251 proteínas que formam rede de interação funcional (FIGURA 25) foram usadas para pesquisar aquelas com sítios de ligação ao Zn.

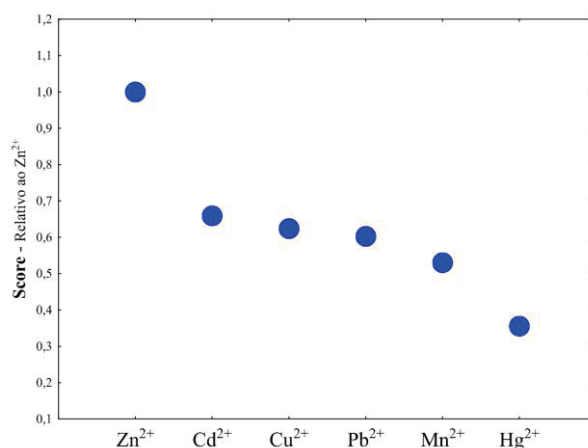
FIGURA 25 – REDE CONSTRUÍDA COM A FERRAMENTA STRING MOSTRANDO AS 251 PROTEÍNAS QUE FORMAM REDES DE INTERAÇÃO FUNCIONAL COM A METALOTIONEÍNA



FONTE: O autor (2023).

Foram identificadas 84 proteínas com sítios de ligação ao Zn, cujas estruturas foram obtidas através do banco de dados AlphaFold e selecionadas para *docking* molecular. Os metais selecionados foram: Zn^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} , Mn^{2+} e Hg^{2+} . A média percentual das pontuações para sítios de ligação de Zn em comparação com Zn foram 35,57; 53,02; 60,29; 62,39 e 65,92% para Hg^{2+} , Mn^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} , and Cd^{2+} , respectivamente (FIGURA 26).

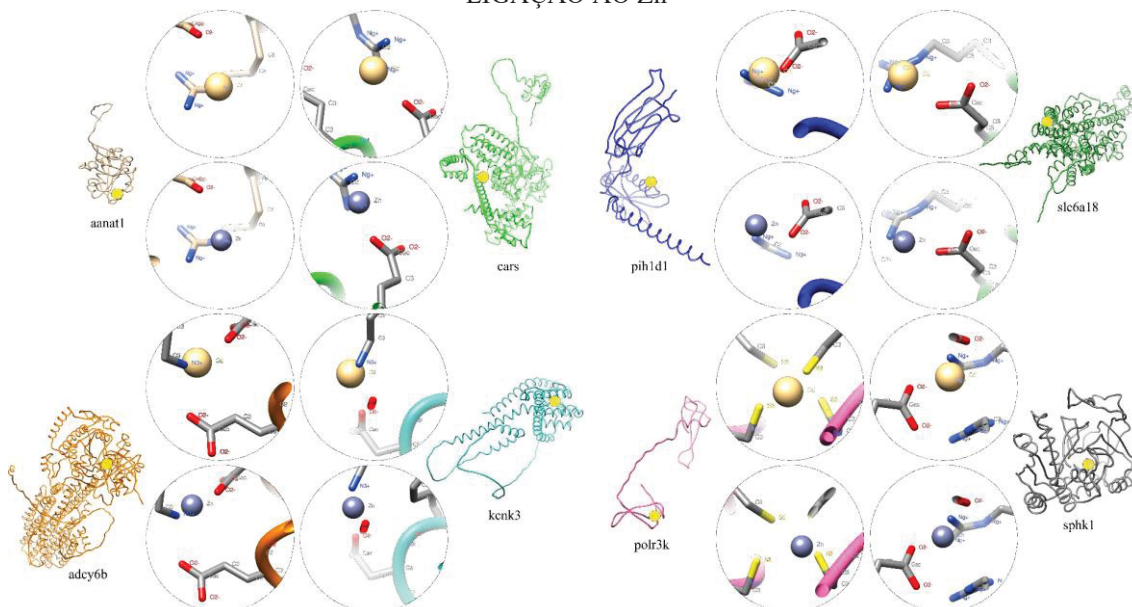
FIGURA 26 – *DOCKING* MOLECULAR ENTRE METAIS PESADOS E PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO AO ZINCO



NOTA: *Docking* molecular entre Zn²⁺, Cd²⁺, Cu²⁺, Pb²⁺, Mn²⁺ e Hg²⁺ e proteínas de ligação ao Zn. O Cd²⁺ teve o maior score em relação aos outros metais pesados. FONTE: O autor (2023).

Arilalquilamina N-acetiltransferase 1 (AANAT1), adenilato ciclase 6b (ADCY6B), cisteína-tRNA ligase (CARS), canal de potássio 3 (KCNK3), proteína 1 contendo o domínio PIH1 (PIH1D1), subunidade RPC10 da RNA polimerase III direcionada ao DNA (POLR3K), família de transportadores de solutos 6 membro 18 (SLC6A18) e esfingosina quinase 1 (SPHK1) são algumas das proteínas com alto *score* para ligação de Cd²⁺ em sítios de ligação de Zn (FIGURA 27).

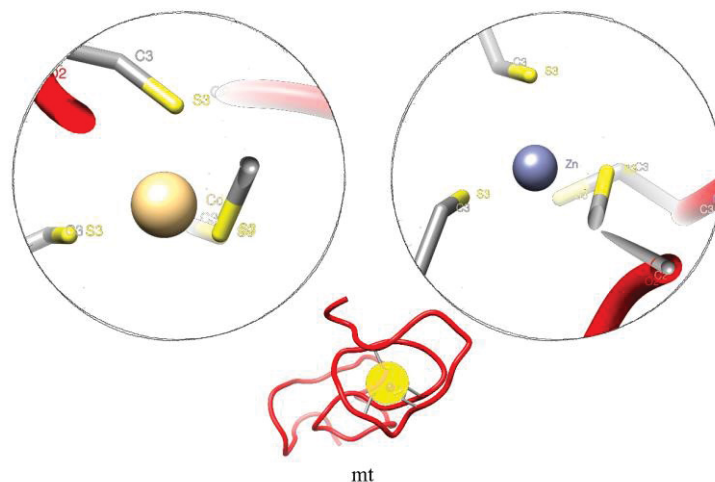
FIGURA 27 – *DOCKING* MOLECULAR ENTRE Zn²⁺ E Cd²⁺ E PROTEÍNAS COM SÍTIOS DE LIGAÇÃO AO Zn²⁺



NOTA: O Cd²⁺ teve o maior score em relação aos outros metais pesados. Os sítios de ligação de Zn²⁺ em algumas das proteínas, com os quais Cd²⁺ teve alta afinidade, estão sendo apresentados. FONTE: O autor (2023).

O Cd^{2+} também pode se ligar ao sítio de ligação de Zn na MT (FIGURA 28), com um *score* de 1,732, em comparação com 2,264 para Zn^{2+} , 2,785 para Cu^{2+} , 2,158 para Mn^{2+} e 1,798 para Pb^{2+} . Para Hg^{2+} não foram previstos sítios de ligação.

FIGURA 28 – DOCKING MOLECULAR ENTRE Zn^{2+} , Cd^{2+} E METALOTIONEÍNA

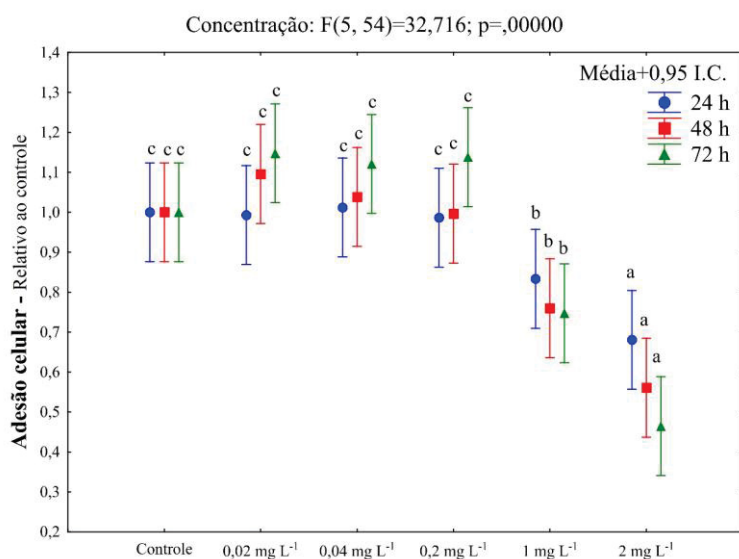


NOTA: Cd^{2+} apresentou um *score* de 1,732 para um sítio de ligação de Zn^{2+} em comparação com 2,264 para Zn^{2+} . FONTE: O autor (2023).

3.2 ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR

Uma redução na viabilidade celular foi observada em hepatócitos expostos a 2 mg L^{-1} de Cd (FIGURA 29, 30, 31, 32). Além disso, uma ligeira redução foi observada nos hepatócitos expostos a 1 mg L^{-1} (FIGURA 29, 30, 31, 32). Uma redução de ~20% e ~45% na adesão celular foi observada em hepatócitos expostos a 1 e 2 mg L^{-1} de Cd, respectivamente (FIGURA 29).

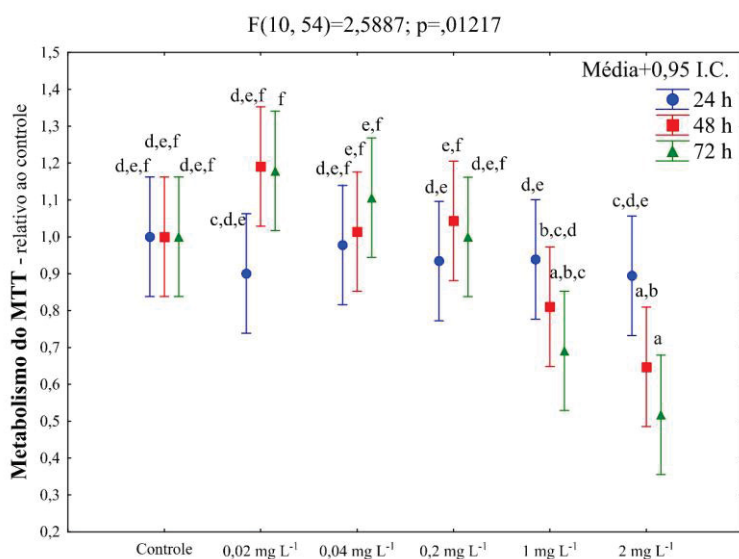
FIGURA 29 – ENSAIO DE ADESÃO CELULAR APÓS 24, 48 E 72 HORAS DE EXPOSIÇÃO AO CÁDMIO EM HEPATÓCITOS DE *O. niloticus*



NOTA: Decomposição efetiva da hipótese de ANOVA de duas vias para viabilidade celular de hepatócitos de *O. niloticus*. Ensaio de adesão celular após 24, 48 e 72 h de exposição ao Cd. As letras indicam diferenças entre as concentrações de Cd. Média+0,95 C.I. FONTE: O autor (2023).

Uma redução de ~30% e ~50% no metabolismo do MTT foi observada em hepatócitos expostos a 1 e 2 mg L⁻¹ de Cd, respectivamente, por 72 h (FIGURA 30).

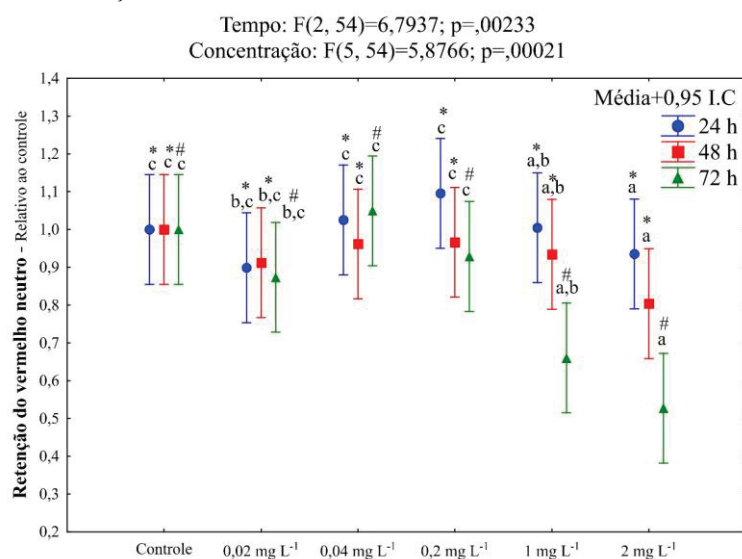
FIGURA 30 – ENSAIO DO METABOLISMO DE MTT APÓS 24, 48 E 72 HORAS DE EXPOSIÇÃO AO CÁDMIO EM HEPATÓCITOS DE *O. niloticus*



NOTA: Decomposição efetiva da hipótese de ANOVA de duas vias para viabilidade celular de hepatócitos de *O. niloticus*. Ensaio do metabolismo de MTT após 24, 48 e 72 h de exposição ao Cd. As letras indicam diferenças entre a interação de concentração e tempo de exposição. Média+0,95 C.I. FONTE: O autor (2023).

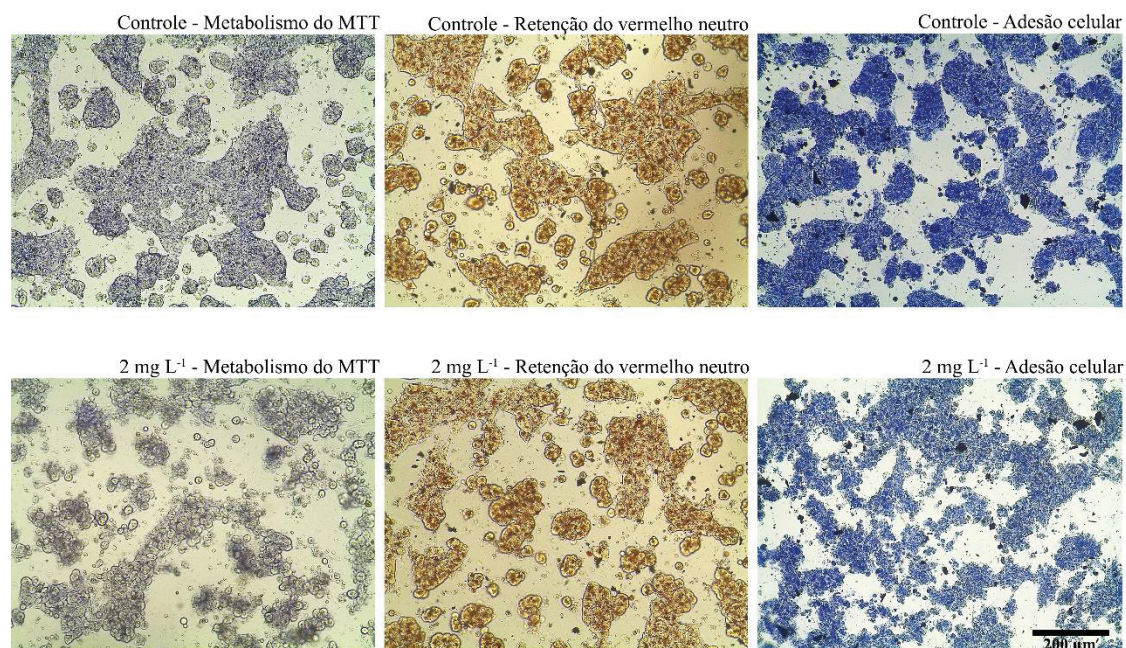
Uma redução de ~10% e ~25% na retenção do vermelho neutro foi observada em hepatócitos expostos a 1 e 2 mg L⁻¹ de Cd, respectivamente (FIGURA 31).

FIGURA 31 – ENSAIO DA RETENÇÃO DE VERMELHO NEUTRO APÓS 24, 48 E 72 HORAS DE EXPOSIÇÃO AO CÁDMIO EM HEPATÓCITOS DE *O. niloticus*



NOTA: Decomposição efetiva da hipótese de ANOVA de duas vias para viabilidade celular de hepatócitos de *O. niloticus*. Ensaio da retenção de vermelho neutro após 24, 48 e 72 h de exposição ao Cd. As letras indicam diferenças entre as concentrações de Cd e os símbolos (* e #) indicam diferenças entre os tempos de exposição quando não foi observada a interação entre os fatores. Média+0,95 C.I. FONTE: O autor (2023).

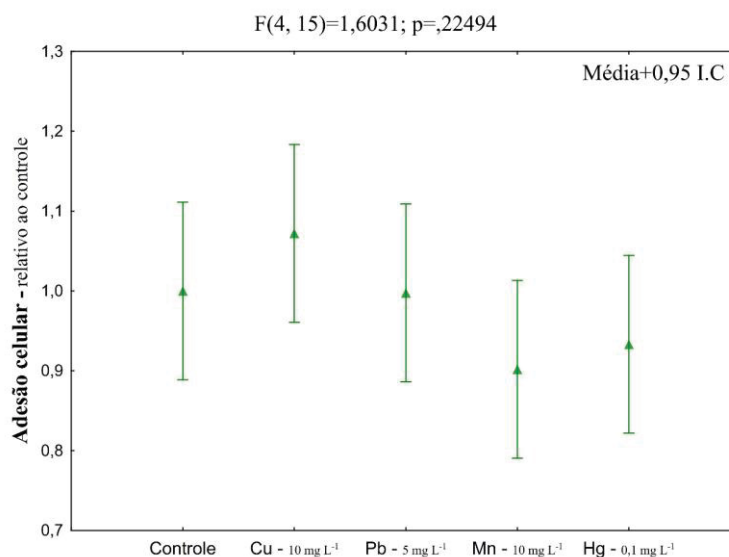
FIGURA 32 – IMAGENS DOS ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR DOS HEPATÓCITOS DE *O. niloticus* EXPOSTOS AO CÁDMIO



NOTA: Viabilidade celular de hepatócitos de *O. niloticus* expostos ao Cd. Ensaio de retenção do vermelho neutro, metabolismo do MTT e adesão celular após 72 h de exposição ao Cd. As imagens foram capturadas em microscópio de luz invertida (Leica Microsystems, Alemanha) após 72 h de exposição e exemplificam campos de cultivo imediatamente antes da extração do corante para quantificação meio de medição de absorbância em espectrofotômetro. Barra = 200 µm. FONTE: O autor (2023).

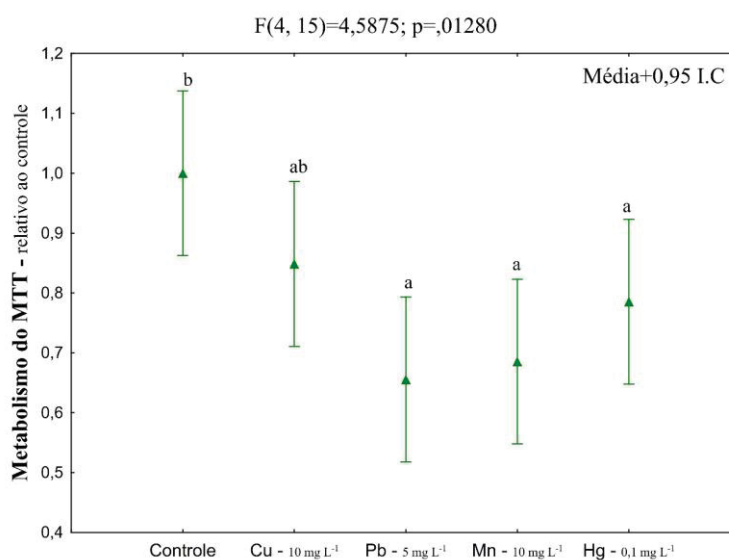
Em relação aos outros metais, não foram observadas alterações significativas na viabilidade celular nos hepatócitos expostos (FIGURAS 33, 35, 36), exceto pelo metabolismo do MTT que apresentou redução nos hepatócitos expostos ao chumbo, manganês e mercúrio (FIGURA 34).

FIGURA 33 – ENSAIO DE ADESÃO CELULAR APÓS 72 HORAS DE EXPOSIÇÃO AOS METAIS EM HEPATÓCITOS DE *O. niloticus*



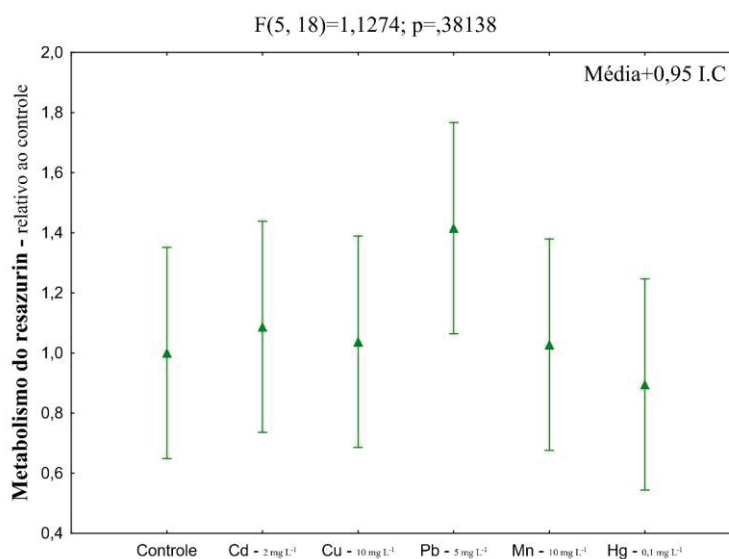
NOTA: Decomposição efetiva da hipótese de ANOVA para viabilidade celular de hepatócitos de *O. niloticus*. Ensaio de adesão celular após 72 h de exposição aos metais. Não foram observadas diferenças significativas. Média+0,95 C.I FONTE: O autor (2023).

FIGURA 34 – ENSAIO DO METABOLISMO DE MTT APÓS 72 HORAS DE EXPOSIÇÃO AOS METAIS EM HEPATÓCITOS DE *O. niloticus*



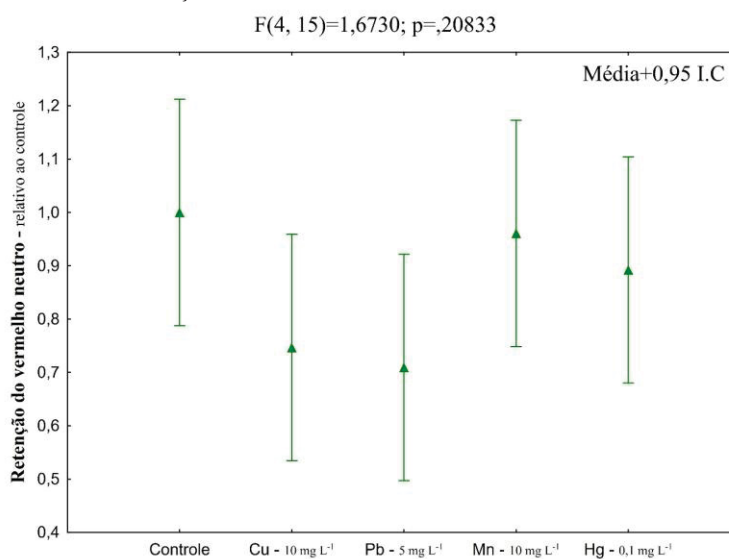
NOTA: Decomposição efetiva da hipótese de ANOVA para viabilidade celular de hepatócitos de *O. niloticus*. Ensaio do metabolismo de MTT após 72 h de exposição aos metais. As letras indicam diferenças entre a interação de concentração e tempo de exposição. Média+0,95 C.I. FONTE: O autor (2023).

FIGURA 35 – ENSAIO DO METABOLISMO DE RESAZURIN APÓS 72 HORAS DE EXPOSIÇÃO AOS METAIS EM HEPATÓCITOS DE *O. niloticus*



NOTA: Decomposição efetiva da hipótese de ANOVA para viabilidade celular de hepatócitos de *O. niloticus*. Ensaio do metabolismo de resazurin após 72 h de exposição aos metais. Não foram observadas diferenças significativas. Média+0,95 C.I. FONTE: O autor (2023).

FIGURA 36 – ENSAIO DO METABOLISMO DE RETENÇÃO DO VERMELHO NEUTRO APÓS 72 HORAS DE EXPOSIÇÃO AOS METAIS EM HEPATÓCITOS DE *O. niloticus*



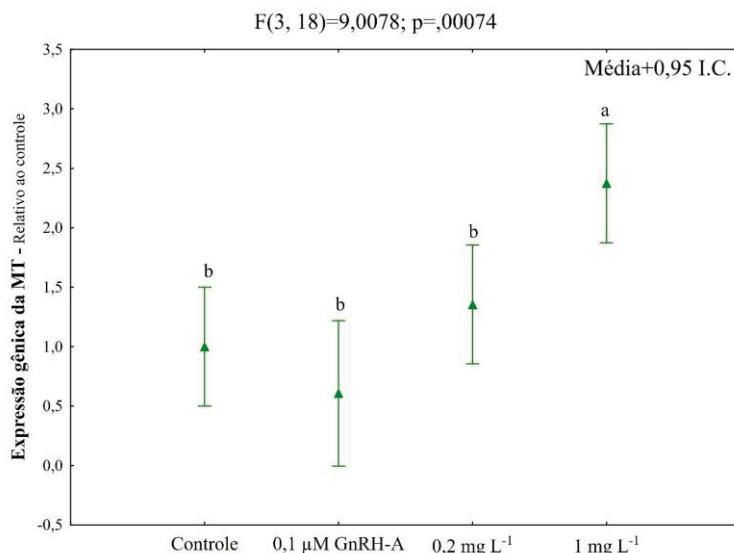
NOTA: Decomposição efetiva da hipótese de ANOVA para viabilidade celular de hepatócitos de *O. niloticus*. Ensaio do metabolismo de retenção do vermelho neutro após 72 h de exposição aos metais. Não foram observadas diferenças significativas. Média+0,95 C.I. FONTE: O autor (2023).

3.3 INDUÇÃO DE METALOTIONEÍNA

Para o nível de RNAm, um aumento de ~150% no conteúdo de MT foi observado em hepatócitos expostos a 1 mg L⁻¹ de Cd por 72 h (FIGURA 38). Nenhuma diferença foi observada nos hepatócitos expostos a 0,1 µM de GnRH-A. A visualização do nível

aumentado de MT por imunocitoquímica não foi possível. No entanto, foi observado um aumento do nível de fatores de transcrição metálica (FIGURA 39).

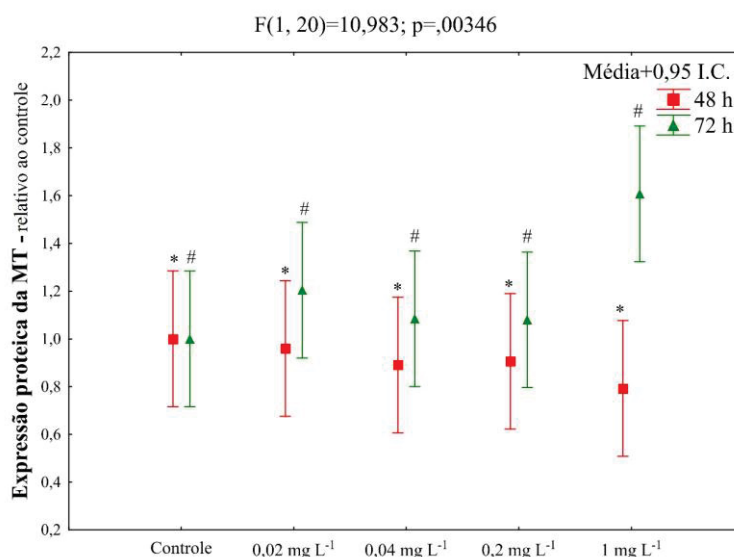
FIGURA 37 – INDUÇÃO DA METALOTIONEÍNA EM HEPATÓCITOS DE *O. niloticus* EXPOSTOS AO CÁDMIO A NÍVEL DE RNAm



NOTA: Decomposição efetiva da hipótese de ANOVA para indução da MT em hepatócitos de *O. niloticus* expostos ao Cd a nível de RNAm. As letras indicam diferenças entre as concentrações. Média+0,95 C.I.
 FONTE: O autor (2023).

Para o nível de proteína, um aumento de ~30% no conteúdo de MT foi observado em hepatócitos expostos a 1 mg L⁻¹ de Cd por 72 h em comparação com 48 h (FIGURA 37).

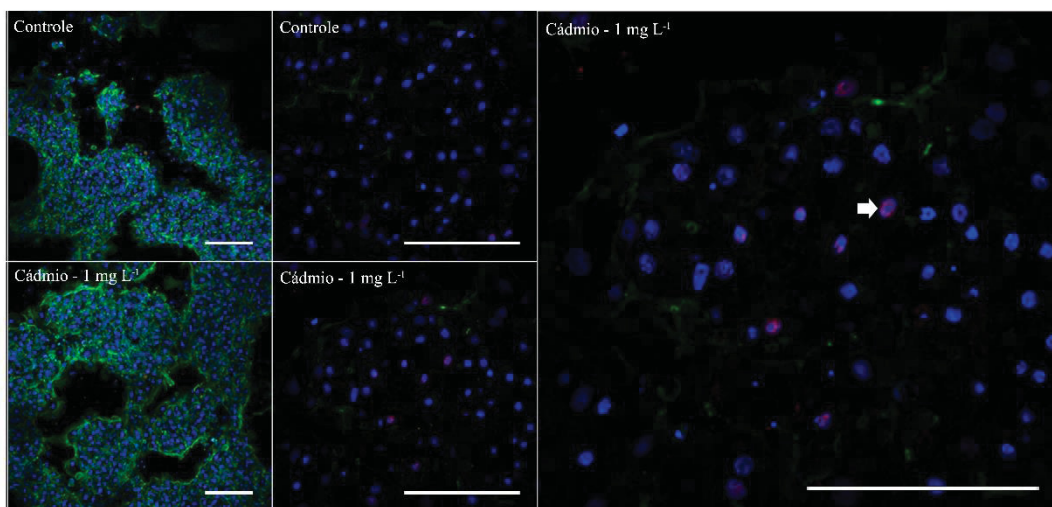
FIGURA 38 – INDUÇÃO DA METALOTIONEÍNA EM HEPATÓCITOS DE *O. niloticus* EXPOSTOS AO CÁDMIO A NÍVEL PROTEICO



NOTA: Decomposição efetiva da hipótese de ANOVA para indução da MT em hepatócitos de *O. niloticus* expostos ao Cd a nível proteico. Os símbolos (* e #) indicam diferenças entre os tempos de exposição

quando não foi observada a interação entre os fatores tempo e concentração. Média+0,95 C.I. FONTE: O autor (2023).

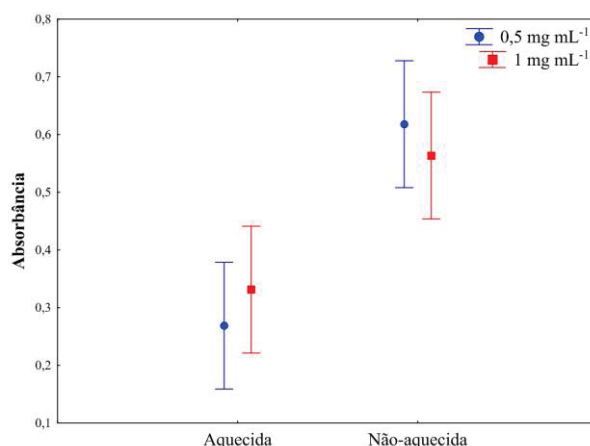
FIGURA 39 – INDUÇÃO DE FATORES DE TRANSCRIÇÃO METÁLICA EM HEPATÓCITOS DE *O. niloticus* EXPOSTOS AO CÁDMIO



NOTA: Indução de FTM em hepatócitos de *O. niloticus* expostos ao Cd. Ensaios de imunocitoquímica. Azul: núcleo celular marcado com DAPI. Verde: citoesqueleto de actina marcado com faloidina-FITC. Vermelho: FTM detectado com anticorpo secundário conjugado com Cy 3. Seta branca: aponta para a marcação vermelha, indicando a presença de FTM. Média+0,95 C.I. Barra = 100 μm . FONTE: O autor (2023).

No teste inicial, foi observado diferença entre os grupos controle e exposto tanto na amostra aquecida, quanto na amostra não aquecida, sendo que na última a diferença foi mais pronunciada (FIGURA 40).

FIGURA 40 – TESTE INICIAL DOS ANTICORPOS IgG POLICLONAIS ANTI METALOTIONEÍNA NO ENSAIO DE ELISA



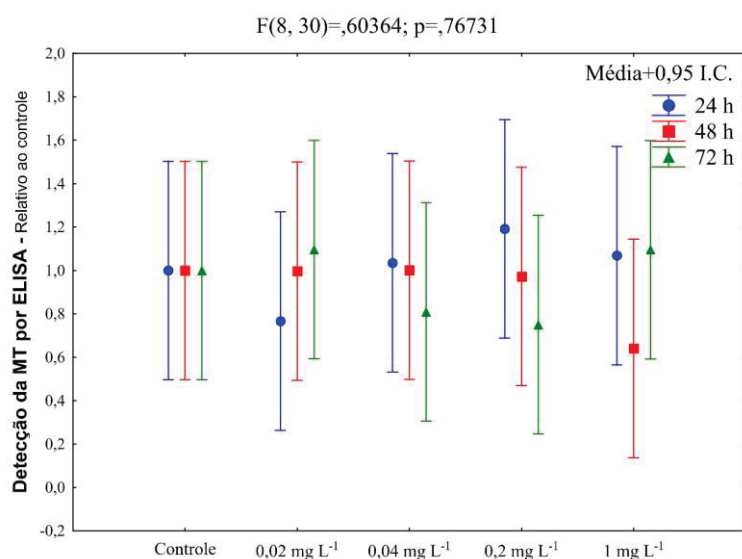
NOTA: Foram testadas 4 variáveis diferentes: amostra aquecida e não-aquecida e sensibilização com 0,5 mg mL⁻¹ e 1 mg mL⁻¹. FONTE: O autor (2023).

Além disso, foi testada a sensibilização dos poços das microplacas com 0,5 mg mL⁻¹ de proteína total porque se houvesse resultado satisfatório, facilitaria na logística

dos experimentos, em que seria possível usar a placa de 24 poços para expor e coletar as células, sendo que nenhuma das sensibilizações apresentaram resultados satisfatórios.

Ao contrário do esperado, não foram observadas diferenças nos níveis de MT em nenhuma das condições usadas: placa sensibilizada com $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ e com 1 mg mL^{-1} de proteína total (FIGURA 41). Os anticorpos usados foram IgG policlonais gerados contra a MT recombinante, obtida em bactéria, fusionada à proteína tiorredoxina e o gene sintético foi construído com base na sequência da MT de tilápia (NAGAMATSU et al., 2020).

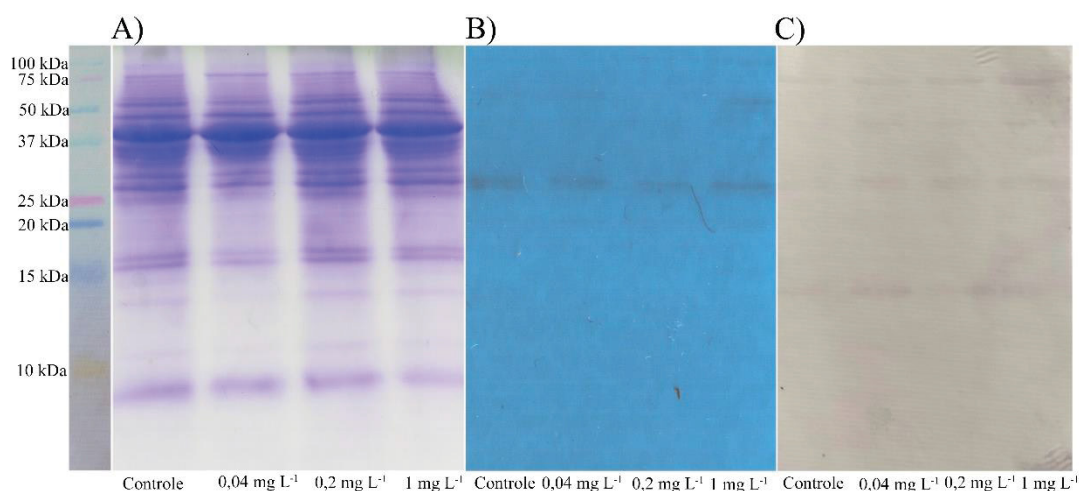
FIGURA 41 – ENSAIO DE ELISA PARA NÍVEIS DE METALOTIONEÍNA EM HEPATÓCITOS DE *O. niloticus* EXPOSTOS AO CÁDMIO



NOTA: Decomposição efetiva da hipótese de ANOVA de duas vias para ensaio de ELISA. Sensibilização com 1 mg mL^{-1} . Não foram observadas diferenças significativas. FONTE: O autor (2023).

Os anticorpos IgG policlonais foram testados para os hepatócitos expostos as concentrações de $0,04$; $0,2$ e 1 mg L^{-1} de Cd (FIGURA 42). Na revelação quimioluminescente (42 B), uma banda foi marcada em todos os grupos, com $\sim 28 \text{ kDa}$ e na concentração $0,5 \mu\text{M}$ de Cd uma banca ficou marcada em $\sim 60 \text{ kDa}$. Na revelação colorimétrica (42 C) foram marcadas bandas nas alturas de $\sim 14 \text{ kDa}$, $\sim 28 \text{ kDa}$, 40 kDa e 75 kDa . Dessas bandas é relatado na literatura a altura de 14 kDa para MT de tilápia devido a dimerização. As outras bandas estão fora da faixa descrita para MT de menos de 20 kDa (HAUSER-DAVIS et al., 2012).

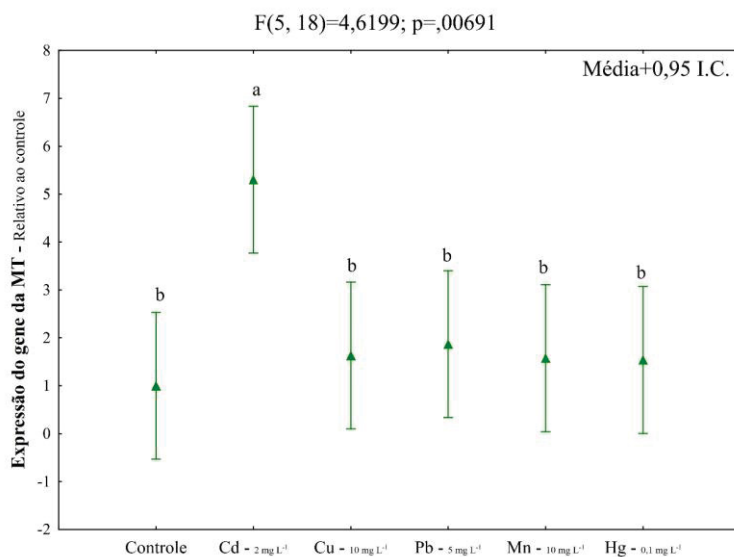
FIGURA 42 – ENSAIO DE *WESTERN BLOT* EM HEPATÓCITOS DE *O. niloticus* EXPOSTOS AO CÁDMIO



NOTA: Ensaio de *western blot* dos grupos expostos por 72 h a 0,04; 0,2 e 1 mg L⁻¹ de Cd, além do grupo controle. A) SDS-PAGE das proteínas não transferidas, coradas com *Coomassie blue R-250*. B) Revelação da membrana por quimioluminescência. C) Revelação da membrana por colorimetria. FONTE: O autor (2023).

Em relação a expressão gênica da MT nos grupos expostos as maiores concentrações de metais, só foi observada diferença significativa (~400%) nos níveis de RNAm da MT nos hepatócitos expostos ao Cd (FIGURA 43).

FIGURA 43 – INDUÇÃO DA METALOTIONEÍNA EM HEPATÓCITOS DE *O. niloticus* EXPOSTOS À METAIS A NÍVEL DE RNAm



NOTA: Decomposição efetiva da hipótese de ANOVA para indução da MT em hepatócitos de *O. niloticus* expostos ao Cd a nível de RNAm. As letras indicam diferenças entre as concentrações. Média+0,95 C.I. FONTE: O autor (2023).

4 DISCUSSÃO

4.1 MODELOS DE ESTUDO EM ECOTOXICOLOGIA

As atividades humanas levam à contaminação e subsequente poluição em vários ecossistemas (LYONS, 2014). O campo da toxicologia ambiental, que inclui testar a toxicidade de compostos químicos e a base química de doenças, evoluiu rapidamente. A integração da biologia molecular na toxicologia ambiental se tornou popular nas últimas décadas e a pesquisa celular e fisiológica sobre os mecanismos moleculares de ação forneceu *insights* fundamentais sobre os processos básicos de controle (STEGEMAN et al., 2010). Nesse contexto, tem sido reconhecida a importância do monitoramento da qualidade da água e da pesquisa em toxicologia ambiental usando biomarcadores, como a metalotioneína para investigar áreas contaminadas por metais (KADIM; RISJANI, 2022).

No presente estudo, foram utilizadas abordagens *in silico* e *in vitro* e duas espécies diferentes de peixes. Como os peixes são altamente sensíveis às mudanças ambientais, por viverem no ambiente aquático durante todas as fases da vida, eles são um bom modelo para monitorar os ecossistemas aquáticos, pois metabolizam, detoxificam e acumulam compostos químicos (SHAHJAHAN et al., 2022). Várias espécies de peixes podem ser usadas como modelo no monitoramento do potencial tóxico, no teste e na triagem qualitativa ou quantitativa de ambientes quanto à presença de níveis contaminantes, sendo que a seleção das espécies está principalmente relacionada à presença em determinada localização (KADIM; RISJANI, 2022; STEGEMAN et al., 2010). *D. rerio* já tem sido usado no campo da toxicologia ambiental por bastante tempo (STEGEMAN et al., 2010). *O. niloticus* também é uma espécie útil para uso como modelo experimental principalmente devido a características como resistência a diferentes sistemas de manejo, doenças, alta densidade e rápido crescimento (VICENTE et al., 2014).

4.2 IMUNOENSAIOS

Os anticorpos usados não apresentaram resultados satisfatórios nos ensaios de ELISA e *western blot*. Esses anticorpos foram produzidos contra proteínas obtidas em bactérias e que, portanto, não possuem as modificações pós-traducionais, que os peixes

possuem, o que influencia no reconhecimento antígeno-anticorpo (NAGAMATSU et al., 2020). Para melhorar a sensibilidade e especificidade desses anticorpos foi necessário isolar os epítomos que reconhecem a proteína nativa de *O. niloticus*. Em projeto paralelo, foi feita a purificação e biotinizilação desses anticorpos, de forma que a sensibilidade ficou adequada. Contudo, como o controle positivo (hepatócitos expostos ao cádmio) não apresentou diferença em relação ao controle, não foi possível validar o modelo usando esses anticorpos. Provavelmente, a especificidade ainda estava baixa, visto que foi observada diferença nos níveis de MT pelo método indireto (FIGURA 37) e níveis de RNAm da MT por RT-qPCR, quando as células foram expostas ao cádmio (FIGURA 38). Então, apesar da possibilidade das bandas observadas no ensaio do *western blot* não serem artefatos, mas sim oligômeros (DONDERO et al., 2004), é possível que se tratem de ligação inespecífica, devido ao resultado do ensaio de ELISA (FIGURA 41) e da imunocitoquímica para a metalotioneína (resultado não apresentado).

4.3 ESTUDO DE SÍTIOS DE LIGAÇÃO DE METAIS, DOCKING MOLECULAR E EXPRESSÃO GÊNICA DA MT

As interações entre proteínas e íons metálicos específicos são essenciais em muitos processos bioquímicos e fisiológicos (FOSTER et al., 2022; GRÜNGREIFF et al., 2016). Os metais são necessários em proteínas específicas para conferir estrutura (p. ex., dedos de zinco) ou para auxiliar a catálise atuando como cofatores em enzimas (FOSTER et al., 2022). Metade das enzimas estruturalmente caracterizadas por experimentos no banco de dados de proteínas precisa de metais (WALDRON et al., 2009). Excessos de sítios de ligação de metais competem por quantidades limitantes de metais “trocáveis” em condições biológicas normais. Portanto, a ligação aberrante de um metal a proteínas, o que pode alterar a estrutura da proteína não é comum (FOSTER et al., 2022).

Considerando o mecanismo de indução de MT, a busca pelos melhores indutores foi possível com base no potencial de ligação com proteínas de ligação ao Zn usando o servidor MIB2 (LU et al., 2022). O cádmio apresentou o melhor *score* de ligação ($Cd^{2+} > Cu^{2+} > Pb^{2+} > Mn^{2+} > Hg^{2+}$) para sítios de ligação de Zn no presente estudo (FIGURA 26). De fato, é bem relatado que o cádmio é um potente indutor de MT (ATLI; CANLI, 2008; CHOUCHENE et al., 2022; NURSANTI et al., 2017). Um aumento de ~150% e ~400% nos níveis de RNAm da MT foi observado em hepatócitos expostos a 1 mg L⁻¹ de Cd e 2 mg L⁻¹, respectivamente, por 72 h (FIGURAS 38, 43) no presente estudo, enquanto

que não foram observadas diferenças significativas nos níveis de RNAm da MT nos hepatócitos expostos aos demais metais (FIGURA 43). Um aumento semelhante nos níveis da MT foi observado em outros estudos: em ~ 300% em hepatócitos NCTC expostos ao Cd em concentrações de 0,5 μM por 24 h (SHEN et al., 2019), em ~150% em fígado de *zebrafish* fêmeas (*Danio rerio*) expostas ao Cd em concentrações de 2,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ por 15 semanas (ZHU et al., 2018), e em ~200% no fígado de juvenis de carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*) sob condições subletais de exposição a Cd (1/10 da CL50, 1,495 mg L^{-1} , 28 dias) (JABEEN et al., 2022).

No presente estudo, um aumento de ~30% no conteúdo de MT (proteína) foi observado em hepatócitos expostos a 1 mg L^{-1} de Cd por 72 h em comparação com 48 h. O ensaio usado para detectar a MT indiretamente consiste em acessar o conteúdo de resíduos de -SH usando o reagente de Ellman em 412 nm, uma vez que MTs são caracterizados por um alto teor de cisteínas (aproximadamente 20-30%) quando comparado a outras proteínas presentes em extratos etanólicos (VIARENGO et al., 1997). As etapas do método consistiram em desestabilização dos aglomerados metálicos da MT, eliminação de possíveis contaminantes (tióis de baixa massa molecular como GSH e cisteína e, agentes redutores como o β -mercaptoetanol), remoção dos cátions metálicos ainda ligados ao MT, liberando os grupos -SH para reagir com o DTNB e desnaturação de MTs para ajudar a expor os grupos -SH da proteína (VIARENGO et al., 1997). Zhu et al. (2018) também usaram o método indireto para quantificar o conteúdo de MT no fígado de *zebrafish* fêmea exposto ao Cd por 15 semanas e observaram um aumento de ~100% e ~300% do conteúdo de MT para 2,5 e 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ de concentrações de Cd, respectivamente.

4.4 PAPEL DO ZINCO NO MECANISMO DE INDUÇÃO DA MT E *INSIGHTS* SOBRE COMO O CÁDMIO INTERFERE

O zinco é um elemento essencial, crítico para um grande número de proteínas estruturais, processos enzimáticos e fatores de transcrição, que desempenha papéis fundamentais no metabolismo celular, atuando principalmente por ligação a uma ampla gama de proteínas, e afetando vários processos biológicos, que incluem divisão, crescimento e diferenciação celular (GRÜNGREIFF et al., 2016). O zinco também medeia o equilíbrio intracelular de íons metálicos (DONG et al., 2015). Alterações na concentração intracelular de Zn^{2+} influenciam na estrutura do fator de transcrição metálica 1 (FTM-1), que é ativado pela ligação de Zn^{2+} aos seis dedos de zinco, um

domínio metalorregulador de ligação ao DNA (DONG et al., 2015; GÜNTHER et al., 2012). O FTM-1 ativado induz a expressão do gene da metalotioneína (DONG et al., 2015). Outros metais não atuam diretamente sobre o FTM-1, mas como podem se ligar a outras proteínas ligantes de Zn, podem substituir esse metal, provocando um aumento da concentração intracelular de Zn^{2+} (ROESIJADI, 1992). No presente estudo, foi observado níveis aumentados de FTMs nos hepatócitos expostos ao Cd por meio do ensaio de imunocitoquímica (FIGURA 39).

Além disso, as funções gerais de algumas proteínas de ligação ao Zn identificadas, com as quais o cádmio apresentou grande afinidade, foram: resposta ao estresse, processo biossintético, transporte, processo metabólico, atividade catalítica, organização do citoesqueleto de microtúbulos e processamento do RNA. Em consequência, o Cd pode desregular essas funções por meio de distúrbios metabólicos que podem contribuir para a toxicidade do Cd. Hu et al. (2021); Hu et al. (2022) mostraram que níveis ambientalmente relevantes de Cd induzem respostas adaptativas com mecanismos compensatórios em *D. rerio* e *O. niloticus*, o que pode ajudar a manter a sobrevivência dos peixes às custas do crescimento. Hu et al. (2022) observaram aumento nos níveis proteicos de MT e proteína de choque térmico HSP70, e nos níveis de RNAm de Cu,Zn-superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase, MT e HSP70 e sugerem que as vias que interferiram podem ser respostas compensatórias após estresse oxidativo, estresse do retículo endoplasmático e apoptose para resistir a efeitos negativos após a exposição ao Cd.

Finalmente, entender como os biomarcadores de contaminação por metais são expressos em diferentes tecidos (SHAHJAHAN et al., 2022; SHEN et al., 2019) e a diferença na capacidade de resposta à exposição a diferentes metais (CHAN et al., 2006; CHATTERJEE et al., 2016; NURSANTI et al., 2017; OLSSON, 1996; YUDKOVSKI et al., 2008; ZHANG, F. et al., 2022) é importante para interpretar os níveis de MT encontrados em peixes teleósteos no monitoramento da qualidade da água e na pesquisa em toxicologia ambiental.

5 CONCLUSÃO

Os metais pesados têm diferentes potenciais para induzir a expressão de metalotioneína em peixes e este estudo mostrou que o cádmio é um potente indutor de MT em hepatócitos de *Oreochromis niloticus*. Uma possível explicação para o cádmio ser um bom indutor é que esse metal deixa o zinco livre para se ligar ao fator de transcrição metálica que, na forma ativa, interage com as sequências dos elementos de regulação metálica no promotor da MT, transcrevendo o gene. O cádmio deixa o zinco livre porque tem mais afinidade do que outros metais a vários sítios de ligação ao zinco em proteínas relacionadas a diferentes processos celulares, como foi observado nos *scores* de ligação entre metais pesados e proteínas de *Danio rerio*. por *docking* molecular.

CAPÍTULO III

**COMO AGROTÓXICOS INTERFEREM NA RESPOSTA CELULAR À
EXPOSIÇÃO A METAIS: UMA ABORDAGEM PROTEÔMICA USANDO
LARVAS DE *Danio rerio* COMO MODELO**

RESUMO

Ao longo dos anos, o aumento da população humana e a expansão das atividades agrícolas e industriais levaram ao aumento na concentração de contaminantes, como metais e agrotóxicos, nos ecossistemas aquáticos. Para estudar o potencial tóxico desses contaminantes, são utilizados, p. ex., biomarcadores avaliados na biota. Um desses biomarcadores é a metalotioneína (MT), uma proteína que responde principalmente ao estresse causado por metais em organismos aquáticos, como peixes. No entanto, outras classes de contaminantes podem interferir no mecanismo de indução da MT. Com isso, o objetivo do presente estudo foi identificar como interferentes atuam no mecanismo de indução da MT por metais, o que pode ser importante para a validação da MT enquanto biomarcador de contaminação e poluição por metais. Para isso, larvas de *Danio rerio* foram utilizadas como modelo experimental e adotada uma abordagem proteômica. Os embriões foram expostos a concentrações de 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cloreto de cádmio, 1 mg L^{-1} de diclorvós e 0,01 $\mu\text{g L}^{-1}$ de deltametrina até 96 horas após a fertilização. Ao analisar as proteínas e fosfoproteínas diferencialmente expressas tanto nas larvas expostas ao cádmio quanto ao diclorvós, foi sugerido que ambos os contaminantes podem ter causado um desequilíbrio inicial no sistema antioxidante, o que poderia ter contribuído para a regulação da MT, que apresenta um papel redox e pode ser regulada por fontes de estresse oxidativo.

Palavras-chave: *Zebrafish*. Biomarcador. Metal. Espécies reativas de oxigênio.

ABSTRACT

Over the years, the increase in the human population and the expansion of agricultural and industrial activities have led to the accumulation of contaminants, such as metals and pesticides, in aquatic ecosystems. In order to study the toxic potential of these contaminants and pollutants in aquatic ecosystems, biomarkers found in biota are used. An example of a biomarker is metallothionein (MT), a protein that primarily responds to stress caused by metals in aquatic organisms such as fish. However, other types of contaminants can interfere with the general mechanism of MT induction. Thus, the aim of the present study was to identify how interferents act on the commonly observed mechanism of MT induction by metals, which may be important for the validation of MT as a biomarker of contamination and pollution by metals. For this, *Danio rerio* larvae were used as an experimental model and a proteomic approach was adopted. Embryos were exposed to concentrations of $100 \mu\text{g L}^{-1}$ of cadmium chloride, 1 mg L^{-1} of dichlorvos and $0.01 \mu\text{g L}^{-1}$ of deltamethrin up to 96 hours after fertilization. By analyzing the proteins and phosphoproteins differentially expressed both in larvae exposed to cadmium and dichlorvos, it was suggested that both contaminants may have caused an initial imbalance in the antioxidant system, which could have contributed to the regulation of MT, which has a redox role and can be regulated by sources of oxidative stress.

Keywords: Zebrafish. Biomarker. Metal. Reactive oxygen species.

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONTEXTUALIZAÇÃO

O crescimento da população humana e a expansão das atividades agrícolas e industriais têm resultado no acúmulo de contaminantes, como metais e agrotóxicos, nos ecossistemas aquáticos (LYONS, 2014; WALTERS et al., 2011). Como a análise química isolada pode não ser suficiente para avaliar o potencial de toxicidade dos contaminantes e poluentes, dada a complexidade dos ecossistemas aquáticos, o uso de sistemas biológicos é imprescindível para determinar o nível seguro de resíduos despejados em rios, lagos e mares. Os peixes são excelentes modelos para esse propósito, uma vez que são vertebrados que passam todas as fases da vida na água (BOLIS et al., 2001; ZHOU et al., 2019). O estudo com esse modelo pode fornecer informações cruciais para compreender os efeitos dos contaminantes nos ecossistemas aquáticos e, assim, contribuir para o desenvolvimento de estratégias mais eficazes na preservação dos ambientes naturais.

Os níveis de metais pesados são frequentemente uma preocupação na ecotoxicologia aquática (FILIPICĚ, 2012; GOVIND; SHARMA, 2014; TCHOUNWOU et al., 2012). Embora esses elementos possam ter origem natural, a contribuição mais significativa em muitos ecossistemas aquáticos provém de atividades humanas, tais como exploração e processamento de minérios, descarga de efluentes domésticos e industriais, queima de combustíveis fósseis e a lixiviação de bacias hidrográficas que carregam produtos utilizados na agricultura (TCHOUNWOU et al., 2012). Os organismos vivos podem acumular traços de metais quando esses elementos são absorvidos e armazenados em ritmo mais acelerado do que são excretados, o que pode trazer sérias consequências para a saúde dos ecossistemas aquáticos e até mesmo afetar a cadeia alimentar, tornando essencial o monitoramento com o objetivo de mitigar os efeitos desses metais nos ambientes aquáticos (GOVIND; SHARMA, 2014).

Os níveis de agrotóxicos nos ecossistemas aquáticos também tem sido motivo de preocupação (BONNER; ALAVANJA, 2017; CARVALHO, 2006). O objetivo do emprego de agrotóxicos é o aumento da produção mundial de alimentos por meio da redução das populações de plantas daninhas, pragas e doenças (CARVALHO, 2006). Essa classe abrange os inseticidas, fungicidas, herbicidas, acaricidas, nematicidas, substâncias destinadas para uso como reguladores de crescimento, feromônios,

desfolhantes e protetores de sementes (CARVALHO, 2006; GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ et al., 2008). Entre os inseticidas, o diclorvós, um inseticida organofosforado, e a deltametrina, um inseticida piretróide de segunda geração, se tornaram escolhas populares para controle de pragas agrícolas e domésticas (CEYHUN et al., 2012).

A incidência de problemas de saúde relativos à utilização de agrotóxicos começou a ser notificada a partir da década de 1960 com a contaminação por organoclorados, que tiveram o uso de alguns compostos proibido no Brasil em 1985 (ARAÚJO et al., 2007). Desde então, várias alternativas vêm sendo criadas no sentido de reduzir a necessidade do uso de agrotóxicos, mas algumas mudanças, como o advento de alimentos transgênicos resistentes a algumas pragas não resultaram na redução de algumas classes, como no caso dos herbicidas, uma vez que não impedem o desenvolvimento de plantas daninhas no campo (AMARANTE JUNIOR et al., 2002). Resíduos de muitos agrotóxicos podem persistir nos solos, alimentos e na água, expondo tanto populações humanas como a biota em geral (CARVALHO, 2006).

Biomarcadores podem ser detectados na biota e contribuir para o estudo do potencial tóxico de contaminantes e poluentes em ecossistemas aquáticos (STRIMBU; TAVEL, 2010). Entre os possíveis biomarcadores de contaminação e poluição aquática em programas de biomonitoramento está a metalotioneína (MT), considerada uma proteína responsiva principalmente ao estresse causado por metais em organismos como peixes (VIARENGO et al., 1999). Contudo, outras classes de contaminantes podem interferir no mecanismo geral de indução por metais de modo que verificar a responsividade da indução da MT em peixes por múltiplos contaminantes ambientais é importante para entender e validar a MT enquanto biomarcador de contaminação e poluição por metais.

Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo determinar como agrotóxicos atuam no mecanismo de indução da MT e comparar com o comumente observado de indução por metais, usando larvas de *Danio rerio* como modelo experimental.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 *Objetivo geral*

- Distinguir como agrotóxicos e metais atuam no mecanismo de indução da MT.

1.2.2 *Objetivos específicos*

- Expor embriões de *D. rerio* a concentrações subletais de cádmio e dos inseticidas diclorvós e deltametrina na indução da expressão da metalotioneína;
- Identificar as proteínas diferencialmente expressas nas larvas de *D. rerio* expostas aos contaminantes;
- Avaliar, por meio de bioinformática, possíveis mecanismos em que os agrotóxicos atuam para induzir a expressão da metalotioneína.

2 MATERIAL E MÉTODOS³

2.1 SELEÇÃO DOS AGROTÓXICOS USANDO O MODELO DE HEPATÓCITOS DE *O. niloticus*

Com o objetivo de avaliar quais contaminantes seriam potenciais indutores da MT, inicialmente se pensava em quantificar os níveis da MT em hepatócitos de *O. niloticus* depois de expostos a múltiplos contaminantes ambientais por meio da técnica de ELISA. Contudo, como os anticorpos produzidos pelo grupo de pesquisa ainda não estavam com sensibilidade e especificidade suficientes para detectar diferença nos níveis do biomarcador, foi optado pela técnica de RT-qPCR.

Os hepatócitos de *O. niloticus* foram expostos a concentrações com relevância ambiental de agrotóxicos amplamente utilizados no Brasil, deltametrina (0,19 μM), diclorvos (0,09 μM), fenhexamid (1,32 μM) e fludioxonil (1,6 μM), além de mistura de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, HPAs⁴ (0,2 $\mu\text{g L}^{-1}$). A seleção da concentração intermediária (CI) dos agrotóxicos foi baseada nos dados de ingestão diária aceitável (IDA), disponibilizados pela agência nacional de vigilância sanitária (ANVISA). A seleção da CI para HPAs foi feita com base na concentração ambiental (BARRETO et al., 2020). A partir da CI, os hepatócitos foram expostos a uma concentração 10 vezes maior. Para todos os contaminantes, foi adicionado um grupo controle do experimento (meio de cultivo com o volume de H₂O ou dimetil sulfóxido (DMSO) correspondente ao volume de H₂O ou DMSO + contaminante dos grupos expostos).

A relação de potenciais indutores da MT, descritos na literatura científica, estão apresentados na TABELA 4.

³ Para protocolos detalhados, consulte o anexo 4.

⁴ Acenafteno, acenaftileno, antraceno, benz(a)antraceno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(ghi)perileno, benzo(a)pireno, crisene, dibenz(a,h)antraceno, fluoranteno, fluoreno, indeno(1,2,3-cd)pireno, 1-metilnaftaleno, 2-metilnaftaleno, naftaleno, fenantreno e pirene (Sigma-Aldrich, ref. CRM47543).

TABELA 4 – LISTA DE POTENCIAIS INDUTORES DA MT

Químicos que alteram os níveis de MT			
	Autores	Modelo experimental	Dose/Concentração
Metronidazol	Bauman et al. (1991)	Camundongo CF-1 macho	7.0 mM kg ⁻¹
Cisplatina	Bauman et al. (1991)	Camundongo CF-1 macho	26 µM kg ⁻¹
3-Metilindol	Bauman et al. (1991)	Camundongo CF-1 macho	3.6 mM kg ⁻¹
Maleato de dietila	Bauman et al. (1991)	Camundongo CF-1 macho	5.3 mM kg ⁻¹
	Bauman et al. (1992)	Hepatócitos de amundongo CF-1	1000 Mm
Hidroperóxido de t-butilo	Bauman et al. (1991)	Camundongo CF-1 macho	1.3 mM kg ⁻¹
Menadiona	Bauman et al. (1991)	Camundongo CF-1 macho	0.5 mM kg ⁻¹
Diamida	Bauman et al. (1991)	Camundongo CF-1 macho	1.8 mM kg ⁻¹
Adriamicina	Bauman et al. (1991)	Camundongo CF-1 macho	1.0 mM kg ⁻¹
Paraquat	Lim et al. (2015)	Camundongo C57BL/6N macho	0.2, 1.0 e 5.0 mg kg ⁻¹
	Bauman et al. (1991)	Camundongo CF-1 macho	0.3 mM kg ⁻¹
	Bauman et al. (1992)	Camundongo CF-1 macho	0.1; 0.3 e 0.5 mM kg ⁻¹
Diquat	Bauman et al. (1991)	Camundongo CF-1 macho	0.1 mM kg ⁻¹
Isoproteron	Mosleh et al. (2003)	<i>Tubifex tubifex</i> (Oligochaete)	0.1, 1, e 10 mg L ⁻¹
Fenhexamida	Mosleh et al. (2005)	<i>Tubifex tubifex</i> (Oligochaete)	0.1; 1 e 10 mg L ⁻¹
Deltrametrina	Erdoğan et al. (2011)	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	0.25, 1 e 2.5 µg L ⁻¹
	Ceyhun et al. (2012)	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	0.6 mg L ⁻¹
Diclorvos	Ceyhun et al. (2012)	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	1.6 mg L ⁻¹

FONTE: O autor (2023).

2.2 CRIAÇÃO DOS EXEMPLARES DE *D. rerio* E COLETA DOS OVOS⁵

Peixes adultos da linhagem tipo selvagem (AB) de *zebrafish* foram mantidos em sistema de circulação automática a 26 °C e ciclo claro/escuro de 14h/10h. A água fornecida ao sistema foi filtrada por osmose reversa (pH 7,8) e o sal Instant Ocean® foi adicionado à água para aumentar a condutividade para 500 µS cm⁻¹. Os peixes adultos foram alimentados duas vezes ao dia com artemias vivas e ração seca em flocos. Embriões saudáveis foram obtidos a partir da desova de peixes adultos. Primeiro, os adultos foram

⁵ Como essa etapa do estudo foi desenvolvida na Dinamarca, não foi necessária autorização do comitê de ética no uso de animais, pois a legislação difere da do Brasil para o uso de larvas de peixe.

mantidos em tanques durante a noite com proporção sexual de machos/fêmeas, 1:1. Em seguida, os embriões foram coletados dentro de 1 h após a desova e lavados. Os embriões fertilizados foram inspecionados usando estereomicroscópio.

2.3 TESTE DE TOXICIDADE

O teste *Fish Embryo Acute Toxicity* (FET) foi conduzido de acordo com as diretrizes número 236 da OECD (BUSQUET et al., 2013) e usando uma concentração para cada contaminante: cloreto de cádmio (Cd, Sigma-Aldrich, ref. 655198), diclorvós (DDVP, Sigma-Aldrich, ref. 45441) e deltametrina (DTM, Sigma-Aldrich, ref. 05995) para confirmar os resultados encontrados em estudos anteriores que indicavam essas concentrações como subletais. Um ovo fertilizado foi colocado em cada poço de placas de 24 poços: 20 ovos foram expostos a concentrações subletais de cádmio e agrotóxicos, e quatro ovos não expostos foram usados como controles internos da placa. As concentrações testadas foram baseadas em concentrações subletais para embrião de *D. rerio*: 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cloreto de cádmio (CHOUCHE et al., 2022; XU et al., 2022), 1 mg L^{-1} de diclorvós (STENGEL et al., 2018) e 0,01 $\mu\text{g L}^{-1}$ de deltametrina (LIU et al., 2018) em água do sistema. Uma placa adicional contendo embriões expostos a 4 mg L^{-1} de 3,4-dicloroanilina (3,4-DCA) em água do sistema foi utilizada como controle positivo para o teste FET. Duas placas adicionais contendo embriões expostos aos veículos usados para diluir os contaminantes (água e DMSO) em água do sistema também foram incluídas. Ovos viáveis de 4 hpf (horas pós-fertilização) foram selecionados e expostos aos contaminantes até 96 hpf. Os embriões foram analisados quanto à sobrevivência e eclosão, e as soluções de exposição foram renovadas a cada 24 h. Após 96 hpf, os *endpoints* apicais foram analisados (coagulação, ausência de formação de somitos, ausência de desprendimento da cauda, broto do saco vitelino e ausência de batimentos cardíacos) sob estereomicroscópio e as imagens foram capturadas. As larvas sobreviventes foram sacrificadas com etanol e descartadas.

2.4 EXPOSIÇÃO DOS EMBRIÕES PARA AS ANÁLISES DE PROTEÔMICA, WESTERN BLOT E QUANTIFICAÇÃO DE ZINCO

Para as análises de proteômica, *western blot* e quantificação de zinco, 100 embriões de 4 hpf foram colocados em béqueres contendo 100 mL de Cd 100 $\mu\text{g L}^{-1}$, 100

mL de DDVP 1 mg L⁻¹ e 100 mL de DTM 0,01 µg L⁻¹, além dos controles negativos água e solvente (DMSO 0,1%) em água do sistema. As soluções foram renovadas a cada 24 h para evitar variação significativa no meio de exposição e os embriões mortos foram removidos e descartados. Após 96 h de exposição, 30 larvas sobreviventes foram coletadas para proteômica e *western blot*, e 10 para quantificação de zinco. Depois foram lavadas e transferidas para criotubos, congeladas por imersão em nitrogênio líquido e armazenadas em *ultrafreezer* até as análises. Cada grupo experimental compreendeu quatro réplicas. As larvas restantes foram eutanasiadas com etanol e descartadas.

2.5 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNA TOTAL

Para a extração das proteínas, 30 larvas de 4 réplicas de cada grupo experimental (controle-água, controle-DMSO, Cd, DDPV e DTM) foram homogeneizados adicionando 350 µL de tampão de lise (uréia 5 M, Tris- HCl 50 mM pH 8,2, MgCl₂ 2 mM e inibidores de protease) e grânulos de cerâmica aos microtubos e em seguida processadas em homogeneizador de tecidos (FastPrep-24™ 5G, 3 ciclos de 40 seg, com intervalo de 3 min). O volume de 1 µL (~25U) de benzonase foi adicionado a cada amostra e mantida em gelo por 1,5 h. Após centrifugação a 16.000 g por 30 min a 4 °C, 150 µL do sobrenadante foram transferidos para dois tubos diferentes que foram combinados posteriormente, e receberam 660 µL, 4,4:1 (v/v), de etanol 96% gelado. Em seguida, 600 µL, 4:1 (v/v) do volume inicial da amostra, de acetona gelada foram adicionados. As amostras foram mantidas em -20 °C *overnight* e centrifugadas a 20.000 g por 15 min a 2 °C. O sobrenadante foi removido, 500 µL de água, etanol e acetona (1:2:2) foram adicionados. As amostras foram mantidas por 1,5 h a -20 °C, centrifugadas como descrito anteriormente e o sobrenadante descartado. Os tubos foram mantidos abertos na capela de exaustão por cerca de 30 min para evaporar a acetona residual. Finalmente, o *pellet* foi solubilizado em 100 µL de tampão de diluição da amostra (uréia 5 M, Tris-HCl 50 mM, pH 8,2) e a concentração de proteína quantificada usando o kit BCA.

2.6 WESTERN BLOT

As amostras (20 µg de proteína total) foram transferidas para tubos de baixa ligação. Tampão de diluição da amostra (uréia 5 M, Tris-HCl 50 mM pH 8,2) foi

adicionado até perfazer 10 μL de volume por tubo. Quantidade apropriada de tampão de amostra NuPage™, água e agente redutor de amostra foram misturados (1:0,9:0,1) e 10 μL de tampão de amostra foram adicionados às amostras de proteína. As amostras foram aquecidas a 70°C por 10 min sob agitação, centrifugadas à temperatura ambiente e adicionadas aos poços de gel de poliacrilamida 12%. Foram usados 3 μL de *ladder*, a eletroforese ocorreu a 160 V (SDS-PAGE) e a transferência das proteínas para membrana de PVDF a 25 V por 10 min. Antes da eletrotransferência usando o sistema de transferência Trans-Blot Turbo™, o gel foi equilibrado em tampão *Towbin* por 10 min e a membrana PVDF foi ativada por 1 min em metanol e transferida para tampão *Towbin* até o uso. Após o término da transferência, a membrana foi mantida em solução de *Ponceau-S* 0,2% por 5 min para avaliação da eficiência da transferência e descorada sob agitação suave em água.

A membrana foi incubada em 5 mL de tampão de bloqueio (BSA 3% em TBS-T) em tubo de 50 mL por 1 h com rotação e depois incubada com anticorpos primários anti-MT (1:1000, Invitrogen, MA1-25479) em tampão de bloqueio *overnight* com rotação a 4°C. A membrana foi lavada 3 vezes em TBST por 15 min e incubada com anticorpos secundários IgG-HRP de coelho anti-camundongo (1:5000, Abcam, ab6728) em TBS-T por 2 h, lavada novamente 3 vezes em TBS-T por 15 min e uma vez em TBS por 15 min. O volume de 500 μL de substrato HRP (Immobilon® Forte) foi usado para uma membrana inteira, que foi incubada por 2 a 5 min em temperatura ambiente. O excesso de substrato foi drenado, a membrana foi transferida para uma folha protetora e para a câmera CCD (Amersham™ 680 Imager). Em seguida, os anticorpos foram removidos com solução de *stripping*, as membranas foram lavadas e mantidas em solução de bloqueio por 1 h, incubadas com anticorpos anti-actina β (1:5000, Invitrogen, PA5-98583) por 1 h, lavadas e a proteína de referência detectada como descrito anteriormente. Para a quantificação foi usado ImageJ (SCHNEIDER et al., 2012).

2.7 PROTEÔMICA E FOSFOPROTÊOMICA

2.7.1 Redução e alquilação

A solução de redução e alquilação (concentração final de 10 Mm de tris(2-carboxietil)fosfina e 40 mM de 2-Cloroacetamida) foi adicionada a 100 μg de proteínas totais por amostra e mantida em temperatura ambiente por 1 h.

2.7.2 Digestão de proteínas

As amostras de proteína foram diluídas com Tris-HCl 50 mM, pH 8,2 para atingir 1 M de ureia. Tripsina (HEISSEL et al., 2019) foi adicionada às amostras (1:50, enzima: proteína total), que foram mantidas a 37° C. Após 4 h, mais tripsina (1:100, enzima: proteína total) foi adicionada e as amostras mantidas a 37°C *overnight*. Finalmente, ácido trifluoroacético (ATF) foi adicionado às amostras para uma concentração final de 2%.

2.7.3 Dessalinização

Os *cartridges* Oasis® HLB com 10 mg de sorvente foram condicionados com acetonitrila (ACN) e ATF 0,1%. As amostras foram centrifugadas a 10.000 g por 10 min e então adicionadas nos *cartridges* com o auxílio de uma seringa. Os sais foram removidos com ATF 0,1% em água ultrapura e os peptídeos foram eluídos com 300 µL de ACN 30% e 300 µL de ACN 50%. Os peptídeos foram então liofilizados por centrifugação a vácuo, solubilizados em 50 µL de ácido fórmico (AF) 0,1% e armazenados a -20 °C até a análise. A concentração de peptídeo foi estimada usando o kit BCA.

Para verificar a eficiência da digestão, 1 µg de peptídeos em 5 µL foi injetado em pré-coluna (4 cm, 100 µm de diâmetro interno) empacotada com 5 µm-ReproSil-Pur 120 C18-AQ, e foram separados em coluna analítica (18 cm, 75 µm de diâmetro interno) empacotada com 3 µm-Reprosil-Pur 120 C18-AQ, por cromatografia de fase reversa em um sistema EASY-nanoLC. Foi usado um gradiente LC-MS/MS de 30 min. O sistema Easy-nanoLC 1000 foi conectado de forma remota a um sistema LC-MS/MS híbrido Quadrupolo-Orbitrap de alto desempenho (Q Exactive) operando no modo de íon positivo usando aquisição dependente de dados. Foi utilizado o software Proteome Discoverer™ para a verificação da eficiência da digestão.

2.7.4 Marcação de peptídeos, enriquecimento de fosfopeptídeos e fracionamento de amostras

Depois de liofilizados, 50 µg dos peptídeos digeridos e dessalinizados foram solubilizados em 100 µL de HEPES a 100 mM (pH 8,5). Para a marcação de amostras de

duas réplicas biológicas, foram utilizados 11 *tags* (126, 127N, 127C, 128N, 128C, 129N, 129C, 130N, 130C, 131N e 131C). Para 0,25 mg de cada reagente, 41 μL de acetonitrila anidro foram adicionados, depois transferidos para os tubos com as amostras de peptídeos e mantidos por 1 h em temperatura ambiente com agitação. Quantidades iguais de cada amostra foram liofilizadas e solubilizadas em AF 0,1%, e 1 μg de peptídeos em 5 μL foi injetado no sistema LC-MS/MS usando resolução de 60K. O software Proteome Discoverer™ foi usado para verificar a eficiência e as proporções da marcação. As amostras marcadas com *tandem mass tags* (TMT) foram misturadas na proporção 1:1:1:1:1:1:1:1:1:1 e então foi adicionado hidroxilamina (concentração final de 0,4%) por 15 min à temperatura ambiente. Para o proteoma total, 10% do volume total de amostras de peptídeos marcados com TMT foram liofilizados por centrifugação a vácuo, solubilizadas em TFA 0,1%, dessalinizadas conforme descrito anteriormente e solubilizadas em formato de amônio 20 mM (pH 9,3, tampão A de pH alto para fracionamento da amostra).

Para o enriquecimento de fosfopeptídeos, as amostras de peptídeos marcados com TMT foram liofilizadas por centrifugação a vácuo, e 150 μL de água ultrapura, 50 μL de ATF 100%, 800 μL de ACN e 76 mg de ácido glicólico foram adicionados. As amostras foram mantidas em agitação até que uma solução límpida fosse observada. Esferas de TiO_2 (0,6 mg para cerca de 100 μg de amostra) foram adicionadas e as amostras foram mantidas por 10 min em temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas por 1 min para sedimentar os grânulos e o sobrenadante foi transferido para outro tubo de baixa ligação. Metade da quantidade de esferas de TiO_2 inicialmente utilizadas foi adicionada ao sobrenadante e as amostras foram mantidas em agitação por 10 min. As amostras foram centrifugadas como antes, o sobrenadante foi descartado e os *pellets* de esferas de TiO_2 foram combinados em um novo tubo de baixa ligação, e suspensos em baixo volume de ACN 80%, ATF 1% com um volume final de 200 μL . As esferas foram lavadas duas vezes com 200 μL de ACN 80% , ATF 1% e uma vez com 100 μL de ACN 10% e ATF 0,2%, e liofilizadas por 10 min por centrifugação a vácuo. Em seguida, 150 μL de solução de hidróxido de amônio a 1%, pH 11,3 foram adicionados e as amostras foram mantidas em agitação por 10 min. As amostras foram centrifugadas por 1 min, o sobrenadante transferido para outro tubo de baixa ligação, liofilizado por centrifugação a vácuo e solubilizado em formato de amônio 20 mM (pH 9,3, tampão A de pH alto para fracionamento da amostra).

Para o fracionamento, as amostras de peptídeos marcados com TMT foram injetadas em C18 Acquity UPLC MClass CSH 1,7 μm , 300 $\mu\text{m}\times 100\text{ mm}$, usando um sistema HPLC. Os peptídeos diluídos no tampão A (formato de amônio 20 mM, pH 9,3) foram injetados no sistema e depois eluídos a 100 nL min^{-1} aumentando o tampão B (80% de acetonitrila em formato de amônio 20 mM, pH 9,3) de 2% para 95% ao longo de 100 min para o proteoma total e 60 min para fosfoproteoma. Frações de amostras de peptídeos marcados com TMT para proteoma total foram concatenadas em 11 amostras (10 amostras mais o *flow through* - peptídeos eluídos no início das condições iniciais de separação de alto pH) e frações de amostras de peptídeos marcados com TMT para fosfoproteoma foram concatenadas em 5 amostras (4 amostras mais o *flow through* - peptídeos eluídos no início das condições iniciais de separação em pH alto). Frações de amostras de peptídeos marcados com TMT foram liofilizadas por centrifugação a vácuo e solubilizadas em AF 0,1%. As frações foram injetadas em uma pré-coluna, conforme descrito anteriormente, e o sistema Easy-nanoLC 1000 foi conectado remotamente ao espectrômetro de massa Orbitrap Exploris operando no modo de íon positivo, usando aquisição dependente de dados.

2.8 QUANTIFICAÇÃO DE ZINCO

Para digerir as amostras, foram adicionados 500 μL de H_2O_2 e os microtubos foram mantidos em banho ultrassônico por 15 min. Então, 1 mL de HNO_3 67-69% (grau ICP-MS) foi adicionado e os microtubos foram mantidos sob agitador *overnight*. As soluções foram diluídas até 5 mL com água ultrapura e filtradas. As soluções filtradas foram diluídas novamente com água ultrapura (2:8) e a concentração de zinco foi medida em ICP-MS.

2.9 TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS

Foram utilizadas as médias das réplicas técnicas de cada grupo experimental. Os dados apresentados são equivalentes a 4 experimentos independentes, que foram normalizados de acordo com o grupo controle. Para as análises de expressão gênica e proteica da MT, os dados foram primeiramente testados quanto à homocedasticidade das variâncias e normalidade dos resíduos, sendo utilizado os testes de Bartlett e Shapiro-Wilk, respectivamente. ANOVA de uma via foi aplicada, seguida do pós-teste de Fisher

para comparar os grupos. Foi considerado significativo o valor de $p < 0,05$. A plataforma MaxQuant (COX; MANN, 2008) e o proteoma de *Danio rerio* (UniProt UP000000437, 46693 proteínas, *download* em 03.02.2023) foram usados para análise dos dados brutos da proteômica total e fosfoproteômica. Em seguida ANOVA foi usada para a identificação das proteínas reguladas. Para as análises de enriquecimento e anotações a partir de ontologia genética e vias KEGG, foi usado o servidor ShinyGO 0.77 (GE et al., 2020), que incorpora diferentes *sets* de genes e banco de dados de vias nas análises. Além disso, para a construção de redes de interação entre proteínas, foram usados a ferramenta STRING (SZKLARCZYK et al., 2020) e o programa Cytoscape (SHANNON et al., 2003).

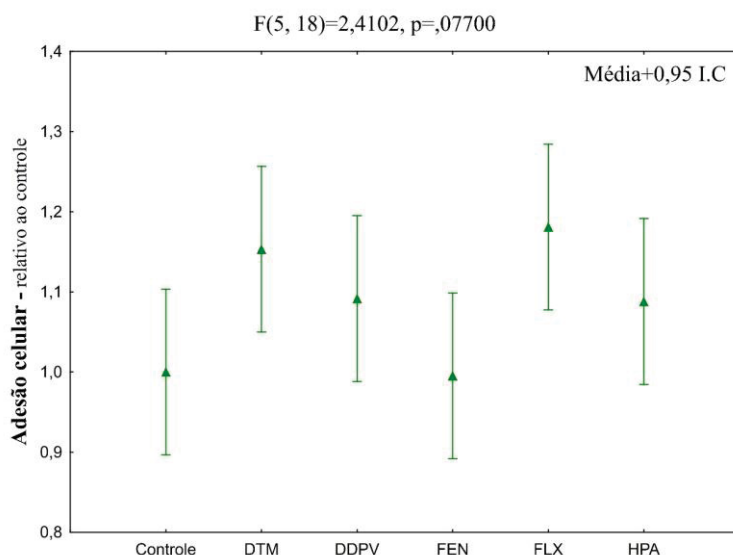
3 RESULTADOS

3.1 SELEÇÃO DOS AGROTÓXICOS USANDO HEPATÓCITOS DE *O. niloticus*

3.1.1 Viabilidade celular

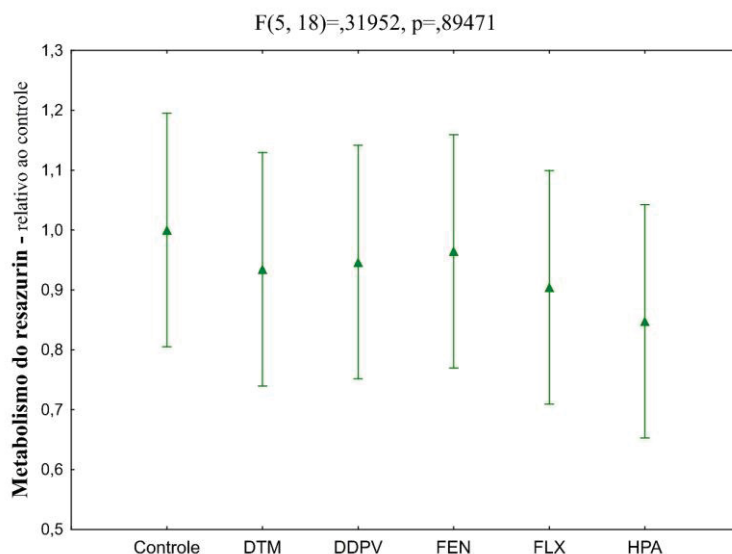
Os ensaios de viabilidade foram processados para os agrotóxicos e mistura de HPA, sendo que não causaram perda de viabilidade nas células expostas por 72 h na concentração selecionada (FIGURAS 44, 45, 46).

FIGURA 44 – ENSAIO DE ADESÃO CELULAR APÓS 72 HORAS DE EXPOSIÇÃO A MÚLTIPLOS CONTAMINANTES AMBIENTAIS EM HEPATÓCITOS DE *O. niloticus*



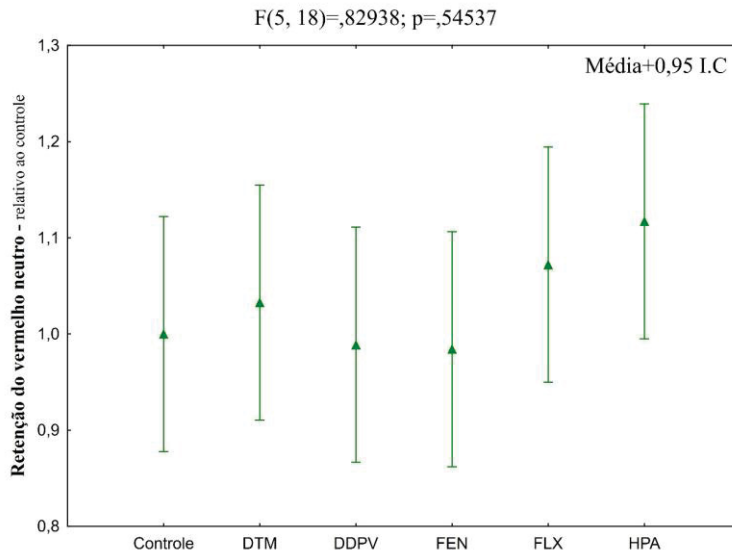
NOTA: Decomposição efetiva da hipótese de ANOVA para viabilidade celular de hepatócitos de *O. niloticus*. Ensaio de adesão celular após 72 h de exposição a 0,19 μM de deltametrina (DTM), 0,09 μM de diclorvós (DDPV), 1,32 μM de fenhexamid (FEN), 1,6 μM de fludioxonil (FLX) e 0,2 $\mu\text{g L}^{-1}$ de mistura de HPA. Não foram observadas diferenças significativas. Média+0,95 C.I. FONTE: O autor (2023).

FIGURA 45 – ENSAIO DO METABOLISMO DO RESAZURIN APÓS 72 HORAS DE EXPOSIÇÃO A MÚLTIPLOS CONTAMINANTES AMBIENTAIS EM HEPATÓCITOS DE *O. niloticus*



NOTA: Decomposição efetiva da hipótese de ANOVA para viabilidade celular de hepatócitos de *O. niloticus*. Ensaio do metabolismo do resazurin após 72 h de exposição a 0,19 μM de deltametrina (DTM), 0,09 μM de diclorvós (DDPV), 1,32 μM de fenhexamid (FEN), 1,6 μM de fludioxonil (FLX) e 0,2 $\mu\text{g L}^{-1}$ de mistura de HPA. Não foram observadas diferenças significativas. Média+0,95 C.I. FONTE: O autor (2023).

FIGURA 46 – ENSAIO DA RETENÇÃO DO VERMELHO NEUTRO APÓS 72 HORAS DE EXPOSIÇÃO A MÚLTIPLOS CONTAMINANTES AMBIENTAIS EM HEPATÓCITOS DE *O. niloticus*

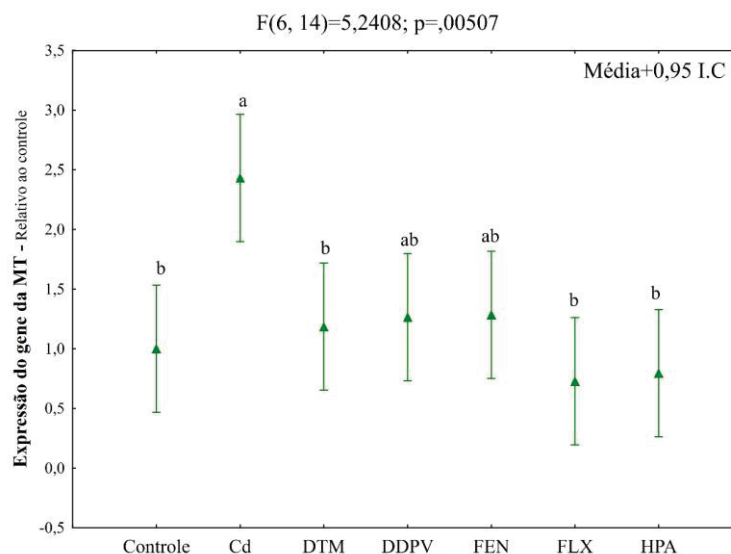


NOTA: Decomposição efetiva da hipótese de ANOVA para viabilidade celular de hepatócitos de *O. niloticus*. Ensaio da retenção do vermelho neutro após 72 h de exposição a 0,19 μM de deltametrina (DTM), 0,09 μM de diclorvós (DDPV), 1,32 μM de fenhexamid (FEN), 1,6 μM de fludioxonil (FLX) e 0,2 $\mu\text{g L}^{-1}$ de mistura de HPA. Não foram observadas diferenças significativas. Média+0,95 C.I. FONTE: O autor (2023).

3.1.2 Expressão gênica

Não foram observadas diferenças significativas nos níveis de RNAm da MT nas células expostas aos agrotóxicos deltametrina, diclorvós, fenhexamid, fludioxonil e mistura de HPAs (FIGURA 47).

FIGURA 47 – EXPRESSÃO GÊNICA APÓS 72 HORAS DE EXPOSIÇÃO A MÚLTIPLOS CONTAMINANTES AMBIENTAIS EM HEPATÓCITOS DE *O. niloticus*



NOTA: Decomposição efetiva da hipótese de ANOVA para expressão gênica da metalotioneína nos hepatócitos expostos por 72 h a 1 mg L⁻¹ de cádmio (Cd, controle positivo), 0,19 µM de deltametrina (DTM), 0,09 µM de diclorvós (DDPV), 1,32 µM de fenhexamid (FEN), 1,6 µM de fludioxonil (FLX) e 0,2 µg L⁻¹ de mistura de HPA. As letras indicam diferenças entre as concentrações. Média+0,95 C.I. FONTE: O autor (2023).

3.2 TESTE DE TOXICIDADE NAS LARVAS DE *D. rerio*

Os agrotóxicos selecionados para as análises de proteômica foram diclorvós e deltametrina. Apesar de não ter sido observado efeito de indução da MT pelo DDPV e DTM nos hepatócitos de *O. niloticus* nas concentrações selecionadas, outros estudos observaram esse efeito em outra espécie de peixe, *Oncorhynchus mykiss* (CEYHUN et al., 2012; ERDOĞAN et al., 2011).

Como descrito nos estudos anteriores (CHOUCHENE et al., 2022; LIU et al., 2018; STENGEL et al., 2018; XU et al., 2022), as concentrações selecionadas foram confirmadas como sendo subletais para as larvas de *D. rerio* (TABELA 5).

TABELA 5 – TESTE Q DE COCHRAN PARA TESTAR SUBLETALIDADE DOS POTENCIAIS CONTAMINANTES AMBIENTAIS

Variável	Teste Cochran Q (FET)	
	Taxa de mortalidade (%)	Taxa de sobrevivência (%)
(%)Controle	10	90
Controle-DMSO	10	90
Cd 100 $\mu\text{g L}^{-1}$	20	80
DDVP 1 mg L^{-1}	15	85
DTM 0.01 $\mu\text{g L}^{-1}$	15	85

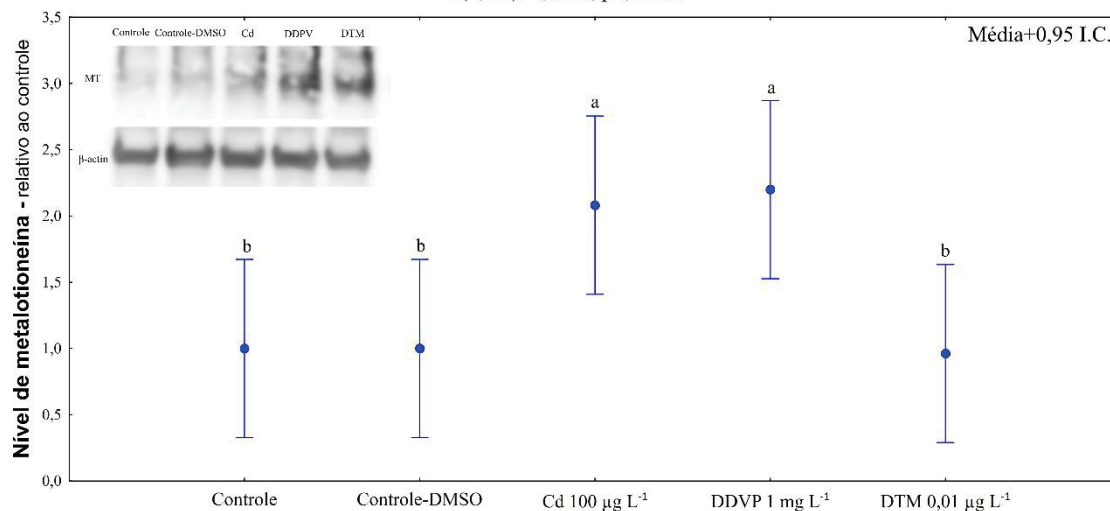
Fonte: O autor (2023).

3.3 INDUÇÃO DA MT EM LARVAS DE *D. rerio*

Os anticorpos comerciais anti-MT utilizados, apesar de apresentarem especificidade baixa, foram sensíveis o suficiente para quantificar a MT, na faixa de 15 KDa. Foram observados níveis aumentados da MT nas larvas expostas ao Cd e ao DDVP em ~100% (FIGURA 48).

FIGURA 48 – ENSAIO DE *WESTERN BLOT* PARA NÍVEIS DE METALOTIONEÍNA EM LARVAS DE *D. rerio* EXPOSTOS ATÉ 96 HPF

$F(4, 15)=4,0336, p=,02044$



NOTA: Decomposição efetiva da hipótese de ANOVA para níveis de metalotioneína em larvas de *D. rerio* expostos até 96 hpf. Cd: cloreto de cádmio. DDVP: diclorvós. DTM: deltametrina. Larvas expostas ao cloreto de cádmio e diclorvós apresentaram níveis aumentados de MT, indicados pelas letras. Média+0,95 C.I. Fonte: O autor (2023).

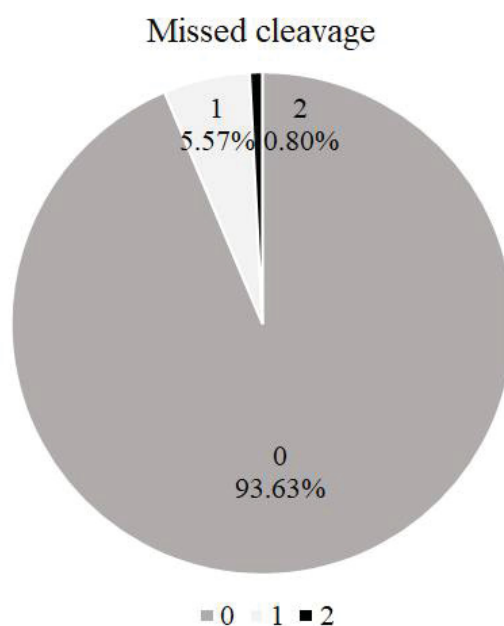
3.4 QUANTIFICAÇÃO DO ZINCO

A quantificação do zinco nas amostras de larvas de *D. rerio* expostas ao Cd, DDPV e DTM poderia contribuir para o entendimento de como os interferentes agem no mecanismo de indução da MT por metais. Contudo, os níveis de zinco nas amostras coletadas (10 larvas por grupo experimental) foram inferiores ao limite de detecção do equipamento.

3.5 ANÁLISE PROTEÔMICA

Depois de observada a eficiência da digestão, que apresentou mais de 90% de peptídeos sem *miss cleavage* (FIGURA 49), os peptídeos de cada amostra foram marcados e em seguida avaliados novamente usando Proteome Discoverer™.

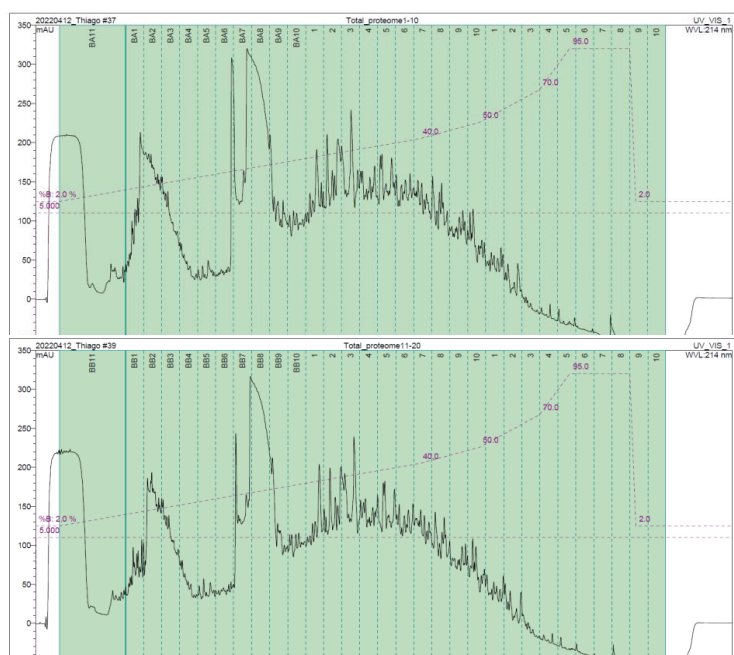
FIGURA 49 – EFICIÊNCIA DA DIGESTÃO USANDO TRIPSINA



NOTA: Eficiência da digestão usando tripsina usando Proteome Discoverer™. Azul representa 0 *missed cleavage*, amarelo 1 e vermelho 2. Com aproximadamente 90% de 0 *missed cleavage*, a digestão é considerada satisfatória. FONTE: O autor (2023).

Mais de 99% dos peptídeos foram marcados. Em seguida, foi corrigida as razões dos peptídeos de cada amostra (1:1:1:1:1:1:1:1:1:1) e o *pool* foi fracionado (FIGURA 50) e concatenado em 11 amostras (10 amostras mais o *flow through* - peptídeos eluídos no início das condições iniciais de separação de alto pH).

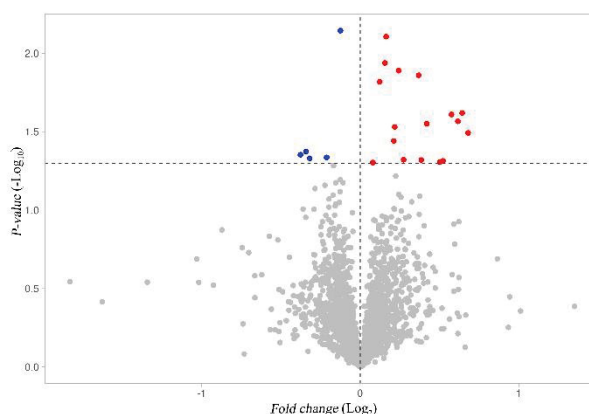
FIGURA 50 – CROMATOGRAMA DAS FRAÇÕES DE AMOSTRAS DE PEPTÍDEOS MARCADOS COM TMT PARA PROTEOMA TOTAL



NOTA: As frações de amostras foram concatenadas em 11 amostras (10 amostras mais o *flow through* - peptídeos eluídos no início das condições iniciais de separação de alto pH). FONTE: O autor (2023).

Foram identificadas 3324 proteínas, sendo que 247 delas estavam reguladas nas larvas de *D. rerio* expostas aos contaminantes até 96 hpf (FIGURA 51, 52, 53). Dessas 247 proteínas diferencialmente expressas, 23 delas estavam reguladas nas larvas de *D. rerio* expostas ao cádmio (FIGURA 51).

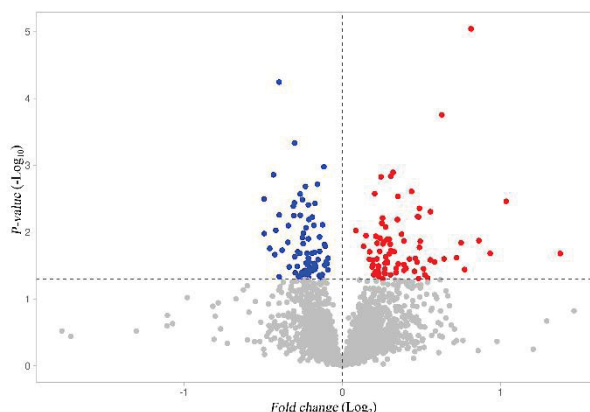
FIGURA 51 – VOLCANO PLOT PARA O PROTEOMA TOTAL NAS LARVAS DE *D. rerio* EXPOSTAS AO CÁDMIO



NOTA: Tracejado indica *p-value cutoff* de 0,05. Foi observado um total de 23 proteínas reguladas nas larvas expostas ao Cd até 96 hpf. FONTE: O autor (2023).

Das 247 proteínas diferencialmente expressas, 162 delas estavam reguladas nas larvas de *D. rerio* expostas ao diclorvós até 96 hpf (FIGURA 52).

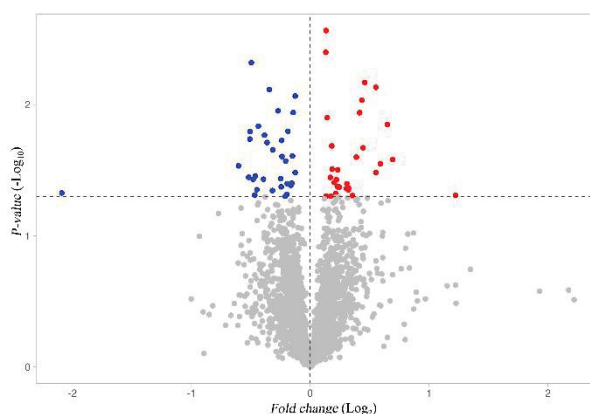
FIGURA 52 – VOLCANO PLOT PARA O PROTEOMA TOTAL NAS LARVAS DE *D. rerio* EXPOSTAS AO DICLORVÓS



NOTA: Tracejado indica *p-value cutoff* de 0,05. Foi observado um total de 162 proteínas reguladas nas larvas expostas ao DDPV até 96 hpf. FONTE: O autor (2023).

Das 247 proteínas diferencialmente expressas, 62 delas estavam reguladas nas larvas de *D. rerio* expostas ao deltametrina até 96 hpf (FIGURA 53).

FIGURA 53 – VOLCANO PLOT PARA O PROTEOMA TOTAL NAS LARVAS DE *D. rerio* EXPOSTAS À DELTAMETRINA

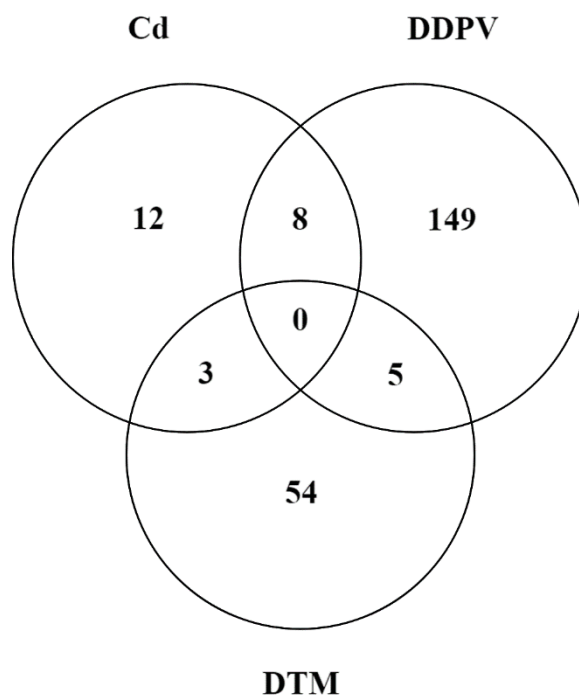


NOTA: Tracejado indica *p-value cutoff* de 0,05. Foi observado um total de 62 proteínas reguladas nas larvas expostas à DTM até 96 hpf. FONTE: O autor (2023).

Além da metodologia *label-based*, foi usada metodologia *label-free* para comparação (resultados não apresentados), sem diferença considerável em relação ao número de proteínas identificadas. Portanto, a metodologia *label-based* foi escolhida para as análises. O número de proteínas identificadas foi satisfatório, considerando que está entre os números identificados por outros trabalhos usando o mesmo modelo experimental: 1258 (DRIESSEN et al., 2022), 1409 (VIEIRA et al., 2020), 1072 (LEE et al., 2021) e 4404 (JIA et al., 2022).

Das proteínas diferencialmente expressas no proteoma total, 8 foram comuns para as larvas expostas aos dois contaminantes que induziram a MT, Cd e DDPV: WIPF2B, LOC103910005, LZTFL1, TACC1, NADK2, GFAP, TANGO2 e MAP7D3 e 3 para as larvas expostas ao Cd e a DTM: SI:CH211-152P11.4, SH2B2 e SI:CH211-125O16.4 (FIGURA 54).

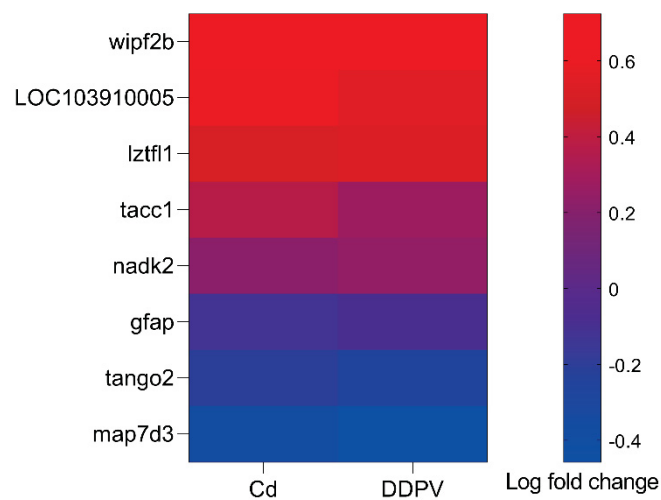
FIGURA 54 – DIAGRAMA DE VENN PARA AS PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS NO PROTEOMA TOTAL DAS LARVAS DE *D. rerio*



FONTE: O autor (2023).

As 8 proteínas diferencialmente expressas comuns nas larvas expostas ao Cd e ao DDPV apresentaram regulação similar (FIGURA 55).

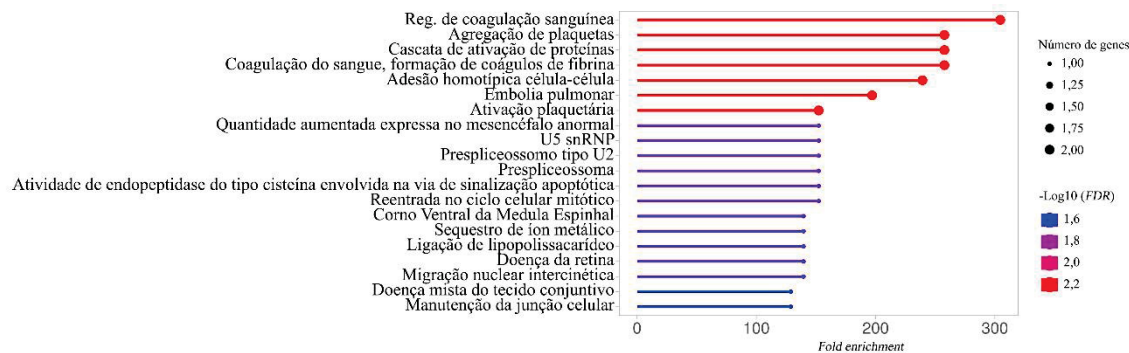
FIGURA 55 – *HEATMAP* REPRESENTANDO *FOLD CHANGE* DAS PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS NO PROTEOMA TOTAL DAS LARVAS DE *D. rerio* EXPOSTAS AO CÁDMIO E AO DICLORVÓS



FONTE: O autor (2023).

Considerando o enriquecimento, com anotações a partir de ontologia genética e vias KEGG, foram selecionados todos os *sets* de genes e banco de vias disponíveis no servidor ShinyGO 0.77. O resultado para as proteínas diferencialmente expressas nas larvas expostas ao Cd está apresentado na FIGURA 56.

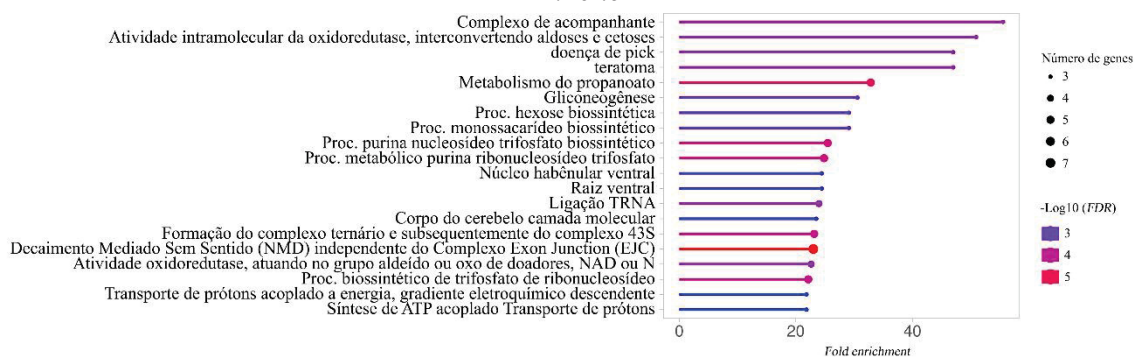
FIGURA 56 – ANOTAÇÕES CONSIDERANDO AS PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS NAS LARVAS DE *D. rerio* EXPOSTAS AO CÁDMIO



NOTA: Anotações a partir de ontologia genética e vias KEGG considerando as proteínas diferencialmente expressas nas larvas expostas ao Cd. Foram selecionados todos os sets de genes e banco de vias disponíveis no servidor ShinyGO 0.77. FONTE: O autor (2023).

Da mesma forma que para as larvas expostas ao Cd, foi feito o enriquecimento considerando as proteínas diferencialmente expressas nas larvas expostas ao DDPV, que está apresentado na FIGURA 57.

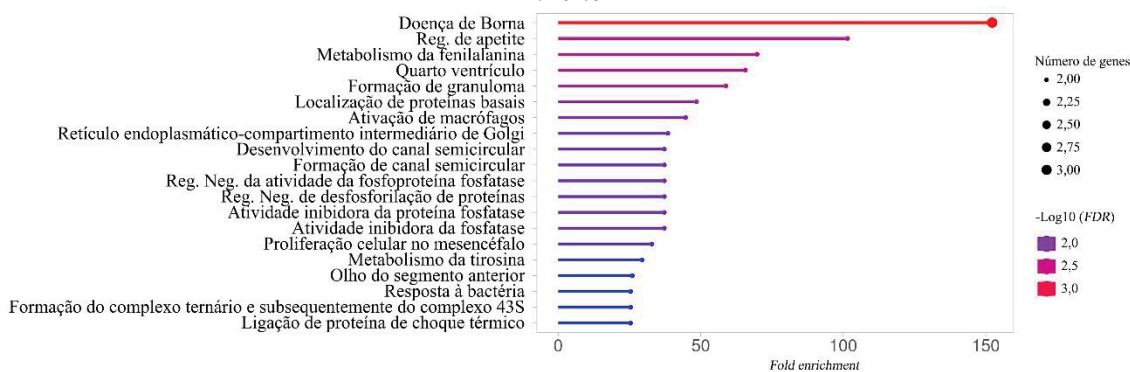
FIGURA 57 – ANOTAÇÕES CONSIDERANDO AS PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS NAS LARVAS DE *D. rerio* EXPOSTAS AO DICLORVÓS



NOTA: Anotações a partir de ontologia genética e vias KEGG considerando as proteínas diferencialmente expressas nas larvas expostas ao DDPV. Foram selecionados todos os sets de genes e banco de vias disponíveis no servidor ShinyGO 0.77. FONTE: O autor (2023).

O enriquecimento, considerando as proteínas diferencialmente expressas nas larvas expostas ao DTM, está apresentado na FIGURA 58.

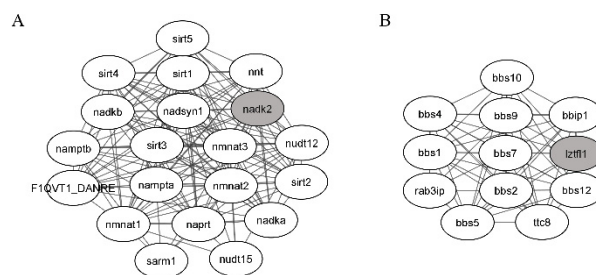
FIGURA 58 – ANOTAÇÕES CONSIDERANDO AS PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS NAS LARVAS DE *D. rerio* EXPOSTAS A DELTAMETRINA



NOTA: Anotações a partir de ontologia genética e vias KEGG considerando as proteínas diferencialmente expressas nas larvas expostas a DTM. Foram selecionados todos os sets de genes e banco de vias disponíveis no servidor ShinyGO 0.77. FONTE: O autor (2023).

Com a lista de proteínas diferencialmente expressas nas larvas de *D. rerio* expostas tanto ao Cd quanto ao DDPV (WIPF2B, LZTFL1, TACC1, NADK2, GFAP, TANGO2 e MAP7D3), foi construída rede de interação com 39 nós usando a ferramenta STRING (FIGURA 59). Foram observados dois *clusters* relacionados as proteínas NADK2 e LZTFL1. As proteínas GFAP, TACC1, WIPF2B, TANGO2 e MAP7D3 não apresentaram interação.

FIGURA 59 – REDE FORMADA COM PROTEÍNAS REGULADAS NAS LARVAS EXPOSTAS AO CÁDMIO E AO DICLORVÓS

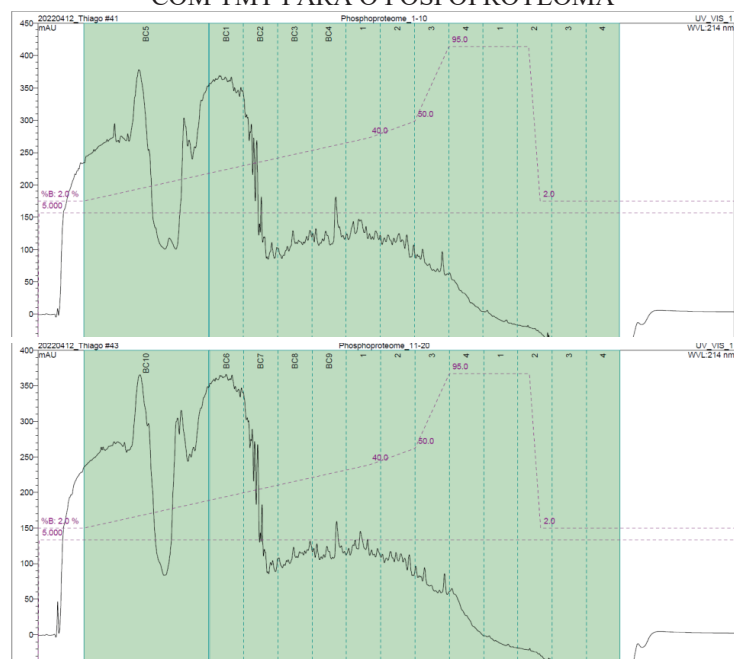


NOTA: Rede de 39 nós formada com WIPF2B, LZTF1, TACC1, NADK2, GFAP, TANGO2 e MAP7D3, reguladas nas larvas expostas ao Cd e ao DDPV. As proteínas GFAP, TACC1, WIPF2B, TANGO2 e MAP7D3 (não mostradas) não apresentaram interação. FONTE: O autor (2023).

3.6 ANÁLISE FOSFOPROTEÔMICA

A fosforilação de proteínas é uma modificação pós-traducional que regula quase todos os processos nas células de forma reversível (MACEK et al., 2009) e considerando que a fosfoproteômica também pode auxiliar na distinção de como interferentes atuam no mecanismo comumente observado de indução da MT por metais, foi feito o enriquecimento de fosfopeptídeos das amostras, que em seguida foram fracionados e concatenadas em 5 amostras: 4 amostras mais o *flow through* - peptídeos eluídos no início das condições iniciais de separação em pH alto (FIGURA 60).

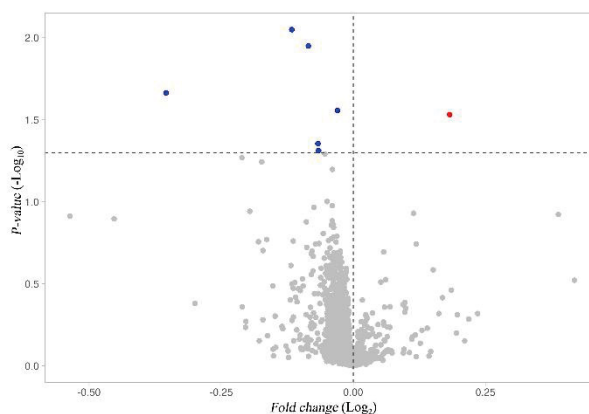
FIGURA 60 – CROMATOGRAMA DAS FRAÇÕES DE AMOSTRAS DE PEPTÍDEOS MARCADOS COM TMT PARA O FOSFOPROTEOMA



NOTA: As frações de amostras foram concatenadas em 5 amostras (4 amostras mais o *flow through* - peptídeos eluídos no início das condições iniciais de separação em pH alto). FONTE: O autor (2023).

Foram quantificados 3133 sítios de fosforilação em proteínas que foram também quantificadas no proteoma total, para assim corrigir a abundância. Do total de proteínas fosforiladas, 31 estavam regulados nas larvas de *D. rerio* expostas aos contaminantes até 96 hpf (FIGURA 61, 62, 63). Dessas, 8 estavam reguladas nas larvas de *D. rerio* expostas ao cádmio (FIGURA 61).

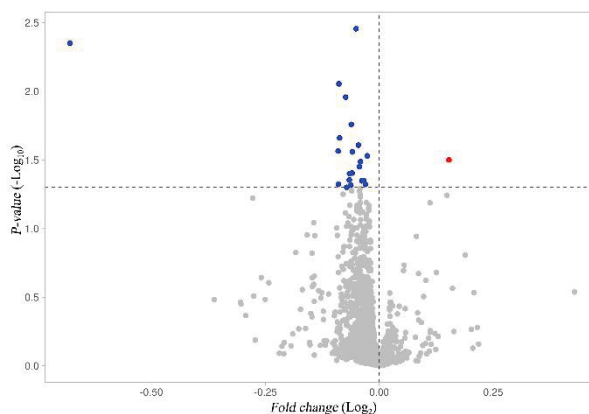
FIGURA 61 – *VOLCANO PLOT* PARA O FOSFOPROTEOMA NAS LARVAS DE *D. rerio* EXPOSTAS AO CÁDMIO



NOTA: Tracejado indica *p-value cutoff* de 0,05. Foi observado um total de 8 proteínas com sítios de fosforilação reguladas nas larvas expostas ao Cd até 96 hpf. FONTE: O autor (2023).

Das 31 fosfoproteínas diferencialmente expressas, 22 estavam reguladas nas larvas de *D. rerio* expostas ao diclorvós (FIGURA 62).

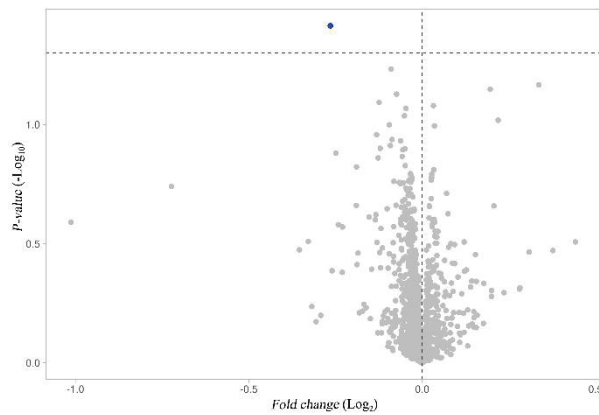
FIGURA 62 – *VOLCANO PLOT* PARA O FOSFOPROTEOMA NAS LARVAS DE *D. rerio* EXPOSTAS AO DICLORVÓS



NOTA: Tracejado indica *p-value cutoff* de 0,05. Foi observado um total de 22 proteínas com sítios de fosforilação reguladas nas larvas expostas ao DDPV até 96 hpf. FONTE: O autor (2023).

Das 31 fosfoproteínas diferencialmente expressas, 1 estava regulada nas larvas de *D. rerio* expostas à deltametrina até 96 hpf (FIGURA 63).

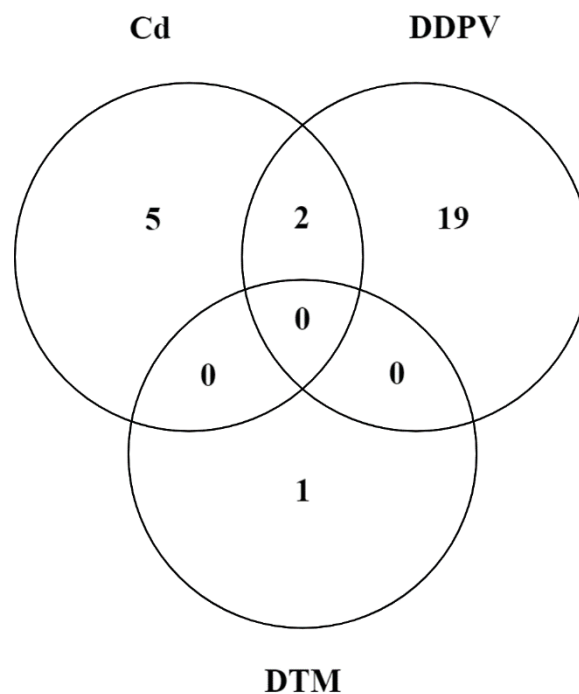
FIGURA 63 – *VOLCANO PLOT* PARA O FOSFOPROTEOMA NAS LARVAS DE *D. rerio* EXPOSTAS À DELTAMETRINA



NOTA: Tracejado indica *p-value cutoff* de 0,05. Foi observado um total de 1 proteína com sítios de fosforilação reguladas nas larvas expostas à DTM até 96 hpf. FONTE: O autor (2023).

Das fosfoproteínas diferencialmente expressas, 2 foram comuns para as larvas expostas ao Cd e ao DDPV: LRRFIP-1A E BOD1L1 (FIGURA 64).

FIGURA 64 – DIAGRAMA DE VENN PARA AS PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS NO FOSFOPROTEOMA

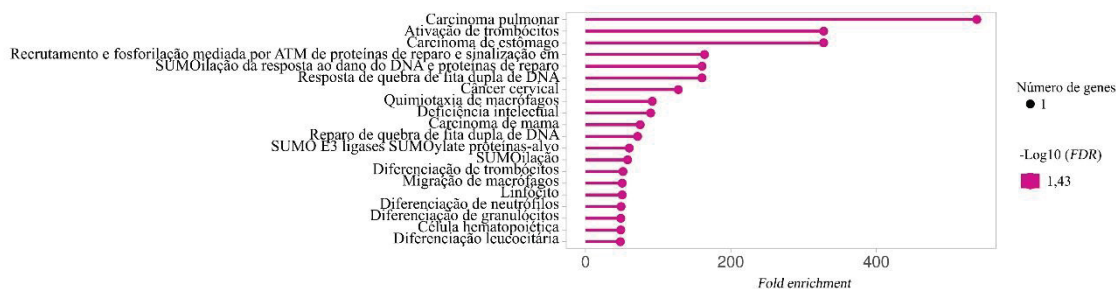


FONTE: O autor (2023).

Considerando o enriquecimento para o fosfoproteoma, com anotações a partir de ontologia genética e vias KEGG, da mesma forma que no proteoma total, foram

selecionados todos os *sets* de genes e banco de vias disponíveis no servidor ShinyGO 0.77. O resultado para as fosfoproteínas diferencialmente expressas nas larvas expostas ao Cd está apresentado na FIGURA 65.

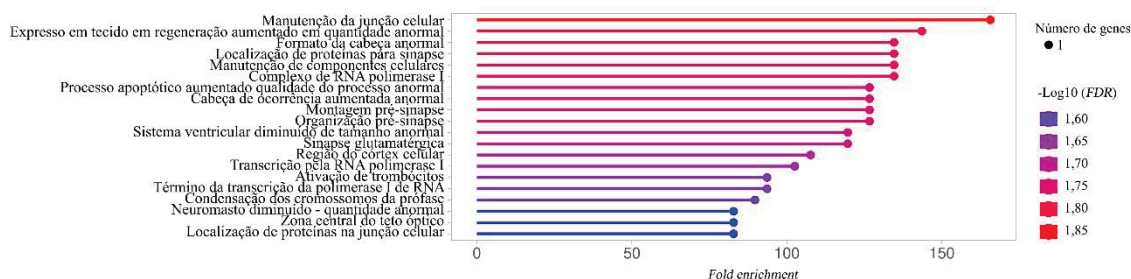
FIGURA 65 – ANOTAÇÕES CONSIDERANDO AS FOSFOPROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS NAS LARVAS EXPOSTAS AO CÁDMIO



NOTA: Anotações a partir de ontologia genética e vias KEGG considerando as fosfoproteínas diferencialmente expressas nas larvas expostas ao Cd. Foram selecionados todos os sets de genes e banco de vias disponíveis no servidor ShinyGO 0.77. FONTE: O autor (2023).

O resultado do enriquecimento para as fosfoproteínas diferencialmente expressas nas larvas expostas ao DDPV está apresentado na FIGURA 66.

FIGURA 66 – ANOTAÇÕES CONSIDERANDO AS FOSFOPROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS NAS LARVAS EXPOSTAS AO DICLORVÓS

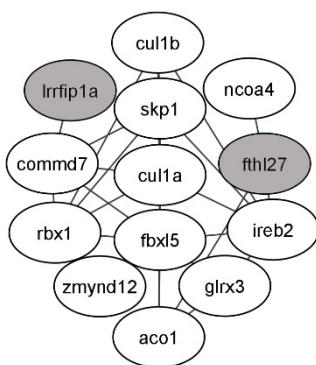


NOTA: Anotações a partir de ontologia genética e vias KEGG considerando as fosfoproteínas diferencialmente expressas nas larvas expostas ao DDPV. Foram selecionados todos os sets de genes e banco de vias disponíveis no servidor ShinyGO 0.77. FONTE: O autor (2023).

Como só foi observada uma fosfoproteína diferencialmente expressa nas larvas expostas à DTM, não foi possível fazer o enriquecimento para este contaminante.

Foi observado que a fosfoproteína LRRFIP-1 e a proteína FTHL27, ambas reguladas positivamente nas larvas expostas ao Cd, participam de uma rede de interação, construída com a ferramenta STRING (FIGURA 67).

FIGURA 67 – REDE FORMADA COM A FOSFOPROTEÍNA LRRFIP-1 E A PROTEÍNA FTHL27



NOTA: Rede formada com a fosfoproteína LRRFIP-1 e a proteína FTHL27, ambas reguladas positivamente nas larvas expostas ao Cd. FONTE: O autor (2023).

4 DISCUSSÃO

4.1 A EXPOSIÇÃO DAS LARVAS DE *D. rerio* AO Cd E DDPV PODE CAUSAR DESEQUILÍBRIO DO SISTEMA ANTIOXIDANTE

Foi observada, por meio do ensaio do *western blot*, regulação positiva da MT tanto nas larvas de *D. rerio* expostos tanto ao Cd, quanto ao DDPV. Além disso, foi observada regulação positiva da NADK2, por meio da análise proteômica. Considerando que o NADPH desempenha um papel crucial na homeostase redox como um doador de elétrons e que doa elétrons não apenas para sistemas antioxidantes, incluindo tiorredoxina e glutathiona, mas também para NADPH oxidases (NOXs) para produzir superóxido, em teoria, a NAD⁺ kinase (NADK) pode potencializar tanto a defesa antioxidante quanto o estresse oxidativo (POLLAK et al., 2007). No entanto, estudos recentes demonstraram a importância da NADK na defesa antioxidante e não no estresse oxidativo (OHASHI et al., 2012; OKA et al., 2021; POLLAK et al., 2007; SCHILD et al., 2021; XU et al., 2021). A superexpressão de NADK atenuou, enquanto o *knockdown* de NADK aumentou, o estresse oxidativo induzido por H₂O₂ em células HEK293 (POLLAK et al., 2007) e o aumento do estresse oxidativo foi observado em células HEK293 com *knockdown* de NADK2 (OHASHI et al., 2012). O *knockdown* de NADK também promove o estresse oxidativo induzido por dieta com alto teor de açúcar em moscas (XU et al., 2021) e promove a oxidação da glutathiona em linhagem de células cancerígenas (SCHILD et al., 2021). Além disso, a superexpressão de nicotinamida fosforibosiltransferase (NAMPT) específica cardíaca potencializa a defesa antioxidante, em parte, por meio da produção de NADPH mediada por NADK (OKA et al., 2021). Essas observações sugerem que a NADK desempenha um papel importante na defesa antioxidante via produção de NADPH.

Considerando que a MT é importante como molécula antioxidante, esta poderia ser induzida em resposta a fatores que promovem estresse oxidativo, o que é descrito principalmente para mamíferos e relacionando com o sistema nervoso central, sendo que estudos com peixes são ainda escassos (HAUSER-DAVIS et al., 2012). De fato, alguns regulação positiva da MT tanto nos embriões de *D. rerio* expostos tanto ao Cd, quanto ao DDPV (KORKOLA; STILLMAN, 2023; REUS et al., 2003; SATO; BREMNER, 1993; ZHANG et al., 2003), o que suporta a hipótese do seu papel redox. Além disso, a presença de metais no ambiente intracelular pode prevenir a oxidação da MT, e a configuração

metal-tiolato desempenha um papel crucial, pois influencia na maneira como a oxidação ocorre e como o metal é liberado (KORKOLA; STILLMAN, 2023). O Cd, p. ex., tem uma maior propensão a permanecer ligado à proteína, resistindo à oxidação, enquanto o Zn é mais suscetível a ser deslocado, o que tem implicações significativas para as funções biológicas (KORKOLA; STILLMAN, 2023). TRIVEDI et al. (2021) observaram aumento de EROs em células sanguíneas de peixes da espécie *Channa punctatus* expostas a 0,041 e 0,082 mg L⁻¹ de DDPV por 15 e 30 dias. Dessa forma, apesar de não ter sido quantificado os níveis de EROs nas larvas de *zebrafish* expostas aos contaminantes no presente estudo, é possível que a regulação positiva de NADK2 observada, nas larvas expostas a 1 mg L⁻¹ de DDPV esteja relacionada a um desequilíbrio inicial do sistema antioxidante. Portanto, por mais que os embriões estivessem em um estágio inicial de desequilíbrio do sistema antioxidante (regulação positiva da NADK2), é possível que os níveis de EROs foram suficientes para induzir a síntese da MT nos embriões expostos ao DDPV, enquanto que as larvas expostas ao Cd tiveram a indução regulada via mecanismo geral.

4.2 A EXPOSIÇÃO DAS LARVAS DE *D. rerio* AO Cd INTERFERIU COM A HOMEOSTASE DO FERRO

Apesar da expressão da ferritina (FTHL27) não ter sido relacionado com a regulação da MT, foi considerado pertinente discutir. O Cd induziu essa proteína nas larvas de *D. rerio* (FIGURA 67) e por meio de enriquecimento foi observado relação com a via de sequestro de íon metálico (FIGURA 56). Dessa forma, apesar de ser bem descrito que a resposta a exposição a metais pesados, fatores de transcrição metálica (FTMs) induzem a expressão da MT, outras proteínas com sítios de ligação para metal podem ter a síntese induzida, como é o caso da ferritina (subunidade pesada da ferritina FTH/FTHL), que armazena íons Fe em uma forma não tóxica (EIDE et al., 2021). O Cd induziu o gene FTHL27, também em células da linhagem ZFL expostas por 5, 10 e 20 µM de Cd por 4 e 24 h (KWOK et al., 2020). Como explicam os autores, o Cd, por alguma semelhança molecular, desencadeia um processo que só deveria ocorrer na presença do Fe e possivelmente isso faz a célula produzir mais ferritina para armazenamento e redução da toxicidade.

Outra proteína regulada positivamente nas larvas de *D. rerio* foi a proteína de interação com *Flightless I* rica em repetições de leucina 1 (LRRFIP-1). Flightless I (Flii)

é uma proteína de ligação à actina que tem sido relacionada com uma ampla gama de processos biológicos, desde processos críticos para a ovulação e desenvolvimento, até cicatrização e progressão do câncer. A interação de Flii com a proteína de interação com Flii rica em repetições de leucina 1 (LRRFIP-1) é de particular importância na regulação da sobrevivência celular, particularmente no que diz respeito à regulação de vias proliferativas ou apoptóticas (STRUDWICK; COWIN, 2020).

Por fim, considerando a fosfoproteína LRRFIP-1 e a proteína FTHL27, ambas reguladas positivamente nas larvas expostas ao Cd, foi construída a rede de interação (FIGURA 58), em que é possível observar, por meio do enriquecimento por ontologia genética, envolvimento com o processo celular de homeostase do ferro. Foi observado, por meio de enriquecimento (FIGURA 56), envolvimento do Cd com o sequestro de íons metálicos. Além disso, outros estudos mostraram que a exposição ao Cd causou aumento na expressão de transportadores de metais, incluindo ZIP14 e DMT1, que entre outros metais, facilitam a absorção de ferro (SAMPELS et al., 2017; VESEY, 2010), o que pode explicar a regulação da proteína FTHL27.

4.3 OUTRAS POSSÍVEIS VIAS ALTERADAS PELO Cd E DDPV

A RBM15, proteína fosforilada diferencialmente expressa nas larvas de *D. rerio* expostas ao Cd, é um importante regulador pós-transcricional que contribui para a atividade e especificidade do complexo *writer*, se ligando próximo aos resíduos m6A e facilitando a metilação do RNA direcionado ao recrutar o complexo WTAP-METTLL3 (ZHU et al., 2023). A modificação química N6-metiladenosina (m6A) é a mais abundante em RNAm dos eucariotos, podendo apresentar funções biológicas críticas. Os níveis e resultados funcionais das modificações do RNA são determinados por três grupos de proteínas que fazem a maquinaria de modificação química do RNA: (i) *writers*, as proteínas que escrevem modificações químicas relacionadas nas moléculas de RNA; (ii) *erasers*, as proteínas que apagam as modificações químicas das moléculas de RNA; (iii) *readers*, uma variedade de proteínas que interagem com moléculas de RNA que carregam diferentes tipos de modificações químicas e determinam os resultados funcionais de várias modificações de RNA (YANG; WANG, 2022). A metilação de m6A medeia a ocorrência de disfunções relacionadas ao meio ambiente em vários sistemas por meio de vários mecanismos moleculares e celulares, como estresse oxidativo, ativação do

inflamassoma NLRP3, apoptose e autofagia, dos quais o estresse oxidativo é o mais amplamente estudado (MALOVIC et al., 2021).

A LZTFL1 de *D. rerio*, proteína regulada positivamente nas larvas de expostas ao Cd e ao DDPV, tem alta identidade com a dos mamíferos, apresentando um zíper de leucina e domínio *coil-coil* típicos que são conservados entre os vertebrados, funcionando como um regulador negativo da via *Hedgehog* de sinalização. A via *Hedgehog* de sinalização está envolvida na organização do plano corporal, organogênese e desenvolvimento de tumores (WEI et al., 2019). A exposição ao Cd a 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ também resultou em via de sinalização *Hedgehog* reguladas negativamente em embriões de *zebrafish* (ZHANG, T. et al., 2022).

Por fim, o modificador de cromatina SETD1A, lisina metiltransferase metila Lys 4 da histona H3 (H3K4), atua na manutenção da estabilidade do genoma após o estresse de replicação para regular a transcrição, hematopoiese, função neurológica e reparo do DNA. O SETD1A existe como parte do complexo multimérico compass (complexo de proteínas associadas ao SET1) que compreende vários cofatores enzimáticos e a fosfoproteína BOD1L (BAYLEY et al., 2022), que foi regulada negativamente nas larvas de *D. rerio* expostas ao Cd e ao DDPV. Tanto BOD1L quanto a atividade de metiltransferase de SETD1A são necessários para proteger o DNA. A identificação de BOD1L como um potencial substrato para fosforilação mediada por quinases ATM/ATR sugere que ela pode atuar como uma proteína reguladora de dano para guiar o complexo SETD1A-COMPASS para locais de dano e catalisar a metilação da H3K4 (BAYLEY et al., 2022; MATSUOKA et al., 2007).

5 CONCLUSÃO

A exposição a concentrações subletais de cádmio, diclorvós e deltametrina causou poucas alterações no proteoma total e no fosfoproteoma de larvas de *D. rerio* expostas até 96 hpf. Observando as proteínas e fosfoproteínas diferencialmente expressas tanto nas larvas expostas ao Cd quanto ao DDPV, é sugerido que ambos podem ter causado desequilíbrio inicial do sistema antioxidante, que poderia ter contribuído para a regulação da metalotioneína por meio do aumento nos níveis de EROs.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Historicamente, estudos toxicológicos e ecotoxicológicos têm usado testes em animais, mas o cultivo primário e as linhagens celulares surgiram como boas ferramentas eticamente aceitas. No entanto, a implementação desses modelos alternativos depende do desenvolvimento de ensaios *in vitro* eficientes e de baixo custo. No presente estudo foi possível isolar e cultivar hepatócitos de *O. niloticus* de forma simples, possibilitando a manutenção das células viáveis por tempo suficiente para avaliar o potencial tóxico de contaminantes ambientais, o que pode ser importante para apoiar futuras melhorias e adaptações no cultivo primário de hepatócitos de peixes neotropicais, visando aprimorar sua capacidade de resposta a contaminantes ambientais.

Biomarcadores podem ser detectados na biota e contribuir para o estudo do potencial tóxico de contaminantes e poluentes em ecossistemas aquáticos bem como em programas de biomonitoramento da qualidade da água. No entanto, a aplicação de biomarcadores tem limitações na ecotoxicologia, decorrentes da dificuldade em extrapolar os sinais no nível individual para níveis organizacionais superiores e da lacuna de conhecimento sobre seus significados ecológicos específicos. Embora as técnicas moleculares, tais como genômica, proteômica e metabolômica, tenham sido utilizadas com êxito para criar biomarcadores promissores na avaliação de risco para a saúde humana, o progresso na avaliação do risco ecológico é dificultado pelo escasso sequenciamento genético em muitas espécies-chave. Consequentemente, é imprescindível avançar nesta área, visando uma compreensão mais aprofundada dos impactos dos contaminantes no meio ambiente. Colaborações entre cientistas, governos e setores industriais são essenciais para desenvolver abordagens mais eficazes de gestão ambiental e avaliação de risco.

Uma proteína, que tem sido indicada por diferentes estudos como um bom biomarcador de contaminação aquática por metais é a metalotioneína e foi selecionada para a sequência do estudo. Foi observado que diferentes metais pesados têm potenciais distintos para induzir a expressão de metalotioneína em peixes. O cádmio apresentou o melhor *score* de ligação a sítios de ligação ao zinco em proteínas relacionadas a diferentes processos celulares em *D. rerio* e foi um potente indutor da metalotioneína em hepatócitos de *O. niloticus*. Considerando que o zinco desempenha um papel crucial na indução do biomarcador, o resultado observado pode ser explicado pelo cádmio liberando o zinco ligado a diferentes proteínas na célula, que ativa o fator de transcrição metálica, que por

sua vez interage com as sequências dos elementos de regulação metálica no gene promotor, resultando na ativação da transcrição da metalotioneína.

Como outras classes de contaminantes podem interferir no mecanismo geral de indução por metais, verificar a responsividade da indução da metalotioneína em peixes por múltiplos contaminantes ambientais também é importante para entender e validar a metalotioneína enquanto biomarcador de contaminação e poluição por metais. Dessa forma, na sequência do estudo, com a tentativa de distinguir como interferentes atuam no mecanismo de indução da MT por metal, larvas de *D. rerio* foram expostas ao cádmio, diclorvós e deltametrina. A partir da análise das proteínas e fosfoproteínas diferencialmente expressas tanto nas larvas expostas ao cádmio quanto ao DDPV, é sugerido que ambos possam ter causado um desequilíbrio inicial no sistema antioxidante, o que poderia contribuir para a regulação da metalotioneína por meio do aumento nos níveis de EROs.

As concentrações subletais usadas no capítulo III não causaram grandes alterações no proteoma total e no fosfoproteoma das larvas de *D. rerio*. Aumentando as concentrações, poderão surgir novos *insights* para melhor compreender e validar a MT enquanto biomarcador de contaminação e poluição por metais. Além disso, o biomonitoramento de contaminação aquática por metais pode ser feito com a quantificação dos níveis de metais no ambiente e nos tecidos da biota. Por isso, estudar a potencialidade da indução da MT por misturas de metais pode ser interessante, pois concentrações muito baixas de metais, menores que o limite de detecção dos equipamentos disponíveis, quando em mistura, poderiam induzir a MT.

Portanto, o uso da metalotioneína enquanto biomarcador de contaminação e poluição por metal em programas de biomonitoramento da qualidade da água não é desestimulado pelos resultados encontrados no presente estudo. Porém, novos estudos são recomendados para a melhor compreensão e interpretação dos dados obtidos com a implementação desse biomarcador.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, S. M.; GREELEY, M. S. Ecotoxicological Indicators of Water Quality: Using Multi-response Indicators to Assess the Health of Aquatic Ecosystems. **Water, Air, and Soil Pollution**, 123, n. 1, p. 103-115, 2000.
- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol**, 105, p. 121-126, 1984.
- ALGE, C. S.; HAUCK, S. M.; PRIGLINGER, S. G.; KAMPIK, A. et al. Differential protein profiling of primary versus immortalized human RPE cells identifies expression patterns associated with cytoskeletal remodeling and cell survival. **Journal of proteome research**, 5, n. 4, p. 862-878, 2006.
- ALI, H.; KHAN, E. What are heavy metals? Long-standing controversy over the scientific use of the term ‘heavy metals’ – proposal of a comprehensive definition. **Toxicological & Environmental Chemistry**, 100, n. 1, p. 6-19, 2018.
- AMARANTE JUNIOR, O. P. d.; SANTOS, T. C. R. d.; BRITO, N. M.; RIBEIRO, M. L. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Química Nova**, 25, p. 589-593, 2002.
- AMORIM, L. C. A. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, 6, p. 158-170, 2003. Anuário Mineral Brasileiro: Principais Substâncias Metálicas. 2020.
- APPENROTH, K.-J. What are “heavy metals” in Plant Sciences? **Acta Physiologiae Plantarum**, 32, n. 4, p. 615-619, 2010.
- ARAÚJO, A. J. d.; LIMA, J. S. d.; MOREIRA, J. C.; JACOB, S. d. C. et al. Exposição múltipla a agrotóxicos e efeitos à saúde: estudo transversal em amostra de 102 trabalhadores rurais, Nova Friburgo, RJ. **Ciência & Saúde Coletiva**, 12, p. 115-130, 2007.
- ATHMOUNI, K.; BELHAJ, D.; EL FEKI, A.; AYADI, H. Optimization, antioxidant properties and GC–MS analysis of *Periploca angustifolia* polysaccharides and chelation therapy on cadmium-induced toxicity in human HepG2 cells line and rat liver. **International Journal of Biological Macromolecules**, 108, p. 853-862, 2018.
- ATLI, G.; CANLI, M. Responses of metallothionein and reduced glutathione in a freshwater fish *Oreochromis niloticus* following metal exposures. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 25, n. 1, p. 33-38, 2008.
- BAMBINO, K.; MORRISON, J.; CHU, J. Hepatotoxicity in Zebrafish Larvae. In: HANSEN, J. M. e WINN, L. M. (Ed.). **Developmental Toxicology: Methods and Protocols**. New York, NY: Springer New York, p. 129-138, 2019.
- BARRETO, L. S.; SOUZA, A. T. d. C.; MARTINS, C. C.; ARAUJO, S. B. L. et al. Urban effluents affect the early development stages of Brazilian fish species with implications for their population dynamics. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 188, p. 109907, 2020.

- BARRICK, A.; MANIER, N.; LONCHAMBON, P.; FLAHAUT, E. et al. Investigating a transcriptomic approach on marine mussel hemocytes exposed to carbon nanofibers: An *in vitro/in vivo* comparison. **Aquatic toxicology**, 207, p. 19-28, 2019.
- BAUMAN, J. W.; LIU, J.; LIU, Y. P.; KLAASSEN, C. D. Increase in metallothionein produced by chemicals that induce oxidative stress. **Toxicology and applied pharmacology**, 110, n. 2, p. 347-354, 1991.
- BAUMAN, J. W.; LIU, Y. P.; ANDREWS, G. K.; KLAASSEN, C. D. Examination of potential mechanism(s) of metallothionein induction by diethyl maleate. **Toxicology and applied pharmacology**, 117, n. 2, p. 226-232, 1992.
- BAUMAN, J. W.; MADHU, C.; MCKIM, J. M.; LIU, Y. et al. Induction of hepatic metallothionein by paraquat. **Toxicology and applied pharmacology**, 117, n. 2, p. 233-241, 1992.
- BAYLEY, R.; BOREL, V.; MOSS, R. J.; SWEATMAN, E. et al. H3K4 methylation by SETD1A/BOD1L facilitates RIF1-dependent NHEJ. **Molecular Cell**, 82, n. 10, p. 1924-1939.e1910, 2022.
- BELIAEFF, B.; BURGEOT, T. Integrated biomarker response: A useful tool for ecological risk assessment. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 21, n. 6, p. 1316-1322, 2002.
- BJERREGAARD, P.; ANDERSEN, C. B. I.; ANDERSEN, O. Chapter 21 - Ecotoxicology of Metals—Sources, Transport, and Effects on the Ecosystem. *In*: NORDBERG, G. F.; FOWLER, B. A., et al (Ed.). **Handbook on the Toxicology of Metals (Fourth Edition)**. San Diego: Academic Press, p. 425-459, 2015.
- BOLIS, C. L.; PICCOLELLA, M.; DALLA VALLE, A. Z.; RANKIN, J. C. Fish as model in pharmacological and biological research. **Pharmacol Res**, 44, n. 4, p. 265-280, 2001.
- BONNER, M. R.; ALAVANJA, M. C. R. Pesticides, human health, and food security. **Food and Energy Security**, 6, n. 3, p. 89-93, 2017.
- BONOMO, M. M.; FERNANDES, J. B.; CARLOS, R. M.; FERNANDES, M. N. Mitochondrial and lysosomal dysfunction induced by the novel metal-insecticide [Mg(hesp)(2)(phen)] in the zebrafish (*Danio rerio*) hepatocyte cell line (ZF-L). **Chem Biol Interact**, 307, p. 147-153, 2019.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, 72, p. 248-254, 1976.
- BRUSCALUPI, G.; MASSIMI M FAU - DEVIRGILIIS, L. C.; DEVIRGILIIS LC FAU - LEONI, S.; LEONI, S. Multiple parameters are involved in the effects of cadmium on prenatal hepatocytes. n. 1879-3177, 2009.
- BUSQUET, F.; HALDER; BRAUNBECK, T.; GOURMELON et al. OECD guidelines for the testing of chemicals 236 - Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. **The OECD observer. Organisation for Economic Co-operation and Development**, 2013.

- CAPASSO, C.; CARGINALE, V.; SCUDIERO, R.; CRESCENZI, O. et al. Phylogenetic divergence of fish and mammalian metallothionein: relationships with structural diversification and organismal temperature. **J Mol Evol**, 57 Suppl 1, p. S250-257, 2003.
- CARVALHO, C. d. S.; BERNUSO, V. A.; ARAÚJO, H. S. S. d.; ESPÍNDOLA, E. L. G. et al. Biomarker responses as indication of contaminant effects in *Oreochromis niloticus*. **Chemosphere**, 89, n. 1, p. 60-69, 2012.
- CARVALHO, F. P. Agriculture, pesticides, food security and food safety. **Environmental Science & Policy**, 9, n. 7, p. 685-692, 2006.
- CASTAÑO, A.; CANTARINO, M. J.; CASTILLO, P.; TARAZONA, J. V. Correlations between the RTG-2 cytotoxicity test EC50 and *in vivo* LC50 rainbow trout bioassay. **Chemosphere**, 32, n. 11, p. 2141-2157, 1996.
- CEYHUN, S. B.; AKSAKAL, E.; KIRIM, B.; ATABEYOGLU, K. et al. Chronic toxicity of pesticides to the mRNA expression levels of metallothioneins and cytochrome P450 1A genes in rainbow trout. **Toxicol Ind Health**, 28, n. 2, p. 162-169, 2012.
- CHAN, K. M.; KU, L. L.; CHAN, P. C.; CHEUK, W. K. Metallothionein gene expression in zebrafish embryo-larvae and ZFL cell-line exposed to heavy metal ions. **Mar Environ Res**, 62 Suppl, p. S83-87, 2006.
- CHATTERJEE, S.; DATTA, S.; DAS, T. K.; VEER, V. et al. Metal accumulation and metallothionein induction in *Oreochromis niloticus* grown in wastewater fed fishponds. **Ecological Engineering**, 90, p. 405-416, 2016.
- CHEN, X.; WANG, J.; XIE, Y.; MA, Y. et al. Physiological response and oxidative stress of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) under single and combined toxicity of polystyrene microplastics and cadmium. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 245, p. 114080, 2022.
- CHOUCHENE, L.; KESSABI, K.; GUEGUEN, M.-M.; KAH, O. et al. Interference with zinc homeostasis and oxidative stress induction as probable mechanisms for cadmium-induced embryo-toxicity in zebrafish. **Environmental Science and Pollution Research**, 29, n. 26, p. 39578-39592, 2022.
- CONNOR, R. E.; GEIST, J.; WERNER, I. Effect-Based Tools for Monitoring and Predicting the Ecotoxicological Effects of Chemicals in the Aquatic Environment. **Sensors**, 12, n. 9, p. 12741-12771, 2012.
- COX, J.; MANN, M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. **Nature Biotechnology**, 26, n. 12, p. 1367-1372, 2008.
- CROUCH, R. K.; GANDY, S. E.; KIMSEY, G.; GALBRAITH, R. A. et al. The inhibition of islet superoxide dismutase by diabetogenic drugs. **Diabetes**, 30, n. 3, p. 235-241, 1981.

DALA-PAULA, B. M.; CUSTÓDIO, F. B.; KNUPP, E. A. N.; PALMIERI, H. E. L. et al. Cadmium, copper and lead levels in different cultivars of lettuce and soil from urban agriculture. **Environmental Pollution**, 242, p. 383-389, 2018.

DONDERO, F.; CAVALETTO, M.; GHEZZI, A. R.; LA TERZA, A. et al. Biochemical Characterization and Quantitative Gene Expression Analysis of the Multi-Stress Inducible Metallothionein from *Tetrahymena thermophila*. **Protist**, 155, n. 2, p. 157-168, 2004.

DONG, G.; CHEN, H.; QI, M.; DOU, Y. et al. Balance between metallothionein and metal response element binding transcription factor 1 is mediated by zinc ions (Review). **Mol Med Rep**, 11, n. 3, p. 1582-1586, 2015.

DONG, Z.; LI, B.; WU, L.; LEI, Y. et al. Identification and characterization of scavenger receptor class B member 2 in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture Reports**, 21, p. 100783, 2021.

DRIESSEN, M.; VAN DER PLAS - DUIVESTIEN, S.; KIENHUIS, A. S.; VAN DEN BRANDHOF, E.-J. et al. Identification of proteome markers for drug-induced liver injury in zebrafish embryos. **Toxicology**, 477, p. 153262, 2022.

DUFFUS, J. H. "Heavy metals" a meaningless term? (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, 74, n. 5, p. 793-807, 2002.

EIDE, M.; ZHANG, X.; KARLSEN, O. A.; GOLDSTONE, J. V. et al. The chemical defensome of five model teleost fish. **Scientific reports**, 11, n. 1, p. 10546, May 18 2021. ELLWANGER, J. H.; CHIES, J. A. B. Brazil's heavy metal pollution harms humans and ecosystems. **Science in One Health**, 2, p. 100019, 2023.

ERDOĞAN, O.; CEYHUN, S. B.; EKINCI, D.; AKSAKAL, E. Impact of deltamethrin exposure on mRNA expression levels of metallothionein A, B and cytochrome P450 1A in rainbow trout muscles. **Gene**, 484, n. 1, p. 13-17, 2011.

FIGUEIREDO, N.; MATOS, B.; DINIZ, M.; BRANCO, V. et al. Marine Fish Primary Hepatocyte Isolation and Culture: New Insights to Enzymatic Dissociation Pancreatin Digestion. **International journal of environmental research and public health**, 18, n. 4, 2021.

FILIPIC, M. Mechanisms of cadmium induced genomic instability. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, 733, n. 1, p. 69-77, 2012.

FOSTER, A. W.; YOUNG, T. R.; CHIVERS, P. T.; ROBINSON, N. J. Protein metalation in biology. **Current Opinion in Chemical Biology**, 66, p. 102095, 2022.

FOTAKIS, G.; CEMELI, E.; ANDERSON, D.; TIMBRELL, J. A. Cadmium chloride-induced DNA and lysosomal damage in a hepatoma cell line. **Toxicology in Vitro**, 19, n. 4, p. 481-489, 2005.

GAO, B.; JEONG, W.-I.; TIAN, Z. Liver: An organ with predominant innate immunity. **Hepatology**, 47, n. 2, p. 729-736, 2008.

GE, S. X.; JUNG, D.; YAO, R. ShinyGO: a graphical gene-set enrichment tool for animals and plants. **Bioinformatics (Oxford, England)**, 36, n. 8, p. 2628-2629, 2020.

GILLIES, R. J.; DIDIER, N.; DENTON, M. Determination of cell number in monolayer cultures. **Anal Biochem**, 159, n. 1, p. 109-113, 1986.

GLINSKI, A.; LIEBEL, S.; PELLETIER, È.; VOIGT, C. L. et al. Toxicological interactions of silver nanoparticles and organochlorine pesticides in mouse peritoneal macrophages. **Toxicol Mech Methods**, 26, n. 4, p. 251-259, 2016.

GLOCK, G. E.; MCLEAN, P. Further studies on the properties and assay of glucose 6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase of rat liver. **The Biochemical journal**, 55, n. 3, p. 400-408, 1953.

GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, R. M.; RIAL-OTERO, R.; CANCHO-GRANDE, B.; SIMAL-GÁNDARA, J. Occurrence of fungicide and insecticide residues in trade samples of leafy vegetables. **Food Chemistry**, 107, n. 3, p. 1342-1347, 2008.

GOVIND, P.; SHARMA, M. Heavy metals causing toxicity in animals and fishes. **Research Journal of Animal, Veterinary and Fishery Sciences**, Vol. 2(2), p. 17-23, 2014.

GRÖNER, F.; ZIKOVÁ, A.; KLOAS, W. Effects of the pharmaceuticals diclofenac and metoprolol on gene expression levels of enzymes of biotransformation, excretion pathways and estrogenicity in primary hepatocytes of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, 167, p. 51-57, 2015.

GRÜNGREIFF, K.; REINHOLD, D.; WEDEMEYER, H. The role of zinc in liver cirrhosis. **Annals of hepatology**, 15, n. 1, p. 7-16, 2016.

GÜNTHER, V.; LINDERT, U.; SCHAFFNER, W. The taste of heavy metals: Gene regulation by MTF-1. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, 1823, n. 9, p. 1416-1425, 2012.

GUPTA, M.; SHARMA, R.; KUMAR, A. Docking Techniques in Toxicology: An Overview. **Current Bioinformatics**, 15, n. 6, p. 600-610, 2020.

HARIHARAN, G.; PURVAJA, R.; ROBIN, R. S.; RAMESH, R. Evaluation of the multiple biomarkers on identification of the vulnerable coastal pollution hotspots. **Environ Sci Pollut Res Int**, 23, n. 22, p. 23281-23290, 2016.

HAUSER-DAVIS, R. A.; BASTOS, F. F.; DANTAS, R. F.; TOBAR, S. A. L. et al. Behaviour of the oxidant scavenger metallothionein in hypoxia-induced neotropical fish. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 103, p. 24-28, 2014.

HAUSER-DAVIS, R. A.; GONÇALVES, R. A.; ZIOLLI, R. L.; CAMPOS, R. C. d. A novel report of metallothioneins in fish bile: SDS-PAGE analysis, spectrophotometry quantification and metal speciation characterization by liquid chromatography coupled to ICP-MS. **Aquatic Toxicology**, 116-117, p. 54-60, 2012.

HEISSEL, S.; FREDERIKSEN, S. J.; BUNKENBORG, J.; HØJRUP, P. Enhanced trypsin on a budget: Stabilization, purification and high-temperature application of inexpensive commercial trypsin for proteomics applications. **PloS one**, 14, n. 6, p. e0218374, 2019.

HEWITT, N. J.; LI, A. P. Cryopreservation of Hepatocytes. *In*: VINKEN, M. e ROGIERS, V. (Ed.). **Protocols in In Vitro Hepatocyte Research**. New York, NY: Springer New York, p. 13-26, 2015.

HOOK, S. E.; GALLAGHER, E. P.; BATLEY, G. E. The role of biomarkers in the assessment of aquatic ecosystem health. **Integrated environmental assessment and management**, 10, n. 3, p. 327-341, 2014.

HU, F.; YIN, L.; DONG, F.; ZHENG, M. et al. Effects of long-term cadmium exposure on growth, antioxidant defense and DNA methylation in juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquatic Toxicology**, 241, p. 106014, 2021.

HU, W.; ZHU, Q.-L.; ZHENG, J.-L.; WEN, Z.-Y. Cadmium induced oxidative stress, endoplasmic reticulum (ER) stress and apoptosis with compensative responses towards the up-regulation of ribosome, protein processing in the ER, and protein export pathways in the liver of zebrafish. **Aquatic Toxicology**, 242, p. 106023, 2022.

HÜBNER, R.; ASTIN, K. B.; HERBERT, R. J. H. 'Heavy metal'—time to move on from semantics to pragmatics? **Journal of Environmental Monitoring**, 12, n. 8, p. 1511-1514, 2010.

JABEEN, G.; ISHAQ, S.; ARSHAD, M.; FATIMA, S. et al. Investigation on Immune-Related Protein (Heat Shock Proteins and Metallothionein) Gene Expression Changes and Liver Histopathology in Cadmium-Stressed Fish. **BioMed Research International**, 2022, p. 2075791, 2022.

JIA, D.; ZHANG, R.; SHAO, J.; ZHANG, W. et al. Exposure to trace levels of metals and fluoroquinolones increases inflammation and tumorigenesis risk of zebrafish embryos. **Environmental Science and Ecotechnology**, 10, p. 100162, 2022.

JIAO, J.-G.; LIU, Y.; ZHANG, H.; LI, L.-Y. et al. Metabolism of linoleic and linolenic acids in hepatocytes of two freshwater fish with different n-3 or n-6 fatty acid requirements. **Aquaculture**, 515, p. 734595, 2020.

JUMPER, J.; EVANS, R.; PRITZEL, A.; GREEN, T. et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. **Nature**, 596, n. 7873, p. 583-589, 2021.

JUNG'A, J. O.; MITEMA, E. S.; GUTZEIT, H. O. Establishment and comparative analyses of different culture conditions of primary hepatocytes from Nile tilapia

Oreochromis niloticus as a model to study stress induction *in vitro*. **Bioone**, 41, n. 1, p. 1-6, 6, 2005.

KADIM, M. K.; RISJANI, Y. Biomarker for monitoring heavy metal pollution in aquatic environment: An overview toward molecular perspectives. **Emerging Contaminants**, 8, p. 195-205, 2022.

KÄGI, J. H.; KOJIMA, Y.; KISSLING, M. M.; LERCH, K. Metallothionein: an exceptional metal thiolate protein. **Ciba Found Symp**, n. 72, p. 223-237, 1979.

KÄGI, J. H.; VALEE, B. L. Metallothionein: a cadmium- and zinc-containing protein from equine renal cortex. **J Biol Chem**, 235, p. 3460-3465, 1960.

KAJARABILLE, N.; LATUNDE-DADA, G. O. Programmed Cell-Death by Ferroptosis: Antioxidants as Mitigators. **International Journal of Molecular Sciences**, 20, n. 19, p. 4968, 2019.

KEEN, J. H.; HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Mechanism for the several activities of the glutathione S-transferases. **J Biol Chem**, 251, n. 20, p. 6183-6188, 1976.

KIM, B. H.; TAKEMURA, A. Culture conditions affect induction of vitellogenin synthesis by estradiol-17 β in primary cultures of tilapia hepatocytes. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, 135, n. 2, p. 231-239, 2003.

KNAUER, K.; LAMPERT, C.; GONZALEZ-VALERO, J. Comparison of *in vitro* and *in vivo* acute fish toxicity in relation to toxicant mode of action. **Chemosphere**, 68, n. 8, p. 1435-1441, 2007.

KOIZUMI, T.; SHIRAKURA, H.; KUMAGAI, H.; TATSUMOTO, H. et al. Mechanism of cadmium-induced cytotoxicity in rat hepatocytes: cadmium-induced active oxygen-related permeability changes of the plasma membrane. **Toxicology**, 114, p. 125-134, 1996.

KONO, Y. Generation of superoxide radical during autoxidation of hydroxylamine and an assay for superoxide dismutase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 186, n. 1, p. 189-195, 1978.

KORKOLA, N. C.; STILLMAN, M. J. Structural Role of Cadmium and Zinc in Metallothionein Oxidation by Hydrogen Peroxide: The Resilience of Metal–Thiolate Clusters. **Journal of the American Chemical Society**, 145, n. 11, p. 6383-6397, 2023.

KUMAR, P.; NAGARAJAN, A.; UCHIL, P. D. Analysis of Cell Viability by the alamarBlue Assay. **Cold Spring Harbor protocols**, 2018, n. 6, 2018.

KWOK, M. L.; MENG, Q.; HU, X. L.; CHUNG, C. T. et al. Whole-transcriptome sequencing (RNA-seq) study of the ZFL zebrafish liver cell line after acute exposure to Cd²⁺ ions. **Aquatic Toxicology**, 228, p. 105628, 2020.

LAVILLE, N.; AÏT-AÏSSA, S.; GOMEZ, E.; CASELLAS, C. et al. Effects of human pharmaceuticals on cytotoxicity, EROD activity and ROS production in fish hepatocytes. **Toxicology**, 196, n. 1-2, p. 41-55, 2004.

LEE, H.; SUNG, E. J.; SEO, S.; MIN, E. K. et al. Integrated multi-omics analysis reveals the underlying molecular mechanism for developmental neurotoxicity of perfluorooctanesulfonic acid in zebrafish. **Environment International**, 157, p. 106802, 2021.

LIEBEL, S.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; SILVA, R. C.; RAMSDORF, W. A. et al. Cellular responses of *Prochilodus lineatus* hepatocytes after cylindrospermopsin exposure. **Toxicology in Vitro**, 25, n. 7, p. 1493-1500, 2011.

LIM, J. H.; WON, J. H.; AHN, K. H.; BACK, M. J. et al. Paraquat reduces natural killer cell activity via metallothionein induction. **Journal of Immunotoxicology**, 12, n. 4, p. 342-349, 2015.

LIN, Y. F.; CHENG, C. W.; SHIH, C. S.; HWANG, J. K. et al. MIB: Metal Ion-Binding Site Prediction and Docking Server. **Journal of chemical information and modeling**, 56, n. 12, p. 2287-2291, 2016.

LIU, C.; YU, K.; SHI, X.; WANG, J. et al. Induction of oxidative stress and apoptosis by PFOS and PFOA in primary cultured hepatocytes of freshwater tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquatic Toxicology**, 82, n. 2, p. 135-143, 2007.

LIU, X.; ZHANG, Q.; LI, S.; MI, P. et al. Developmental toxicity and neurotoxicity of synthetic organic insecticides in zebrafish (*Danio rerio*): A comparative study of deltamethrin, acephate, and thiamethoxam. **Chemosphere**, 199, p. 16-25, 2018.

LIVINGSTONE, D. R. Biotechnology and pollution monitoring: Use of molecular biomarkers in the aquatic environment. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, 57, n. 3, p. 195-211, 1993.

LU, C.-H.; CHEN, C.-C.; YU, C.-S.; LIU, Y.-Y. et al. MIB2: metal ion-binding site prediction and modeling server. **Bioinformatics (Oxford, England)**, 38, n. 18, p. 4428-4429, 2022.

LYONS, W. B. Water and urbanization. **Environmental Research Letters**, 9, n. 11, p. 111002, 2014.

MACEK, B.; MANN, M.; OLSEN, J. V. Global and Site-Specific Quantitative Phosphoproteomics: Principles and Applications. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, 49, n. 1, p. 199-221, 2009.

MAHMOOD, T.; YANG, P. C. Western blot: technique, theory, and trouble shooting. **N Am J Med Sci**, 4, n. 9, p. 429-434, 2012.

MALOVIC, E.; EALY, A.; KANTHASAMY, A.; KANTHASAMY, A. G. Emerging Roles of N6-Methyladenosine (m6A) Epitranscriptomics in Toxicology. **Toxicological Sciences**, 181, n. 1, p. 13-22, 2021.

MARGOSHES, M.; VALLEE, B. L. A cadmium protein from equine kidney cortex. **Journal of the American Chemical Society**, 79, n. 17, p. 4813-4814, 1957.

MARTINS, B. d. A.; TAKAHASHI, J. A. Metal-Rich Mine-Tailing Spills in Brazil and the Consequences for the Surrounding Water Bodies. **Water, Air, & Soil Pollution**, 233, n. 11, p. 473, 2022.

MATEO-SAGASTA, J.; MARJANI ZADEH, S.; TURRAL, H.; BURKE, J. Water pollution from agriculture: a global review. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Colombo: International Water Management Institute**, 2017.

MATSUOKA, S.; BALLIF, B. A.; SMOGORZEWSKA, A.; MCDONALD, E. R. et al. ATM and ATR Substrate Analysis Reveals Extensive Protein Networks Responsive to DNA Damage. **Science**, 316, n. 5828, p. 1160-1166, 2007.

MINGOIA, R. T.; GLOVER, K. P.; NABB, D. L.; YANG, C.-H. et al. Cryopreserved Hepatocytes from Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*): A Validation Study to Support Their Application in Bioaccumulation Assessment. **Environmental Science & Technology**, 44, n. 8, p. 3052-3058, 2010.

MISKO, T. P.; SCHILLING, R. J.; SALVEMINI, D.; MOORE, W. M. et al. A fluorometric assay for the measurement of nitrite in biological samples. **Anal Biochem**, 214, n. 1, p. 11-16, 1993.

MOSLEH, Y. Y.; PARIS-PALACIOS, S.; COUDERCHET, M.; BIAGIANTI-RISBOURG, S. et al. Metallothionein induction, antioxidative responses, glycogen and growth changes in *Tubifex tubifex* (Oligochaete) exposed to the fungicide, fenhexamid. **Environmental Pollution**, 135, n. 1, p. 73-82, 2005.

MOSLEH, Y. Y.; PARIS-PALACIOS S FAU - ARNOULT, F.; ARNOULT F FAU - COUDERCHET, M.; COUDERCHET M FAU - VERNET, G. et al. Metallothionein induction in the aquatic oligochaete *Tubifex tubifex* exposed to the herbicide isoproturon. n. 1379-1176, 2003.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

NAGAMATSU, P. C.; VARGAS, D. R.; PRODOCIMO, M. M.; OPUSKEVITCH, I. et al. Synthetic fish metallothionein design as a potential tool for monitoring toxic metals in water. **Environ Sci Pollut Res Int**, n. 1614-7499, 2020.

NAKA, K. S.; DE CÁSSIA DOS SANTOS MENDES, L.; DE QUEIROZ, T. K. L.; COSTA, B. N. S. et al. A comparative study of cadmium levels in blood from exposed populations in an industrial area of the Amazon, Brazil. **Science of The Total Environment**, 698, p. 134309, 2020.

NURSANTI, L.; NOFITASARI, E.; HAYATI, A.; HARIYANTO, S. et al. Effects of cadmium on metallothionein and histology in gills of tilapia (*Oreochromis niloticus*) at different salinities. **Toxicological & Environmental Chemistry**, 99, n. 5-6, p. 926-937, 2017.

- OHASHI, K.; KAWAI, S.; MURATA, K. Identification and characterization of a human mitochondrial NAD kinase. **Nature Communications**, 3, n. 1, p. 1248, 2012.
- OKA, S.-i.; BYUN, J.; HUANG, C.-y.; IMAI, N. et al. Nampt Potentiates Antioxidant Defense in Diabetic Cardiomyopathy. **Circulation Research**, 129, n. 1, p. 114-130, 2021.
- OKIMOTO, Y.; WATANABE, A.; NIKI, E.; YAMASHITA, T. et al. A novel fluorescent probe diphenyl-1-pyrenylphosphine to follow lipid peroxidation in cell membranes. **FEBS Letters**, 474, n. 2, p. 137-140, 2000.
- OLSSON, P. E. Metallothioneins in fish: induction and use in environmental monitoring. *In*: TAYLOR, E. W. (Ed.). **Toxicology of Aquatic Pollution: Physiological, Molecular and Cellular Approaches**. Cambridge: Cambridge University Press, p. 187-204, 1996.
- PAN, C.; KUMAR, C.; BOHL, S.; KLINGMUELLER, U. et al. Comparative Proteomic Phenotyping of Cell Lines and Primary Cells to Assess Preservation of Cell Type-specific Functions. **Molecular & Cellular Proteomics**, 8, n. 3, p. 443-450, 2009.
- PARMAR, T. K.; RAWTANI, D.; AGRAWAL, Y. K. Bioindicators: the natural indicator of environmental pollution. **Frontiers in Life Science**, 9, n. 2, p. 110-118, 2016.
- PATI, D.; HABIBI, H. R.; GEDAMU, L. Inhibition of zinc-induced metallothionein mRNA accumulation by gonadotropin-releasing hormone in human hepatocarcinoma cell line HepG2. **Eur J Biochem**, 242, n. 1, p. 36-40, 1996.
- POLLAK, N.; NIERE, M.; ZIEGLER, M. NAD Kinase Levels Control the NADPH Concentration in Human Cells*. **Journal of Biological Chemistry**, 282, n. 46, p. 33562-33571, 2007.
- POURRET, O.; BOLLINGER, J.-C.; HURSTHOUSE, A. Heavy metal: a misused term? **Acta Geochimica**, 40, n. 3, p. 466-471, 2021.
- POURRET, O.; HURSTHOUSE, A. It's Time to Replace the Term "Heavy Metals" with "Potentially Toxic Elements" When Reporting Environmental Research. **International journal of environmental research and public health**, 16, n. 22, p. 4446, 2019.
- PROZIALECK, W. C.; GRUNWALD GB FAU - DEY, P. M.; DEY PM FAU - REUHL, K. R.; REUHL KR FAU - PARRISH, A. R. et al. Cadherins and NCAM as potential targets in metal toxicity. n. 0041-008X, 2002.
- REILLY, T. P.; BELLEVUE, F. H.; WOSTER, P. M.; SVENSSON, C. K. Comparison of the *in vitro* cytotoxicity of hydroxylamine metabolites of sulfamethoxazole and dapsone. **Biochem Pharmacol**, 55, n. 6, p. 803-810, 1998.
- RENU, K.; CHAKRABORTY, R.; MYAKALA, H.; KOTI, R. et al. Molecular mechanism of heavy metals (Lead, Chromium, Arsenic, Mercury, Nickel and Cadmium) - induced hepatotoxicity – A review. **Chemosphere**, 271, p. 129735, 2021.
- REUS, I. S.; BANDO, I.; ANDRÉS, D.; CASCALES, M. Relationship between expression of HSP70 and metallothionein and oxidative stress during mercury chloride

induced acute liver injury in rats. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, 17, n. 3, p. 161-168, 2003.

REVEL, M.; ROMAN, C.; CHÂTEL, A. Is cell culture a suitable tool for the evaluation of micro- and nanoplastics ecotoxicity? **Ecotoxicology**, 30, n. 3, p. 421-430, 2021.

ROESIJADI, G. Metallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animals. **Aquatic Toxicology**, 22, n. 2, p. 81-113, 1992.

SAMPELS, S.; KROUPOVA, H. K.; LINHARTOVA, P. Effect of cadmium on uptake of iron, zinc and copper and mRNA expression of metallothioneins in HepG2 cells *in vitro*. **Toxicology in Vitro**, 44, p. 372-376, 2017.

SANCHEZ, W.; BURGEOT, T.; PORCHER, J. M. A novel "Integrated Biomarker Response" calculation based on reference deviation concept. **Environ Sci Pollut Res Int**, 20, n. 5, p. 2721-2725, 2013.

SATO, M.; BREMNER, I. Oxygen free radicals and metallothionein. **Free Radical Biology and Medicine**, 14, n. 3, p. 325-337, 1993.

SCHILD, T.; MCREYNOLDS, M. R.; SHEA, C.; LOW, V. et al. NADK is activated by oncogenic signaling to sustain pancreatic ductal adenocarcinoma. **Cell Reports**, 35, n. 11, p. 109238, 2021.

SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature Methods**, 9, n. 7, p. 671-675, 2012.

SCHREER, A.; TINSON, C.; SHERRY, J. P.; SCHIRMER, K. Application of Alamar blue/5-carboxyfluorescein diacetate acetoxymethyl ester as a noninvasive cell viability assay in primary hepatocytes from rainbow trout. **Anal Biochem**, 344, n. 1, p. 76-85, 2005.

SCOTT, J.; MINGHETTI, M. Chapter 34 - Toxicity testing: *in vitro* models in ecotoxicology. *In*: POPE, C. N. e LIU, J. (Ed.). **An Introduction to Interdisciplinary Toxicology**: Academic Press, p. 477-486, 2020.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, 25, p. 192-205, 1968.

SERAFIM, M. A. P. Metalotionina como biomarcador de contaminação metálica na amêijoia *Ruditapes decussatus*, Universidade de Algarve, Faro, Portugal, 2004.

SEVCIKOVA, M.; MODRA, H.; SLANINOVA, A.; SVOBODOVA, Z. Metals as a cause of oxidative stress in fish: a review. **Veterinární Medicina**, 56, n. 11, p. 537-546, 2011.

SHAHJAHAN, M.; TASLIMA, K.; RAHMAN, M. S.; AL-EMRAN, M. et al. Effects of heavy metals on fish physiology – A review. **Chemosphere**, 300, p. 134519, 2022.

SHANNON, P.; MARKIEL, A.; OZIER, O.; BALIGA, N. S. et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. **Genome research**, 13, n. 11, p. 2498-2504, 2003.

SHEN, X.; LIU, W.; CHEN, Y.; GUO, Y. et al. Diagnostic significance of metallothionein members in recognizing cadmium exposure in various organs under low-dose exposure. **Chemosphere**, 229, p. 32-40, 2019.

SHU, N.; ZHOU, T.; HOVMÖLLER, S. Prediction of zinc-binding sites in proteins from sequence. **Bioinformatics (Oxford, England)**, 24, n. 6, p. 775-782, 2008.

SOLDATOW, V. Y.; LECLUYSE, E. L.; GRIFFITH, L. G.; RUSYN, I. models for liver toxicity testing. **Toxicol Res (Camb)**, 2, n. 1, p. 23-39, 2013.

STEGEMAN, J. J.; GOLDSTONE, J. V.; HAHN, M. E. 10 - Perspectives on zebrafish as a model in environmental toxicology. *In*: PERRY, S. F.; EKKER, M., *et al* (Ed.). **Fish Physiology**: Academic Press, v. 29, p. 367-439, 2010.

STENGEL, D.; WAHBY, S.; BRAUNBECK, T. In search of a comprehensible set of endpoints for the routine monitoring of neurotoxicity in vertebrates: sensory perception and nerve transmission in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Environmental Science and Pollution Research**, 25, n. 5, p. 4066-4084, 2018.

STRIMBU, K.; TAVEL, J. A. What are biomarkers? **Curr Opin HIV AIDS**, 5, n. 6, p. 463-466, 2010.

STRUDWICK, X. L.; COWIN, A. J. Multifunctional Roles of the Actin-Binding Protein Flightless I in Inflammation, Cancer and Wound Healing. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, 8, Review, 2020.

SVENDSEN, C.; SPURGEON, D. J.; HANKARD, P. K.; WEEKS, J. M. A review of lysosomal membrane stability measured by neutral red retention: is it a workable earthworm biomarker? **Ecotoxicol Environ Saf**, 57, n. 1, p. 20-29, 2004.

SZKLARCZYK, D.; GABLE, A. L.; NASTOU, K. C.; LYON, D. et al. The STRING database in 2021: customizable protein–protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets. **Nucleic acids research**, 49, n. D1, p. D605-D612, 2020.

TCHOUNWOU, P. B.; YEDJOU, C. G.; PATLOLLA, A. K.; SUTTON, D. J. Heavy metal toxicity and the environment. **Experientia supplementum (2012)**, 101, p. 133-164, 2012.

THANGARAJ, R. S.; RAVI, C.; KUMAR, R.; DHARMARATNAM, A. et al. Derivation of two tilapia (*Oreochromis niloticus*) cell lines for efficient propagation of Tilapia Lake Virus (TiLV). **Aquaculture**, 492, p. 206-214, 2018.

THUMMABANCHA, K.; ONPARN, N.; SRISAPOOME, P. Analysis of hematologic alterations, immune responses and metallothionein gene expression in Nile tilapia

(*Oreochromis niloticus*) exposed to silver nanoparticles. **J Immunotoxicol**, 13, n. 6, p. 909-917, 2016.

TRIVEDI, S. P.; RATN, A.; AWASTHI, Y.; KUMAR, M. et al. *In vivo* assessment of dichlorvos induced histological and biochemical impairments coupled with expression of p53 responsive apoptotic genes in the liver and kidney of fish, *Channa punctatus* (Bloch, 1793). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, 245, p. 109032, 2021.

UCHEA, C.; OWEN, S. F.; CHIPMAN, J. K. Functional xenobiotic metabolism and efflux transporters in trout hepatocyte spheroid cultures. **Toxicology research**, 4, n. 2, p. 494-507, 2015.

UNTERGASSER, A.; RUIJTER, J. M.; BENES, V.; VAN DEN HOFF, M. J. B. Web-based LinRegPCR: application for the visualization and analysis of (RT)-qPCR amplification and melting data. **BMC Bioinformatics**, 22, n. 1, p. 398, 2021.

VAGHELA, k.; SHUKLA, D.; MISHRA, A.; JAIN, N. Impact of pollution on aquatic fauna of river ecosystem: a review. **International Journal of Current Advanced Research**, 6, p. 6518-6524, 2017.

VARADI, M.; ANYANGO, S.; DESHPANDE, M.; NAIR, S. et al. AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. **Nucleic acids research**, 50, n. D1, p. D439-D444, 2022.

VEGA-AVILA, E.; PUGSLEY, M. K. An overview of colorimetric assay methods used to assess survival or proliferation of mammalian cells. **Proc West Pharmacol Soc**, 54, p. 10-14, 2011.

VESEY, D. A. Transport pathways for cadmium in the intestine and kidney proximal tubule: Focus on the interaction with essential metals. **Toxicology letters**, 198, n. 1, p. 13-19, 2010.

VIARENGO, A.; BURLANDO, B.; DONDERO, F.; MARRO, A. et al. Metallothionein as a tool in biomonitoring programmes. **Biomarkers**, 4, n. 6, p. 455-466, 1999.

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. **Marine Environmental Research**, 44, n. 1, p. 69-84, 1997.

VICENTE, I. S. T.; ELIAS, F.; FONSECA-ALVES, C. E. Perspectivas da produção de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) no Brasil. **Revista de Ciências Agrárias**, 37, p. 392-398, 2014.

VIEIRA, L. R.; HISSA, D. C.; DE SOUZA, T. M.; SÁ, C. A. et al. Proteomics analysis of zebrafish larvae exposed to 3,4-dichloroaniline using the fish embryo acute toxicity test. **Environmental toxicology**, 35, n. 8, p. 849-860, 2020.

WALDRON, K. J.; RUTHERFORD, J. C.; FORD, D.; ROBINSON, N. J. Metalloproteins and metal sensing. **Nature**, 460, n. 7257, p. 823-830, 2009.

WALTERS, S. P.; THEBO, A. L.; BOEHM, A. B. Impact of urbanization and agriculture on the occurrence of bacterial pathogens and stx genes in coastal waterbodies of central California. **Water Research**, 45, n. 4, p. 1752-1762, 2011.

WANG, J.; ZHU, H.; LIU, X.; LIU, Z. N-acetylcysteine protects against cadmium-induced oxidative stress in rat hepatocytes. **J Vet Sci**, 15, n. 4, p. 485-493, 2014.

WEI, Q.; CHEN, Y.; GU, Y.-F.; ZHAO, W. Molecular Characterization and Functional Analysis of Leucine Zipper Transcription Factor Like 1 in Zebrafish (*Danio rerio*). **Frontiers in Physiology**, 10, 2019.

WORLD POPULATION PROSPECTS: summary of results. New York: UN 2022.

WU, D.; YOTNDA, P. Production and detection of reactive oxygen species (ROS) in cancers. **J Vis Exp**, n. 57, 2011.

WU, H.; XUAN, R.; LI, Y.; ZHANG, X. et al. Effects of cadmium exposure on digestive enzymes, antioxidant enzymes, and lipid peroxidation in the freshwater crab *Sinopotamon henanense*. **Environmental Science and Pollution Research**, 20, n. 6, p. 4085-4092, 2013.

XU, M.; DING, L.; LIANG, J.; YANG, X. et al. NAD kinase sustains lipogenesis and mitochondrial metabolism through fatty acid synthesis. **Cell Reports**, 37, n. 13, p. 110157, 2021.

XU, Y.; ZHAO, H.; WANG, Z.; GAO, H. et al. Developmental exposure to environmental levels of cadmium induces neurotoxicity and activates microglia in zebrafish larvae: From the perspectives of neurobehavior and neuroimaging. **Chemosphere**, 291, p. 132802, 2022.

YANG, C.; WANG, Z. The Epitranscriptomic Mechanism of Metal Toxicity and Carcinogenesis. **International Journal of Molecular Sciences**, 23, n. 19, p. 11830, 2022.

YANG, C. G.; WANG, X. L.; TIAN, J.; LIU, W. et al. Evaluation of reference genes for quantitative real-time RT-PCR analysis of gene expression in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Gene**, 527, n. 1, p. 183-192, 2013.

YANG, H.; ZHU, Z.; XIE, Y.; ZHENG, C. et al. Comparison of the combined toxicity of polystyrene microplastics and different concentrations of cadmium in zebrafish. **Aquatic Toxicology**, 250, p. 106259, 2022.

YANG, X.; SCHNACKENBERG, L. K.; SHI, Q.; SALMINEN, W. F. Chapter 13 - Hepatic toxicity biomarkers. In: GUPTA, R. C. (Ed.). **Biomarkers in Toxicology**. Boston: Academic Press, p. 241-259, 2014.

YUAN, G.; CURTOLO, F.; DENG, Y.; WU, T. et al. Highly Dynamic Polynuclear Metal Cluster Revealed in a Single Metallothionein Molecule. **Research**, 2021.

YUDKOVSKI, Y.; ROGOWSKA-WRZESINSKA, A.; YANKELEVICH, I.; SHEFER, E. et al. Quantitative immunochemical evaluation of fish metallothionein upon exposure to cadmium. **Mar Environ Res**, 65, n. 5, p. 427-436, 2008.

ZHANG, B.; GEORGIEV, O.; HAGMANN, M.; GÜNES, Ç. et al. Activity of Metal-Responsive Transcription Factor 1 by Toxic Heavy Metals and H₂O₂ *In Vitro* Is Modulated by Metallothionein. **Molecular and Cellular Biology**, 23, n. 23, p. 8471-8485, 2003.

ZHANG, C.; JIN, Y.; YU, Y.; XIANG, J. et al. Cadmium-induced oxidative stress, metabolic dysfunction and metal bioaccumulation in adult palaemonid shrimp *Palaemon macrodactylus* (Rathbun, 1902). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 208, p. 111591, 2021.

ZHANG, F.; LI, D.; YANG, Y.; ZHANG, H. et al. Combined effects of polystyrene microplastics and copper on antioxidant capacity, immune response and intestinal microbiota of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Science of The Total Environment**, 808, p. 152099, 2022.

ZHANG, T.; ZHANG, C.; ZHANG, J.; LIN, J. et al. Cadmium impairs zebrafish swim bladder development via ROS mediated inhibition of the Wnt / Hedgehog pathway. **Aquatic Toxicology**, 247, p. 106180, 2022.

ZHOU, B.; LIU, C.; WANG, J.; LAM, P. K. S. et al. Primary cultured cells as sensitive *in vitro* model for assessment of toxicants-comparison to hepatocytes and gill epithelia. **Aquatic Toxicology**, 80, n. 2, p. 109-118, 2006.

ZHOU, H.; XIANG, N.; XIE, J.; DIAO, X. Ecotoxicology: The History and Present Direction. *In*: FATH, B. (Ed.). **Encyclopedia of Ecology (Second Edition)**. Oxford: Elsevier, p. 415-423, 2019.

ZHU, Q.-L.; LI, W.-Y.; ZHENG, J.-L. Life-cycle exposure to cadmium induced compensatory responses towards oxidative stress in the liver of female zebrafish. **Chemosphere**, 210, p. 949-957, 2018.

ZHU, Q. L.; LUO, Z.; ZHUO, M. Q.; TAN, X. Y. et al. *In vitro* exposure to copper influences lipid metabolism in hepatocytes from grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). **Fish Physiol Biochem**, 40, n. 2, p. 595-605, 2014.

ZHU, X.; FU, H.; SUN, J.; XU, Q. Interaction between N6-methyladenosine (m6A) modification and environmental chemical-induced diseases in various organ systems. **Chemico-Biological Interactions**, 373, p. 110376, 2023.

ANEXO 1 – CERTIFICADO DO CEUA/BIO-UFPR



Nº 1286

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO - UFPR), instituída pela Resolução Nº 86/11 do Conselho de Ensino Pesquisa e Extensão (CEPE), de 22 de dezembro de 2011, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (DBCA) estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e com as normas internacionais para a experimentação animal.

STATEMENT

The Ethics Committee for Animal Use from the Biological Sciences Section of the Federal University of Paraná (CEUA/BIO - UFPR), established by the Resolution Nº 86/11 of the Teaching Research and Extension Council (CEPE) on December 22nd 2011, **CERTIFIES** that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the Brazilian Guidelines for Care and Use of Animals for Scientific and Teaching purposes established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and with the international guidelines for animal experimentation.

PROCESSO/PROCESS: 23075.045957/2019-25**APROVADO/APPROVAL:** 30/07/2019 - R.O. 06/2019**TÍTULO:** Efeito de múltiplos contaminantes ambientais sobre os biomarcadores vitelogenina e metalotioneina em hepatócitos de *Oreochromis niloticus*.**TITLE:** Effect of multiple environmental contaminants on the biomarkers vitellogenin and metallothionein in hepatocytes of *Oreochromis niloticus*.**AUTORES/AUTHORS:** Francisco Filipak Neto, Tugstênio Lima de Souza, Jessica Zablocki da Luz.**DEPARTAMENTO/DEPARTMENT:** Biologia Celular

Profa. Dra. Katya Naliwaiko
Coordenadora da CEUA



Documento assinado eletronicamente por **ISELEN ABREU FLORENTINO IVANOSKI, MEDICO VETERINARIO**, em 27/08/2019, às 12:25, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



A autenticidade do documento pode ser conferida [aqui](#) informando o código verificador **2067063** e o código CRC **FDAD40BB**.

ANEXO 2 – PROTOCOLOS DETALHADOS-CAPÍTULO I

EXTRAÇÃO E CULTIVO DE HEPATÓCITOS DE TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*)

SOLUÇÕES E REAGENTES

- MS22
- Cloroxedina alcoólica
- PBS-EDTA
- *Hepatocyte buffer*
- Colagenase IV
- *Hepatocyte medium*

PREPARO DAS SOLUÇÕES E REAGENTES

- *PBS-EDTA (Phosphate-buffered saline-EDTA) 1X – 1L*⁶
 1. Acrescentar 800 mL de água ultrapura num béquer e sob agitação lenta, adicionar: 7,977 g de NaCl (PM: 58,44); 0,2 g de KCl (PM: 74,55); 0,766 g de Na₂PO₄ (PM: 140,9509); 0,239 g de KH₂PO₄ (PM: 136,08) e 0,744 g de EDTA (PM: 292,244)
 2. Manter sob agitação até a completa dissolução dos sais
 3. Ajustar o pH para 7,6 com HCl ou NaOH
 4. Completar para 1 L com água ultrapura, na proveta
 5. Transferir para frasco de vidro
 6. Autoclavar
 7. Armazenar à 2-8 °C

- *Hepatocyte buffer – 1X – 1L*⁷
 1. Acrescentar 800 mL de água ultrapura num béquer e sob agitação lenta, adicionar: 7,98 g de NaCl (PM: 58,44); 0,402 g de KCl (PM: 74,55); 0,199 g de MgSO₄·7H₂O (PM: 246,48); 0,059 g de KH₂PO₄ (PM:136,08); 0,046 g de Na₂PO₄ (PM: 140,9509) e 0,42g de NaHCO₃ (PM: 84,006)
 2. Manter sob agitação até a completa dissolução dos sais
 3. Ajustar o pH para 7,6 com HCl ou NaOH
 4. Completar para 1 L com água ultrapura, na proveta
 5. No fluxo laminar, filtrar com membrana 0,22 µm
 6. Transferir para frasco estéril
 7. Armazenar à 2-8 °C

- *Hepatocyte medium – 1L*
 1. Preparar os meios L15 e F12 separadamente suplementando com 0,075 g L⁻¹ de NaHCO₃ e 1,787 g de HEPES
 2. No fluxo laminar, esterilizar filtrando com membrana de poros 0,22 µm
 3. Armazenar a -20 °C
 4. No momento de uso, misturar os meios L15 e F12 nas proporções L15 85% e F12 15% e suplementar com 0,01mg mL⁻¹ de insulina, 5% de soro fetal bovino e

⁶ O tampão é composto por NaCl 136,5 mM, KCl 2,68 mM, Na₂PO₄ 5,4 mM, KH₂PO₄ 1,76 mM e EDTA 2 mM. A adição do EDTA é devido a sua atividade anticoagulante.

⁷ O tampão é composto por NaCl 136,6 mM, KCl 5,4 mM, MgSO₄ 0,81mM, KH₂PO₄ 0,44 mM, Na₂PO₄ 0,33 mM e NaHCO₃ 5,0 mM. É preciso usar o método de esterilização por filtração ao invés de autoclavar devido a adição de NaHCO₃.

antibiótico-antimicótico (10 unidades mL⁻¹ de penicilina, 0,01 mg mL⁻¹ de estreptomicina e 0,025 µg mL⁻¹ de anfotericina B)

PROCEDIMENTOS

- *Primeira etapa (na bancada)*
 1. Anestésiar o peixe com MS222 0,02%
 2. Matar pelo método de transecção da medula
 3. Limpar com cloroxedina alcoólica 2% e remover as escamas do local onde será feita a incisão
 4. Depois de feita a assepsia na bancada e próximo de uma lamparina, manter o peixe com a cabeça para o lado esquerdo
 5. Fazer a incisão com o auxílio de material cirúrgico autoclavado. Usando bisturi e pinça, dissecar o fígado com cuidado, pois quanto mais inteiro for extraído, melhor será para a perfusão.
 6. Colocar o fígado em tubo de ensaio com 20 mL de PBS-EDTA

- *Segunda etapa (no fluxo laminar)*
 1. Limpar o fluxo e deixar sob a UV, antes de iniciar a extração do fígado, os materiais que serão usados
 2. Perfundir o órgão com PBS-EDTA, usando para isso seringa e agulha 22-G e o fígado colocado em uma placa de petri estéril com gaze
 3. Depois de feita a perfusão do fígado (fica mais esbranquiçado) com auxílio de seringa de 20 mL e agulha 22-G, colocar em outra placa petri estéril com 20 mL de *hepatocyte buffer* com 0,3 mg mL⁻¹ de colagenase IV e com um bisturi, cortar em pequenos pedaços.
 4. Manter em um tubo de ensaio na incubadora, homogeneizando por inversão a cada 10 min, por 30 min
 5. No fluxo laminar, homogeneizar com o auxílio de uma pipeta pasteur por mais 10 min
 6. Filtrar ou peneirar em malha com poros pequenos (100 µm), podendo ser de metal que possibilita a esterilização por autoclavagem, para remover os pedaços maiores não digeridos pela enzima
 7. Centrifugar por 3 min a 50 g
 8. Suspender em meio de cultura e centrifugar a 50 g (2X)
 9. Suspender em meio de cultura e em um tubo de 2 mL, preparar uma suspensão de hepatócitos diluída (10X) para que seja possível fazer a contagem de células na câmara de Neubauer
 10. Cultivar em placas de ensaio na densidade necessária. Para ensaios de viabilidade: 2,1x10⁵ células por cm², para ensaios de detecção da metalotioneína: 3,1x10⁵ células por cm²

Células por cm ²	Placa	Quantidade de meio por poço	Células por mL
2,1x10 ⁵	96 poços	200 µL	3,36x10 ⁵
	24 poços	500 µL	8,11x10 ⁵
	6 poços	2 mL	10,08x10 ⁵
3,1x10 ⁵	96 poços	200 µL	4,96x10 ⁵
	24 poços	500 µL	11,96x10 ⁵
	6 poços	2 mL	14,88x10 ⁵
Células por cm ²	Garrafa	Quantidade de meio por garrafa	Células por mL
2,1x10 ⁵	Tipo 1	2,5 mL	10,5x10 ⁵
	Tipo 2	5 mL	10,5x10 ⁵
3,1x10 ⁵	Tipo 1	2,5 mL	15,5x10 ⁵
	Tipo 2	5 mL	15,5x10 ⁵

AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE

METABOLISMO DO MTT

SOLUÇÕES E REAGENTES

- Solução de MTT 10X
- PBS
- DMSO

PREPARO DAS SOLUÇÕES E REAGENTES

- *Solução de MTT 10X*
1. Pesar 5 mg mL⁻¹ de MTT e diluir em água ultrapura
 2. Armazenar a -20 °C

PROCEDIMENTOS

1. Depois de findado o tempo de exposição, adicionar solução de MTT nos poços para que a concentração final seja 0,5 mg mL⁻¹, p. ex., em 250 µL de meio de cultura, remover 25 µL e substituir esses 25 µL pela solução de MTT
2. Incubar as células por 2 h
3. Remover bem o meio dos poços, não encostando a ponteira e com cuidado para não soltar as células
4. Caso as células estejam bem aderidas é possível lavar os poços 1X com 200 µL de PBS
5. Adicionar 100 µL por poço de DMSO para dissolver os cristais
6. Medir a absorbância a 540 nm
7. Para calcular o valor relativo ao controle de metabolização do MTT, depois de subtrair o valor do branco, divide-se o valor da absorbância dos grupos expostos pelo valor da absorbância do controle

RETENÇÃO DO VERMELHO NEUTRO E ADESÃO CELULAR

SOLUÇÕES E REAGENTES

- Solução de vermelho neutro 10X
- PBS
- Solução de extração do vermelho neutro
- Solução de cristal violeta 10X
- Ácido acético 33% em água ultrapura

PREPARO DAS SOLUÇÕES E REAGENTES

- *Solução de vermelho neutro 10X*

1. Pesar 1 mg mL⁻¹ de vermelho neutro e diluir em água ultrapura
2. Armazenar a -20°C

- *Solução de cristal violeta 10X*

1. Pesar 25 mg mL⁻¹ de cristal violeta e diluir em água ultrapura
2. Armazenar a -20 °C

- *Solução de extração do vermelho neutro*

1. Diluir em água ultrapura ácido acético, concentração final de 1% e etanol, concentração final de 50 %
2. Armazenar a 2-8 °C

PROCEDIMENTOS

1. Depois de findado o tempo de exposição, adicionar solução de vermelho neutro nos poços para que a concentração final seja 0,1 mg mL⁻¹, p. ex., em 250 µL de meio de cultura, remover 25 µL e substituir esses 25 µL pela solução de vermelho neutro
2. Incubar as células por 2 h
3. Remover bem o meio dos poços, não encostando a ponteira e com cuidado para não soltar as células
4. Caso as células estejam bem aderidas é possível lavar os poços 1X com 200 µL de PBS
5. Adicionar 100 µL por poço de solução de extração do vermelho neutro
6. Agitar por 10 min para homogeneização
7. Medir a absorbância a 540 nm
8. Descartar a solução dos poços invertendo a placa, pois as células estão fixadas
9. Adicionar 100 µL por poço de solução de cristal violeta a 0,25 mg mL⁻¹ em água ultrapura
10. Corar por 10 min
11. Lavar 1X com PBS
12. Adicionar 100 µL poço de ácido acético 33%
13. Agitar por 10 min para homogeneização
14. Medir a absorbância a 570 nm
15. Para calcular o valor relativo ao controle de retenção do vermelho neutro e adesão celular, depois de subtrair o valor do branco, divide-se o valor da absorbância dos grupos expostos pelo valor da absorbância do controle

AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA

MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

SOLUÇÕES E REAGENTES

- Etanol 100%
- CO₂ líquido

PROCEDIMENTOS

1. Depois das células serem cultivadas em lâminulas redondas em poços de placas de 24 poços, fixar com paraformaldeído 4% em PBS por 30 min
2. Após fixação, desidratar as células com etanol 100%
3. Submeter ao ponto crítico (secagem em CO₂ líquido)
4. Metalizar com ouro para observação em microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM-6360LV)

IMUNOCITOQUÍMICA

SOLUÇÕES E REAGENTES

- Solução de permeabilização: PBS + triton X-100 0,2 %
- Solução de lavagem: PBS
- DAPI e faloidina-FITC

PROCEDIMENTOS

- Permeabilização

1. Depois das células serem cultivadas em lâminulas redondas em poços de placas de 24 poços, ficar com paraformaldeído 4% em PBS por 30 min
2. Incubar as células com solução de permeabilização por 10 min
3. Lavar as células com PBS 3X por 5 min

- Marcação de núcleo e citoesqueleto

1. Incubar as células com DAPI (1:1000) por 1 min
2. Lavar as células com PBS 1X
3. Incubar as células com faloidina-FITC (1:400) por 20 min
4. Lavar as células com PBS 1X

- Montagem da lâmina

1. Remover as lâminulas redondas do poço e colocar sobre a lâmina com uma gota de *fluormount*
2. Selar a lâminula com esmalte transparente
3. Armazenar no escuro a 4 °C até a captura das imagens

CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

MÉTODO DE BRADFORD

SOLUÇÕES E REAGENTES

- Reativo de Bradford
- Água ultrapura
- Albumina de soro bovina (padrão de 1 mg mL⁻¹ preparados em PBS)

PROCEDIMENTOS

1. Testar o sobrenadante das amostras para verificar se necessitam ser diluídas. Para isso, pipetar 10 µL da amostra (selecionar por amostragem 2-3 amostras), 10 µL do tampão empregado na homogeneização e 10 µL de solução de BSA a 1 mg mL⁻¹ em poços diferentes de uma microplaca de 96 poços. Acrescentar a cada um dos poços 250 µL do reativo de Bradford e comparar as cores. Caso a cor da amostra esteja mais intensa que a do padrão de BSA diluir a amostra; a cor da amostra deverá ficar visualmente menos intensa que a do padrão de BSA, mas mais intensa que a do tampão.

2. Pipetar 10 μL das amostras em triplicata
3. Pipetar 10 μL do branco em triplicata (solução de homogeneização das amostras)
4. Pipetar 10 μL da curva-padrão em triplicata (0; 0,125; 0,250; 0,500; 1,0 mg de BSA por mL, preparado em PBS)
5. Pipetar em TODOS os poços utilizados 250 μL do reativo de Bradford
6. Aguardar 5 min (manter a microplaca protegida da luz - estável até no máximo 1 h)
7. Medir a absorbância a 595 nm em espectrofotômetro de microplacas
8. Verificar TODOS os valores de absorbância para averiguar se alguma das amostras precisa ser diluída novamente (caso seu valor de ABS esteja acima do valor do ponto correspondente a 1,0 mg mL^{-1}), ou se a curva-padrão precisa ser refeita (caso o $R^2 < 0,95$)
9. Para o cálculo da concentração de proteínas:
 - Calcular a equação da reta a partir dos valores de ABS
 - Com esses dados construir uma curva de 1° grau (indicar para a reta passar pela coordenada (0,0), ou seja, $b = 0$; solicitar o valor de R^2 e a equação da reta)
 - Calcular as médias e subtrair o valor da média do branco
 Com a equação da reta ($y = a x + b$), calcular a concentração de proteínas através da fórmula $[\text{proteínas}] = [(\text{Média ABS} - \text{branco}) \times \text{diluição}] / a$

AVALIAÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO

PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

SOLUÇÕES E REAGENTES

- 2',7'-dichlorodihidrofluoresceína diacetato (H2DCFDA)
- Meio de cultura

PROCEDIMENTOS

1. Remover o meio no qual os hepatócitos estavam expostos
2. Adicionar meio de cultura contendo 10 μM de H2DCFDA
3. Incubar durante 15 min a 25 °C e protegido da luz
4. Medir a fluorescência do H2DCFDA oxidado em DCF pela célula usando o comprimento de onda 488 nm (excitação) e 530 nm (emissão)

PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE NITROGÊNIO

SOLUÇÕES E REAGENTES

- 2,3-diaminonaftaleno (DAN)
- HCl
- NaOH

PROCEDIMENTOS

1. Transferir 150 μL do meio no qual os hepatócitos estavam expostos para placa preta
2. Adicionar 10 μL de DAN a 0,5 mg mL^{-1} em HCl 0,62 M por poço
3. Incubar durante 30 min a 25 °C e protegido da luz
4. Adicionar 5 μL de NaOH a 2,8 M por poço, para deixar no pH ideal para a leitura da fluorescência
5. Medir a fluorescência do DAN que reagiu com óxido nítrico formando um composto fluorescente usando o comprimento de onda 365 nm (excitação) e 450 nm (emissão)

ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)

SOLUÇÕES E REAGENTES

- *Solução de azul de nitrotetrazólio* (NBT) 100 uM em EDTA 0,05 mM
- *Solução de cloreto ou sulfato de hidroxilamina* 36,85 mM em tampão de carbonato de sódio 182 mM, pH 10,2

PROCEDIMENTOS

1. Lisar as células (0,1 g em 0,5 mL de tampão de lise)
2. Centrifugar a 15.000 g por 30 min, 0-4 °C
3. Transferir o sobrenadante para novo tubo
4. Quantificar e normalizar as proteínas totais para 1 mg mL⁻¹
5. Adicionar 30 µL de amostra, em triplicata em microplacas de 96 poços
6. Adicionar 30 µL de tampão (branco)
7. Adicionar 70 µL da solução de NBT
8. Adicionar 100 µL de solução de hidroxilamina para iniciar a reação
9. Medir a absorbância a 560 nm (tempo zero) em intervalos de 1 min por 30 min
10. Calcular o valor do delta ABS. Utilizar a fórmula: atividade = [(ABS/min) do branco / ABS/min da amostra]⁻¹ x 20/3. Os resultados serão expressos em: Unidades x min⁻¹ x mg proteína⁻¹ (1 unidade de SOD equivale a atividade capaz de inibir a redução do NBT em 50%)

ATIVIDADE DA CATALASE

SOLUÇÕES E REAGENTES

- *Meio de reação para 250 poços*: 2,5 mL de Tampão Tris-HCl 1,0 M, EDTA 5,0 mM, pH 8,0 (pode ser estocado), 47,32 mL de água desionizada e 180 µL de H₂O₂ (30%, d=1,1 g mL⁻¹, MM = 34 g mol⁻¹; concentração final no ensaio = 30 mM)

PROCEDIMENTOS

1. Utilizar amostras normalizadas para 0,3 mg mL⁻¹ de proteínas
2. Adicionar 10 µL de amostra em triplicata em microplacas de 96 poços
3. Adicionar 10 µL de tampão (branco)
4. Adicionar 190 µL de meio de reação
5. Medir imediatamente a absorbância a 240 nm (tempo total = 60 s, intervalos = 1 s)
*Os valores de ABS deverão diminuir com o tempo
6. Com os dados, selecionar o primeiro intervalo de 30 s cujo R² > 0,99 e calcular delta ABS no intervalo de 1 min ((ABS inicial – ABS final) x2)
7. Verificar o valor do branco; ele não deverá sofrer redução consistente de ABS.
8. Para calcular a atividade da catalase empregar a fórmula: (ΔABS/min x 100) / 40. Os resultados serão expressos em: mmoles de H₂O₂ degradado x min⁻¹ x mg de proteína⁻¹

ATIVIDADE DA GLUTATIONA S-TRANSFERASE – GST

SOLUÇÕES E REAGENTES

- *Meio de reação para 100 poços*: 0,0093 g de GSH ([GSH] final = 1,5 mM), 0,0081 g de CDNB ([CDNB] final = 2 mM; diluir inicialmente em 1 mL de etanol PA) e 19 mL de tampão fosfato de potássio (0,1 M, pH 6,5)

PROCEDIMENTOS

1. Utilizar amostras normalizadas para 1 mg mL⁻¹ de proteínas
2. Adicionar 20 µL de amostra em triplicata em microplacas de 96 poços
3. Adicionar 20 µL de tampão (branco)
4. Adicionar 180 µL de meio de reação
5. Com os dados, selecionar o primeiro intervalo de 180 s cujo R² > 0,99 e calcular delta ABS no intervalo de 1 min ((ABS inicial – ABS final)/3)
6. Verificar o valor do branco; ele não deverá sofrer aumento consistente de ABS.
7. Para calcular a atividade da GST empregar a fórmula: (ΔABS/min x 10)/5,76. Os resultados serão expressos em: µmoles de tioéter formado x min⁻¹ x mg de proteína⁻¹

ATIVIDADE DA GLICOSE-6-FOSFATO DESIDROGENASE (G6PDH)

SOLUÇÕES E REAGENTES

- *Meio de reação para 100 poços:* 0,0157 g de NADP⁺ (MM = 743.41 g mol⁻¹; [NADP⁺] final na microplaca = 1,0 mM), 0,0129 g de D-glicose 6-fosfato, sal dissódico (MM = 304.10 g mol⁻¹; [G6P] final na microplaca = 2,0 mM) e 18 mL de tampão Tris-HCl 0,1 M, MgCl₂ 10 mM, pH 8,0

PROCEDIMENTOS

1. Utilizar amostras normalizadas para 1 mg mL⁻¹ de proteínas
2. Adicionar 30 µL de amostra em triplicata em microplacas de 96 poços
3. Adicionar 30 µL de tampão (branco)
4. Adicionar 170 µL de meio de reação
5. Medir o acréscimo na absorvância imediatamente a 340 nm (tempo total = 6 min, intervalos = 40 s). Os valores de ABS deverão aumentar com o tempo
6. Com os dados, selecionar o primeiro intervalo de 200 s cujo r² > 0,99, calcular delta ABS no intervalo de 1 min ((ABS inicial – ABS final)/(10/3)) e subtrair o valor do branco
7. Para calcular a atividade da G6PDH empregar a fórmula: (ΔABS/min x 20/3) / 3,732. Os resultados serão expressos em: µmoles de NADP⁺ reduzido x min⁻¹ x mg de proteína⁻¹

CONCENTRAÇÃO DE TIÓIS NÃO PROTÉICOS

SOLUÇÕES E REAGENTES

- *Solução de ácido tricloroacético a 50% para 100 amostras:* 5 g de ácido tricloroacético em 10 mL de água desionizada
- *Solução de DTNB para 100 amostras:* 0,0079 g de ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB, MM=396,3 g mol⁻¹) em 500 µL de metanol PA. Então, adicionar 7,5 mL de tampão Tris-base a 0,4 M, pH 8,9 ([DTNB] = 2,5 mM)
- *Curva-padrão de GSH* (fazer uma curva para cada análise realizada): Dissolver 0,0012 g GSH (MM = 307,32 g mol⁻¹) em 976 µL de tampão tris-base a 0,4 M, pH 8,9 ([GSH] = 4 mM). A partir desta solução, preparar as demais (160, 80, 40, 20, 10, 5 e 0 µM)

PROCEDIMENTOS

1. Adicionar 50 µL da solução de ácido tricloroacético a 50% aos 200 µL do sobrenadante ainda congelado. Para o branco, pipetar 50 µL da solução de ácido tricloroacético a 50% em 200 µL de PBS

2. Misturar bem
3. Centrifugar a 5000 g por 10 min e 4 °C
4. Adicionar 50 µL do branco em microplaca em triplicata
5. Adicionar 50 µL da curva-padrão em microplaca em triplicata (preparada em separado)
6. Adicionar 50 µL do sobrenadante das amostras em microplaca em triplicata
7. Adicionar em todos os poços utilizados 230 µL do tampão Tris-base 0,4 M, pH 8,9
8. Adicionar em todos os poços utilizados 20 µL de solução de DTNB
9. Aguardar 5-10 min a temperatura ambiente
10. Mediar a absorbância a 415 nm
11. Calcular a equação da reta a partir dos valores de absorbância
12. Calcular as médias e subtrair o valor da média do branco para cada amostra
13. Com a equação da reta ($y=ax+b$), calcular a concentração de tióis através da fórmula $[\text{Tióis}] = ((\text{Média ABS} - \text{branco}) \times 1,25) / (ax [\text{proteínas}])$. A concentração de tióis será expressa em nanomoles de tióis x mg de proteínas⁻¹

PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

SOLUÇÕES E REAGENTES

- Difenil-1-Pirenilfosfina (DPPP)
- Meio de cultura

PROCEDIMENTOS

1. Remover o meio no qual os hepatócitos estavam expostos
2. Adicionar meio de cultura contendo 100 uM de DPPP
3. Incubar durante 15 min a 25 °C e protegido da luz
4. Remover o meio de cultura e adicionar 100 µL de DMSO em cada poço
5. Medir a fluorescência do DPPP oxidado pela célula usando o comprimento de onda 351 nm (excitação) e 380 nm (emissão)

ANEXO 3 – PROTOCOLOS DETALHADOS-CAPÍTULO II

EXTRAÇÃO E CULTIVO DE HEPATÓCITOS DE TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*)

SOLUÇÕES E REAGENTES

- MS22
- Cloroxedina alcoólica
- PBS-EDTA
- *Hepatocyte buffer*
- Colagenase IV
- *Hepatocyte medium*

PREPARO DAS SOLUÇÕES E REAGENTES

- *PBS-EDTA (Phosphate-buffered saline-EDTA) 1X – 1L*⁸
 1. Acrescentar 800 mL de água ultrapura num béquer e sob agitação lenta, adicionar: 7,977 g de NaCl (PM: 58,44); 0,2 g de KCl (PM: 74,55); 0,766 g de Na₂PO₄ (PM: 140,9509); 0,239 g de KH₂PO₄ (PM: 136,08) e 0,744 g de EDTA (PM: 292,244)
 2. Manter sob agitação até a completa dissolução dos sais
 3. Ajustar o pH para 7,6 com HCl ou NaOH
 4. Completar para 1 L com água ultrapura, na proveta
 5. Transferir para frasco de vidro
 6. Autoclavar
 7. Armazenar à 2-8 °C
- *Hepatocyte buffer – 1X – 1L*⁹
 1. Acrescentar 800 mL de água ultrapura num béquer e sob agitação lenta, adicionar: 7,98 g de NaCl (PM: 58,44); 0,402 g de KCl (PM: 74,55); 0,199 g de MgSO₄·7H₂O (PM: 246,48); 0,059 g de KH₂PO₄ (PM:136,08); 0,046 g de Na₂PO₄ (PM: 140,9509) e 0,42g de NaHCO₃ (PM: 84,006)
 2. Manter sob agitação até a completa dissolução dos sais
 3. Ajustar o pH para 7,6 com HCl ou NaOH
 4. Completar para 1 L com água ultrapura, na proveta
 5. No fluxo laminar, filtrar com membrana 0,22 µm
 6. Transferir para frasco estéril
 7. Armazenar à 2-8 °C
- *Hepatocyte medium – 1L*
 1. Preparar os meios L15 e F12 separadamente suplementando com 0,075 g L⁻¹ de NaHCO₃ e 7,5 mM de HEPES
 2. No fluxo laminar, esterilizar filtrando com membrana de poros 0,22 µm
 3. Armazenar a -20 °C
 4. No momento de uso, misturar os meios L15 e F12 nas proporções L15 85% e F12 15% e suplementar com 0,01mg mL⁻¹ de insulina, 5% de soro fetal bovino e

⁸ O tampão é composto por NaCl 136,5 mM, KCl 2,68 mM, Na₂PO₄ 5,4 mM, KH₂PO₄ 1,76 mM e EDTA 2 mM. A adição do EDTA é devido a sua atividade anticoagulante.

⁹ O tampão é composto por NaCl 136,6 mM, KCl 5,4 mM, MgSO₄ 0,81mM, KH₂PO₄ 0,44 mM, Na₂PO₄ 0,33 mM e NaHCO₃ 5,0 mM. É preciso usar o método de esterilização por filtração ao invés de autoclavar devido a adição de NaHCO₃.

antibiótico-antimicótico (10 unidades mL⁻¹ de penicilina, 0,01 mg mL⁻¹ de estreptomicina e 0,025 µg mL⁻¹ de anfotericina B)

PROCEDIMENTOS

- Primeira etapa (na bancada)

1. Anestésiar o peixe com MS222 0,02%
2. Matar pelo método de transecção da medula
3. Limpar com cloroxedina alcoólica 2% e remover as escamas do local onde será feita a incisão
4. Depois de feita a assepsia na bancada e próximo de uma lamparina, manter o peixe com a cabeça para o lado esquerdo
5. Fazer a incisão com o auxílio de material cirúrgico autoclavado. Usando bisturi e pinça, dissecar o fígado com cuidado, pois quanto mais inteiro for extraído, melhor será para a perfusão.
6. Colocar o fígado em tubo de ensaio com 20 mL de PBS-EDTA

- Segunda etapa (no fluxo laminar)

1. Limpar o fluxo e deixar sob a UV, antes de iniciar a extração do fígado, os materiais que serão usados
2. Perfundir o órgão com PBS-EDTA, usando para isso seringa e agulha 22-G e o fígado colocado em uma placa de petri estéril com gaze
3. Depois de feita a perfusão do fígado (fica mais esbranquiçado) com auxílio de seringa de 20 mL e agulha 22-G, colocar em outra placa petri estéril com 20 mL de *hepatocyte buffer* com 0,3 mg mL⁻¹ de colagenase IV e com um bisturi, cortar em pequenos pedaços
4. Manter em um tubo de ensaio na incubadora, homogeneizando por inversão a cada 10 min, por 30 min
5. No fluxo laminar, homogeneizar com o auxílio de uma pipeta pasteur por mais 10 min
6. Filtrar ou peneirar em malha com poros pequenos (100 µm), podendo ser de metal que possibilita a esterilização por autoclavagem, para remover os pedaços maiores não digeridos pela enzima
7. Centrifugar por 3 min a 50 g
8. Ressuspender em meio de cultura e centrifugar a 50 g (2X)
9. Ressuspender em meio de cultura e em um tubo de 2 mL, preparar uma suspensão de hepatócitos diluída (10X) para que seja possível fazer a contagem de células na câmara de Neubauer
10. Subcultivar para as placas de ensaio na densidade necessária. Para ensaios de viabilidade: 2,1x10⁵ células por cm², para ensaios de detecção da metalotioneína: 3,1x10⁵ células por cm²

Células por cm ²	Placa	Quantidade de meio por poço	Células por mL
2,1x10 ⁵	96 poços	200 µL	3,36x10 ⁵
	24 poços	500 µL	8,11x10 ⁵
	6 poços	2 mL	10,08x10 ⁵
3,1x10 ⁵	96 poços	200 µL	4,96x10 ⁵
	24 poços	500 µL	11,96x10 ⁵
	6 poços	2 mL	14,88x10 ⁵
Células por cm ²	Garrafa	Quantidade de meio por garrafa	Células por mL
2,1x10 ⁵	Tipo 1	2,5 mL	10,5x10 ⁵
	Tipo 2	5 mL	10,5x10 ⁵
3,1x10 ⁵	Tipo 1	2,5 mL	15,5x10 ⁵
	Tipo 2	5 mL	15,5x10 ⁵

AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE

METABOLISMO DO MTT

SOLUÇÕES E REAGENTES

- Solução de MTT 10X
- PBS
- DMSO

PREPARO DAS SOLUÇÕES E REAGENTES

- *Solução de MTT 10X*
1. Pesar 5 mg mL⁻¹ de MTT e diluir em água ultrapura
 2. Armazenar a -20 °C

PROCEDIMENTOS

1. Depois de findado o tempo de exposição, adicionar solução de MTT nos poços para que a concentração final seja 0,5 mg mL⁻¹, p. ex., em 250 µL de meio de cultura, remover 25 µL e substituir esses 25 µL pela solução de MTT
2. Incubar as células por 2 h
3. Remover bem o meio dos poços, não encostando a ponteira e com cuidado para não soltar as células
4. Caso as células estejam bem aderidas é possível lavar os poços 1X com 200 µL de PBS
5. Adicionar 100 µL por poço de DMSO para dissolver os cristais
6. Medir a absorbância a 540 nm
7. Para calcular o valor relativo ao controle de metabolização do MTT, depois de subtrair o valor do branco, divide-se o valor da absorbância dos grupos expostos pelo valor da absorbância do controle

RETENÇÃO DO VERMELHO NEUTRO E ADESÃO CELULAR

SOLUÇÕES E REAGENTES

- Solução de vermelho neutro 10X
- PBS
- Solução de extração do vermelho neutro
- Solução de cristal violeta 10X
- Ácido acético 33% em água ultrapura

PREPARO DAS SOLUÇÕES E REAGENTES

- Solução de vermelho neutro 10X

1. Pesar 1 mg mL⁻¹ de vermelho neutro e diluir em água ultrapura
2. Armazenar a -20°C

- Solução de cristal violeta 10X

1. Pesar 25 mg mL⁻¹ de cristal violeta e diluir em água ultrapura
2. Armazenar a -20 °C

- Solução de extração do vermelho neutro

1. Diluir em água ultrapura ácido acético, concentração final de 1% e etanol, concentração final de 50 %
2. Armazenar a 2-8 °C

PROCEDIMENTOS

1. Depois de findado o tempo de exposição, adicionar solução de vermelho neutro nos poços para que a concentração final seja 0,1 mg mL⁻¹, p. ex., em 250 µL de meio de cultura, remover 25 µL e substituir esses 25 µL pela solução de vermelho neutro
2. Incubar as células por 2 h
3. Remover bem o meio dos poços, não encostando a ponteira e com cuidado para não soltar as células
4. Caso as células estejam bem aderidas é possível lavar os poços 1X com 200 µL de PBS
5. Adicionar 100 µL por poço de solução de extração do vermelho neutro
6. Agitar por 10 min para homogeneização
7. Medir a absorbância a 540 nm
8. Descartar a solução dos poços invertendo a placa, pois as células estão fixadas
9. Adicionar 100 µL por poço de solução de cristal violeta a 0,25 mg mL⁻¹ em água ultrapura
10. Corar por 10 min
11. Lavar 1X com PBS
12. Adicionar 100 µL por poço de ácido acético 33%
13. Agitar por 10 min para homogeneização
14. Medir a absorbância a 570 nm
15. Para calcular o valor relativo ao controle de retenção do vermelho neutro e adesão celular, depois de subtrair o valor do branco, divide-se o valor da absorbância dos grupos expostos pelo valor da absorbância do controle

METABOLISMO DO RESAZURIN

SOLUÇÕES E REAGENTES

- Solução de resazurin 1000X (estoque)
- Solução de resazurin 10X (uso)

PREPARO DAS SOLUÇÕES E REAGENTES

- Solução de resazurin 44 mM – 1000X

1. Pesar 5 g de resazurin e diluir em PBS
2. Armazenar a -20 °C

- Solução de resazurin 440 µM – 10X

1. Adicionar 500 μL da solução de resazurin 1000X em 50 mL de PBS
2. Armazenar a 2-8 $^{\circ}\text{C}$

PROCEDIMENTOS

1. Depois da exposição, adicionar solução de resazurin nos poços para que a concentração final seja 44 μM , p. ex., em 250 μL de meio de cultura, remover 25 μL e substituir esses 25 μL pela solução de resazurin
2. Medir a absorbância a 570 e 600 nm nos tempos: 0, 2, 4, 6, 24, 48 e 72 h
3. Para calcular o valor relativo ao controle de redução do resazurin nos grupos expostos, usa-se a fórmula: $(\text{Oxi}_2 \times T_1) - (\text{Oxi}_1 \times T_2) / (\text{Oxi}_2 \times \text{pC}_1) - (\text{Oxi}_1 \times \text{pC}_2)$. Em que:

Oxi_1 = Coeficiente de extinção molar do resazurin oxidado a 570nm

Oxi_2 = Coeficiente de extinção molar do resazurin oxidado a 600nm

T_1 = Absorbância dos grupos expostos em 570nm

T_2 = Absorbância dos grupos expostos em 600nm

pC_1 = Absorbância do grupo controle a 570 nm

pC_2 = Absorbância do grupo controle a 600 nm

CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

MÉTODO DE BRADFORD

SOLUÇÕES E REAGENTES

- Reativo de Bradford
- Água ultrapura
- Albumina de soro bovina (padrão de 1 mg mL^{-1} preparados em PBS)

PROCEDIMENTOS

1. Testar o sobrenadante das amostras para verificar se necessitam ser diluídas
Para isso, pipetar 10 μL da amostra (selecionar por amostragem 2-3 amostras), 10 μL do tampão empregado na homogeneização e 10 μL de solução de BSA a 1 mg mL^{-1} em poços diferentes de uma microplaca de 96 poços. Acrescentar a cada um dos poços 250 μL do reativo de Bradford e comparar as cores. Caso a cor da amostra esteja mais intensa que a do padrão de BSA diluir a amostra; a cor da amostra deverá ficar visualmente menos intensa que a do padrão de BSA, mas mais intensa que a do tampão.
2. Pipetar 10 μL das amostras em triplicata
3. Pipetar 10 μL do branco em triplicata (solução de homogeneização das amostras)
4. Pipetar 10 μL da curva-padrão em triplicata (0; 0,125; 0,250; 0,500; 1,0 mg de BSA por mL, preparado em PBS)
5. Pipetar em TODOS os poços utilizados 250 μL do reativo de Bradford
6. Aguardar 5 min (manter a microplaca protegida da luz - estável até no máximo 1 h)
7. Medir a absorbância a 595 nm em espectrofotômetro de microplacas
8. Verificar TODOS os valores de absorbância para averiguar se alguma das amostras precisa ser diluída novamente (caso seu valor de ABS esteja acima do valor do ponto correspondente a 1,0 mg mL^{-1}), ou se a curva-padrão precisa ser refeita (caso o $R^2 < 0,95$)
9. Para o cálculo da concentração de proteínas:
 - Calcular a equação da reta a partir dos valores de ABS
 - Com esses dados construir uma curva de 1 $^{\circ}$ grau (indicar para reta passar pela coordenada (0,0), ou seja, $b = 0$; solicitar o valor de R^2 e a equação da reta)

- Calcular as médias e subtrair o valor da média do branco
- Com a equação da reta ($y = a x + b$), calcular a concentração de proteínas através da fórmula $[\text{proteínas}] = [(\text{Média ABS} - \text{branco}) \times \text{diluição}] / a$

μDROP PLATE

SOLUÇÕES E REAGENTES

- Tampão no qual está a amostra

PROCEDIMENTOS

1. Limpar bem as partes externas e internas da μPlate
2. Abrir a μPlate e inserir 2 μL de tampão (o qual estiver a amostra a ser dosada) em cada poço a ser utilizado – capacidade de 16 poços
3. Fechar a μPlate e medir a absorbância em 280 nm
4. Remover o tampão e inserir 2 μL de amostra por poço
5. Fechar a μPlate e medir novamente a absorbância em 280 nm
6. Para o cálculo da concentração de proteínas:
 - Usar a equação de Lambert-Beer: Concentração de proteínas = (Absorbância corrigida em 280 nm)*((1 mg mL⁻¹)/caminho óptico – 0,05 cm)

DETECÇÃO DA METALOTIONEÍNA

CONTEÚDO DE METALOTIONEÍNA – MÉTODO INDIRETO

SOLUÇÕES E REAGENTES

- *Solução de homogeneização*

1. Tampão Tris-HCl a 20 mM, pH 8,6 (500 mL): dissolver 1,212 g de Tris-base (PM: 121,14) em 400 mL de água ultrapura, acertar o pH (8,6) com HCl e completar para 500 mL. Armazenar na geladeira.
2. Tampão Tris-HCl a 20 mM, pH 8,6 com 500 mM de sacarose (200 mL): acrescentar 34,23 g de sacarose (PM = 342,3) e completar para 200 mL com Tampão Tris-HCl a 20 mM, pH 8,6
3. No momento do uso adicionar para cada 10 mL do tampão tris-sacarose: 50 μL de PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonil¹⁰ a 0,1 M; [PMSF] final = 0,5 mM) e 1 μL de β-mercaptoetanol a 100% ([β-mercaptoetanol]¹¹ final = 0,01%). Este tampão será empregado para homogeneizar as amostras.

- *Solução 01 (20 mL)*

1. Aferir 18,6 mL de etanol absoluto e colocar em um frasco
2. Adicionar 1,4 mL de clorofórmio

- *Solução 02 (80 mL)¹²*

1. Aferir 78,26 mL de etanol absoluto e colocar em um frasco
2. Adicionar 1,74 mL de HCl concentrado (~37%)

¹⁰ Fluoreto de fenilmetilsulfonil = agente antiproteolítico.

¹¹ β-mercaptoetanol = agente redutor que evita a formação de produtos de alta massa molecular devido à oxidação da metalotioneína e a formação de pontes dissulfeto intermoleculares.

¹² Fracionamento alcoólico onde a acidificação tem papel importante, provavelmente desestabilizando os clusters de metal da metalotioneína.

- *Solução 3 (55 mL)*¹³
 1. Aferir 47,85 mL de etanol absoluto e colocar em um frasco
 2. Adicionar 0,55 mL de clorofórmio e 6,6 mL de tampão Tris-HCl a 20 mM
- *Solução de NaCl a 250 mM (50 mL)*
 1. Dissolver 0,73 g de NaCl (MM= 58,5 g mol⁻¹) e água ultrapura e completar para o volume final de 50 mL
- *Solução de EDTA-sódico (50 mL)*¹⁴
 1. Dissolver 0,0745 g de EDTA-dissódico (MM 372,24 g mol⁻¹) em 45,06 mL de água desionizada e acrescentar 4,94 mL de HCl concentrado (37%)¹⁵
- *Solução de Ellman (70 mL)*
 1. Preparar no momento do uso
 2. Tampão fosfato de sódio 0,2 M saturado de NaCl (2 M), pH 8,0 (200 mL)¹⁶: dissolver 23,38 g de NaCl (PM: 58,5) em Tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 8,0, no volume final de 200 mL.
 3. Armazenar na geladeira.
 4. Solução de Ellman: dissolver 0,0119 g de DTNB (5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid, MM=396,3 g mol⁻¹) em 500 µL de metanol PA e acrescentar 69,5 mL de Tampão fosfato-NaCl.
- *Solução de EDTA-NaCl (50 mL)*
 1. Para a curva-padrão de GSH
 2. Dissolver 0,037 g de EDTA dissódico e 0,3652 g de NaCl em 40 mL de água desionizada. Acrescentar 2,45 mL de HCl concentrado (~37%) e completar com água para 50 mL.
 3. Soluções de GSH: dissolver 0,0020 g de GSH (PM: 307,32) em 2 mL de solução EDTA-NaCl ([GSH]:1000 µg mL⁻¹). Pode ser mantida em geladeira por até 2 semanas. Diluir a solução de GSH em 6 tubos distintos (concentrações de 0, 25, 50, 100, 200, 400 µg mL⁻¹) em solução EDTA-NaCl. Adicionar 100 µL de cada solução de GSH com concentração conhecida a novos tubos que serão empregados na curva-padrão de GSH.

PROCEDIMENTO

1. Lisar as células (0,1 g em 0,5 mL de tampão de lise)
2. Centrifugar a 15.000 g por 30 min, 0-4 °C
3. Transferir para novo tubo 300 µL do sobrenadante (OBS: guardar 20-40 µL do sobrenadante para quantificação de proteínas)
4. Adicionar ao tubo 342 µL da solução 01 refrigerada a -20 °C
5. Centrifugar a 6000 g por 10 min a 0-4 °C
6. Transferir para novo tubo (tubo de 2 mL) 490 µL do sobrenadante e adicionar ao tubo 1502 µL da solução 02 refrigerada a -20 °C e agitar

¹³ Permite eliminar possíveis contaminantes (tióis de baixa massa molecular como GSH e cisteína e agentes redutores como o β-mercaptoetanol).

¹⁴ EDTA a 4 mM, HCl a 1 M.

¹⁵ Acidificação e presença de quelante de metais divalentes (EDTA) permitem a remoção de cátions metálicos ainda ligados a metalotioneína, liberando os grupos SH para reagir com o DTNB.

¹⁶ Solução de grande força iônica (NaCl a 2 M) permite a completa desnaturação da metalotioneína (ajuda a expor os grupos SH da proteína).

7. Manter as amostras a -20 °C por 1 h
8. Centrifugar a 6000 g por 10 min a 0-4 °C
9. Descartar sobrenadante (metalotioneína encontra-se no precipitado)
10. Ressuspender o precipitado com 1 mL da solução 3 e agitar
11. Centrifugar a 6000 g por 10 min a 0-4 °C
12. Descartar sobrenadante
13. Ressuspender o precipitado 50 µL de solução de NaCl
14. Adicionar 50 µL de solução de EDTA-sódico e agitar
15. Adicionar 1 mL de solução de Ellman a cada tubo com amostras e também aos tubos da curva-padrão de GSH contendo 100 µL de GSH (caso seja necessário, para evitar extrapolação da curva-padrão, adicionar volume superior de solução de Ellman e realizar as devidas correções no momento do cálculo) e agitar
16. Centrifugar a 3000 g por 5 min
17. Adicionar a 200 µL do sobrenadante a microplacas, inclusive da curva-padrão de GSH. Para o branco substituir as amostras por 50 µL de solução de NaCl (250 mM) + 50 µL de solução de EDTA-sódico (EDTA a 4 mM + HCl a 1 M)
18. Medir absorbância a 412 nm
19. Para o cálculo do conteúdo de metalotioneína:
 - Com esses dados construir uma curva de 1º grau (indicar para reta passar pela coordenada (0,0), ou seja, $b = 0$; solicitar o valor de R^2 e a equação da reta)
 - Calcular as médias das ABS das amostras e subtrair o valor da média do branco
 - Com a equação da reta ($y = a x + b$), calcular o conteúdo de SH através da fórmula [proteínas] = [(Média ABS – branco) x diluição] / (a x concentração de proteínas) ou [(Média ABS – branco) x 4,801] / (a x concentração de proteínas). Considerando que a metalotioneína possui entre 20-30% de cisteínas, pode-se estimar o conteúdo de metalotioneína (assumindo o valor de 30% de cisteínas): Conteúdo de MT = 0,3 x conteúdo de SH.

RT-qPCR

SOLUÇÕES E REAGENTES

- Solução de primers
- RNA later™
- Mini kit PURLINK™
- Trizol™
- TURBO DNA-free™
- Quantifluor® RNA system
- SYBR™ Gold
- Loading dye 6X
- Agarose
- EDTA 0,5 M pH 8,0
- Tampão TBE 5X e 1X
- Superscript™ IV
- PowerUp SYBR™ Green Master Mix

PREPARO DAS SOLUÇÕES E REAGENTES

- *Solução de primers*
1. Assim que os primers chegarem, centrifugar os microtubos com os primers ainda liofilizados

2. Diluir para solução estoque de 100 uM em tampão TE ou como recomendado pelo fabricante
3. Para solução de trabalho de 10 uM, diluir em água ultrapura estéril (1:10 a partir da solução de estoque)
 - *Loading dye 6X*
 1. Diluir de azul de bromofenol para 0,25%, xileno cianol para 0,25% e glicerol para 30% em água tratada com DPEC
 2. Armazenar em temperatura ambiente
 - *EDTA 0,5 M pH 8,0*
 1. Pesar 14,6 g de EDTA e diluir em água ultrapura
 2. Aferir e ajustar o pH e o volume para 100 mL
 - *Tampão TBE 5X*
 1. Pesar 54 g de Tris base, 27,5 g de ácido bórico e dissolver em água ultrapura estéril junto com 20 mL de EDTA 0,5 M (pH = 8,0)
 2. Completar o volume para 1 L e armazenar à temperatura ambiente
 - *Tampão TBE 1X*
 1. Diluir da solução estoque 5X em água ultrapura estéril
 2. Armazenar em temperatura ambiente

PROCEDIMENTOS

- *Extração do RNA*
 1. Usar o mini kit PURLINK™
 2. Adicionar 60 mL de etanol PA ao frasco Wash Buffer II e marcar X no local indicado.
 3. Adicionar volume correspondente a 1% de 2-mercaptoetanol a solução de lise, caso pretenda utilizar esse reagente, pois para o protocolo usando Trizol™ essa solução não é necessária
 4. Centrifugar com baixa rotação as amostras de células armazenadas em RNA later™ e remover o sobrenadante contendo esse reagente
 5. Adicionar 1 mL de Trizol™ para 5-10x10⁶ células e lisar através de pipetagem up and down
 6. Manter em temperatura ambiente por 5 min para permitir completa dissociação de complexos de nucleoproteínas
 7. Adicionar 0.2 mL de clorofórmio ou 50 µL de 4-bromoanisol para cada mL de Trizol e agitar vigorosamente de forma manual por 15 seg
 8. Incubar a temperatura ambiente por 2-3 min
 9. Centrifugar a 12000 g por 15 min a 4 °C¹⁷
 10. Transferir o volume corresponde a fase superior contendo o RNA para um novo tubo *RNase-free* com cuidado para que as fases não se misturem
 11. Adicionar igual volume de etanol 70% para obter uma concentração final de 35% e misturar com vórtex
 12. Inverter o tubo para dissolver qualquer precipitado visível
 13. Transferir 500 µL de amostra para um *Spin Cartridge* com seu respectivo tubo coletor

¹⁷ Após a centrifugação, a mistura se separa em três fases, uma inferior de coloração rosada contendo proteínas, lipídios e fenol-clorofórmio, uma interfase contendo DNA e uma fase aquosa superior translúcida que contém o RNA.

14. Centrifugar a 12000 g por 15 seg a temperatura ambiente
15. Destacar o *Spin Cartridge* do tubo coletor e descartar o líquido filtrado
16. Colocar o *Spin Cartridge* sobre o tubo coletor e adicione mais 500 µL do sobrenadante adquirido na etapa 8 do procedimento anterior e centrifugue novamente à velocidade 12000 g por 15 seg a temperatura ambiente
17. Repetir o procedimento acima até que toda a amostra seja processada
18. Adicionar 700 µL do *Wash Buffer I* sobre o *Spin Cartridge*
19. Centrifugar a 12000 g por 15 seg a temperatura ambiente
20. Descartar o líquido filtrado e o tubo de coleta
21. Colocar o *Spin Cartridge* em um novo tubo de coleta
22. Adicionar 500 µL do *Wash Buffer II* com etanol ao *Spin Cartridge*
23. Centrifugar a 12000 g por 15 seg a temperatura ambiente
24. Descartar o líquido filtrado e recolocar o *Spin Cartridge* no mesmo tubo de coleta
25. Repetir as etapas 5-6
26. Centrifugar a 12000 g por 1 min a temperatura ambiente para secar a membrana
27. Descarte o tubo de coleta e colocar o *Spin Cartridge* em um tubo de recuperação
28. Adicionar 30-100 µL de *RNase-free Water* ao centro do *Spin Cartridge*¹⁸
29. Incubar a temperatura ambiente por 1 min
30. Centrifugar o *Spin Cartridge* com o tubo de recuperação por 2 min a >12000 g a temperatura ambiente
31. Armazene o RNA purificado¹⁹

- *Remoção de gDNA*

1. Adicionar 0,1 volume de tampão 10X, p. ex, se o RNA foi solubilizado em 50 µL, adicionar 5 µL do tampão) e 1 µL de TURBO DNase™ (2 U) para até 10 µg de RNA em 50 µL²⁰ e misturar suavemente
2. Incubar a 37 ° C por 20-30 min
3. Misturar e adicionar o Reagente de Inativação da DNase (2 µL ou 0,1 volume, o que for maior)
4. Manter a amostra por 5 min em temperatura ambiente
5. Agitar o tubo 2-3x durante o período de incubação para dispersar o reagente de inativação DNase
6. Se a temperatura ambiente for abaixo de 22-26 °C, mover os tubos para uma placa aquecedora para controlar a temperatura, pois ambientes frios podem inibir a inativação da enzima
7. Centrifugue as amostras a 10.000 g por 1,5 min e transferir cuidadosamente o sobrenadante contendo o RNA para um tubo novo, não desmanchando o pellet de reagente de inativação de DNase

- *Quantificação do RNA extraído*

1. Preparar o tampão TE 1X, diluindo o 20X com água livre de nuclease tratada com DEPC (não fornecida)

¹⁸Volume de eluições recomendados conforme o rendimento de RNA: <100 µg (30-100 µL); 100-500 µg (2x100 µL); 500-100 µg (3 x100 µL)

¹⁹Para uso dentro de poucas horas, armazene seu RNA purificado em gelo e proceda para as etapas de análise de rendimento e qualidade e tratamento com DNase. O RNA extraído pode ser armazenado a -20 °C por até 48h para que nesse período seja realizada a análise de integridade por eletroforese em gel de agarose e a conversão para cDNA. Para armazenamento a longo prazo alocar em -80 °C.

²⁰Essas condições de reação removerão até 2 µg de DNA genômico do RNA total em um volume de reação de 50 µL

2. Preparar uma solução de trabalho com RNA dye suficiente para quantificar o branco, a curva padrão e as amostras desconhecidas
3. Proteger a solução de trabalho da luz, cobrindo com papel alumínio ou colocando no escuro.
4. Diluir o RNA dye 1:2000 em tampão TE 1X
5. Preparar a curva padrão de RNA (10, 5, 2,5, 1,25, 0,625, 0,3125, 0,15625 ng de RNA por poço)
6. Adicionar 10 μL dos padrões de RNA, o branco (1X tampão TE) e das amostras previamente diluídas em poços de placa preta de 96 poços em triplicata
7. Misturar usando um agitador de placa
8. Manter por 5 min em temperatura ambiente, protegido da luz
9. Medir a fluorescência ($\lambda_{\text{ex}} = 492\text{nm}$; $\lambda_{\text{em}} 540\text{nm}$)
10. Calcular a concentração de RNA da seguinte forma: subtrair a fluorescência dos poços relativos ao branco de todas as amostras - curva-padrão e desconhecidas. Usar os dados dos padrões de RNA para gerar uma curva-padrão de fluorescência *versus* concentração de RNA. Determinar a concentração de RNA da amostra a partir da curva padrão e multiplique o número resultante pelo fator de diluição

- *Controle de qualidade do RNA extraído 1: avaliação da pureza*

1. Usar a $\mu\text{Drop plate}$
2. Limpar bem as partes externas e internas com papel absorvente e etanol 70% e em seguida com papel absorvente e água ultrapura
3. Leitura do branco: Adicionar em duplicata 2 μL de água ou tampão (no qual se encontra a amostra) por poço
4. Leitura das amostras: Adicionar em duplicata 2 μL da amostra de RNA
5. Ler a absorbância nos comprimentos de onda de 230, 260 e 280 nm
6. Para checar contaminação com proteínas calcular a razão Abs260/Abs280: a razão 260/280 deve estar entre 1,9 e 2,1. Valores fora desse range são indicativos de contaminação por proteínas
7. Para checar contaminação com fenol calcular a razão Abs260/Abs230: a razão 230/260 deve estar entre 1.5 e 2.2. A obtenção de valores distintos indica contaminação da amostra por reagentes utilizados na etapa de extração, especialmente fenol

- *Controle de qualidade do RNA extraído 2: avaliação da integridade*

1. Incorporar o SYBRTM Gold ao gel, diluindo 20000X
2. Escolher o tamanho do gel dependendo do número de amostra. Há três diferentes tamanhos de gel no *SafeBlue eletroforesis system*: 150x70mm (52,5 mL), 150x100mm (75 mL) e 150x150mm (112,5 mL)
3. Preparar a cuba para receber o gel
4. Despejar a solução de gel no suporte sem fazer bolhas.
5. Colocar o pente no suporte
6. Esperar a solução solidificar
7. Colocar o suporte com o gel na cuba de eletroforese
8. Adicionar tampão TBE 1X até cobrir a superfície do gel
9. Misturar as amostras de RNA com o *loading buffer*: 0,5 μg de RNA e 2 μL de *loading dye* para 10 μL de água tratada com DPEC
10. Adicionar as misturas aos poços e aplicar uma tensão de 1-5 V cm^{-1}
11. Cubrir o sistema, iniciar a corrida e acompanhar ligando a luz LED azul

12. É aconselhável, mas não essencial, usar o *ladder* (marcador de peso molecular) para RNA (promega, ref. 466100)
13. Considerar as amostras de RNA íntegras se as bandas 28S, 18S e 5S, referentes aos RNAs, não apresentarem arraste, o que indica degradação. A banda 5S nem sempre irá aparecer

- *Conversão do RNA extraído para cDNA*

1. Usar o Superscript™ IV
2. Normalizar as amostras com a mesma quantidade de RNA (entre 10 pg-5µg RNA total), usando a maior concentração possível
3. Para otimização do processo e redução de erros de pipetagem, ao trabalhar com múltiplas amostras, preparar um mix contendo os componentes comuns a todas as reações e distribuir o volume apropriado para cada tubo de reação com o RNA *template*
4. Para o anelamento dos primers ao RNA *template* (etapa 1) considerar os volumes de todas as soluções listadas nas etapas 1 e 2 para a determinação do volume de água que será necessário adicionar para atingir o volume final recomendado para cada reação (20 µL)
5. Combine as seguintes soluções em um tubo de reação de PCR:

Solução	Volume (1 reação)
Oligo d(T) primer	1µL
Random primer	1µL
dNTP mix	1µL
RNA template	10 pg-5µg RNA total
RNase-free water	completar volume
Volume total reação - (etapa 1 e 2)	20 µL

6. Misturar e centrifugar
7. Adicionar os tubos de reação no termociclador e procurar pela programação Anelamento, clicar em “View” para verificar se os parâmetros estão corretos (5 min a 65 °C) e então em ok
8. Manter em gelo por pelo menos 1 min
9. Para a transcrição reversa do RNA *template* (etapa 2) combinar as seguintes soluções em um tubo de reação de PCR:

Solução	Volume (1 reação)
5x SSIV Buffer	4 µL
100 nM DTT	1 µL
Ribonuclease inibidor	1 µL
*Transcriptase reversa -RT (200 U por µL)	1 µL

10. Misturar e centrifugar
11. Distribuir o volume adequado de mix-RT para cada reação sobre o RNA que foi anelado na etapa 1
12. Retornar os tubos para incubação no termociclador (programação: Transcrição reversa)
13. Clicar em “View” para verificar se os parâmetros estão corretos (23 °C por 10 min + 50-55 °C por 10 min + a 80 °C por 10 min)
14. Faça o tratamento com RNase H (opcional) (programação: RNase H) adicionando 1 µL da enzima, e incubando a 37 °C por 20 min

15. Armazene o cDNA a -20 °C

- *Encontrando as condições ideais e amplificação dos alvos*
 1. Testar diferentes concentrações de primers (300, 500 e 700 nM) para definir qual é a melhor: aquela com menor C_q (gere fluorescência mais rapidamente) e maior ΔR_n (variação de fluorescência do repórter em relação ao baseline) e que não apresenta dímeros
 2. Preparar reações em triplicata com 10 μ L de volume final por reação
 3. Adicionar uma margem de 10% quando preparar as reações com o *template* de cDNA, *primers* e PowerUp SYBR™ Green Master Mix para que não falte quando for adicionar nos poços da placa
 4. Iniciar com 10 ng de cDNA, tendo como estimativa a quantidade de RNA usado como *template* na etapa anterior
 5. Para cada alvo analisado destinar um poço da placa para o *no template control* (NTC), que ajuda a identificar contaminação por produtos de PCR. A reação NTC deve conter todos os componentes da reação (Master Mix, *primers*, água), exceto a amostra e, portanto, não devem apresentar um valor de C_q
 6. Configurar o layout de placa
 7. Descongelar a amostra de cDNA que será usada para os testes iniciais e *primers* em gelo, misturar com vortex e centrifugar
 8. Preparar as reações, considerando que metade da reação deve ter a solução do master mix (5 μ L) e adicionar 10 μ L da reação por poço conforme layout
 9. Selar a placa com um adesivo óptico e centrifugar. A PCR pode ser realizada em até 24 h após a montagem da placa de reação, quando armazenada em temperatura ambiente e protegida de luz
 10. Criar o *template* da placa antecipadamente no programa
 11. Proceder com a amplificação no StepOnePlus™ Real-Time PCR System
 12. Selecionar as especificações do experimento (96 wells, melt curve, SYBR™ Green reagentes etc.)
 13. Iniciar a corrida e após o término fazer o download dos dados do equipamento para o computador acoplado, salvando na pasta do usuário
 14. Avaliar quais as condições são melhores para proceder com o experimento
 15. Depois de feitas as padronizações de concentração de primer e eficiência da reação, prosseguir com a extração de RNA, controle de qualidade, conversão para cDNA e amplificação dos alvos nas amostras
- *Análise dos dados*²¹
 1. Usar o servidor Web-based LinRegPCR para as análises
 2. Exportar os dados de sua corrida no Software StepOnePlus™ Real-Time PCR System para o formato RDML
 3. Acessar <https://www.gear-genomics.com/rdml-tools/index.html>
 4. Clicar em RDML-LinRegPCR e fazer o upload do arquivo RDM
 5. Clicar em RunView e alterar a opção Data Source para Amplification – Raw Data

²¹ O Método $2^{-\Delta\Delta C_q}$ compreende a forma mais comum de avaliação da expressão gênica. Porém, o seu emprego parte da premissa de que a eficiência do gene alvo seja igual à do gene de referência e que ambas sejam o mais próximo possível de 100%. Desse modo a avaliação da eficiência de amplificação dos alvos por meio da diluição seriada é uma etapa exigida para a validação do emprego do Método $2^{-\Delta\Delta C_q}$. Uma alternativa interessante, caso os seus alvos não apresentem a mesma eficiência de amplificação ou você não tenha verificado esse parâmetro por meio de diluição seriada, é realizar a análise dos dados por meio do servidor LinRegPCR.

6. Na aba LinRegPCR e em Tab Formate, clique em LinRegPCR Classic e em Exclude from mean efficiency calculation - Samples without plateau phase, opte por no/yes,
7. Clicar em Run LinRegPCR
8. Clicar em Copy Tab to Clipboard e colar os resultados numa tabela do excel para calcular posteriormente o valor de N0 relativo a cada alvo, conforme descrito abaixo
9. Caso observar que seus dados estão duplicados quando carrega a planilha, resolver o problema em RDML-Edit. Para isso fazer o upload do arquivo RDML e clicar em Enable Edit Mode, em Recreate lost Ids e em Repair RDML File. Na sequência salvar o nome arquivo RDML gerado e empregar para a realização da análise pelo RDML LinRegPCR, conforme descrito anteriormente
10. O LinRegPCR possibilita o cálculo da quantidade inicial (N0) de cada alvo por reação, através da equação: $N0 = \text{Threshold} / \text{mean efficiency} ^ Cq$. Em que o threshold corresponde ao limiar de quantificação por corrida, a eficiência média leva em consideração a eficiência da PCR por ensaio e ambos estão diretamente associados ao valor de Cq. Desse modo, N0 representa o nível de expressão do gene alvo em cada reação e consiste no valor que deve ser empregado para a normalização da expressão do gene de interesse pelo de referência (ratio = $N0_{\text{target}} / N0_{\text{reference gene}}$), bem como, para calcular a diferença na expressão dos genes de interesse entre as condições experimentais com relação aos seus respectivos controles (fold = $\text{ratio}_{\text{experiment}} / \text{ratio}_{\text{control}}$)

WESTERN BLOT

SOLUÇÕES E REAGENTES

- Tampão de Amostra 4X
- Marcador de Peso Molecular Pré-Corado
- Gel de Poliacrilamida 15% de 0,75 mm²²
- Tampão de Corrida 1X
- Metanol 100% (Para ativar a membrana de PVDF)
- Tampão de Transferência 1X gelado
- Papel Filtro (4 por membrana) de dimensões aproximada de 8,5x5,5 cm
- Membrana de Nitrocelulose ou PVDF de dimensões 8,5x5,5 cm
- Ponceau 0,1%
- TBS-T: TBS (Tris-Buffered Saline) 1X com 0,1% de Tween-20
- Solução de Bloqueio: TBS-T acrescido de 5% (p/v) de leite em pó desnatado
- Anticorpos do tipo IgG contra MT (Primário)
- Anticorpo contra IgG conjugado com Fosfatase Alcalina²³ (Secundário)
- Tampão para o substrato da Fosfatase Alcalina
- Substrato para Fosfatase Alcalina: NBT/BCIP
- Solução para interrupção da reação: 10 mM de EDTA em água Deionizada

PREPARO DAS SOLUÇÕES E REAGENTES

²² A concentração da poliacrilamida a ser utilizada está diretamente relacionada ao peso molecular da proteína a ser analisada. Visto que quanto maior a concentração de poliacrilamida, menor será a malha do gel e conseqüentemente, maior a dificuldade para migração das proteínas de alto peso molecular. Já a espessura do gel irá depender da quantidade de amostra a ser aplicada no SDS-PAGE. À saber: Gel 0,75 mm = ~1-10 µL; Gel 1 mm = ~10-20 µL e Gel 1,5 mm = ~20-30 µL.

²³ Usar obrigatoriamente o anticorpo contra a IgG do organismo no qual foi produzido o anticorpo primário

- *TBS (Tris-Buffered Saline) 10X – 1L*²⁴
 1. Em 800 mL de água ultrapura sob agitação lenta, adicionar: 24 g de Tris base (PM: 121,14), 88 g de NaCl (PM: 58,44). Manter sob agitação até a completa dissolução dos sais.
 2. Ajustar o pH para 7,5 com HCl e completar para 1 L com água ultrapura
 3. Filtrar em membrana de 0,45 µm
 4. Armazenar em frasco ambar estéril à ~25°C

- *Tampão de Amostra 4X – 10 mL*²⁵
 1. Adicionar 5 mL de Glicerol 80% e acrescentar 2 mL de Tris-HCl 1M pH 6,5, 3 mL de DTT 1M e 160 µL de EDTA 0,5M
 2. Agitar o tubo por inversão para homogeneizar o Glicerol
 3. Acrescentar 0,8 g de SDS e 0,041 g de Azul de Bromofenol (PM: 691,94) e agitar novamente o tubo até a completa homogeneização dos reagentes
 4. Distribuir em alíquotas de 0,5 mL e armazenar em -20°C

- *Acrilamida/Bisacrilamida 33/0,9% - 500 mL*
 1. Pesar 165 g de Acrilamida ultrapura e 4,5 g de Bisacrilamida ultrapura
 2. Adicionar aproximadamente 400 mL de água ultrapura e manter sob agitação lenta em ausência de luz por 40 min
 3. Ajustar o volume para 500 mL com água ultrapura, na proveta
 4. Filtrar em membrana de 0,45 µm
 5. Armazenar em frasco de vidro autoclavado em ausência de luz à 4°C

- *APS (Persulfato de Amonio) 10% - 10 mL*
 1. Pesar 1 g de APS (PM: 228,20) e dissolver em 10 mL de água ultrapura autoclavada
 2. Agitar o tubo por inversão até a completa dissolução dos cristais
 3. Distribuir em alíquotas de 0,5 mL e armazenar em -20°C

- *Tampão de Corrida 5X – 2 L*²⁶
 1. Pesar 30,28 g de Tris-Base (PM: 121,14), 144,1 g de Glicina (PM: 75,07) e dissolver em aproximadamente 1,7 L de água ultrapura
 2. Manter sob agitação lenta até a completa dissolução dos sais
 3. Ajustar o volume para 1,9 L com água ultrapura e filtrar em membrana de 0,45 µm
 4. Acrescentar 100 mL de SDS 10% previamente filtrado
 5. Armazenar em frasco de vidro autoclavado ambar à ~25°C

- *Azul de Coomassie R-250 – 500 mL*²⁷

²⁴ A concentração final da solução de trabalho (1X) é de 20 mM de Tris, 150 mM de NaCl e pH em torno de 7,5.

²⁵ O tampão 4X é composto por 200 mM de Tris-HCl pH 6,5 (pode ser usado o pH de até 6,8), 40% de Glicerol, 300mM de DTT, 8mM de EDTA, 8% (p/v) de SDS e 6mM de Azul de Bromofenol. Homogeneizar muito bem a solução, pois o corante é de difícil dissolução no Glicerol. O tampão de amostra deve ser diluído para 1X na amostra a ser analisada. Caso seja necessário, completar o volume final de aplicação desejado com água ultrapura.

²⁶ A concentração final da solução de trabalho (1X) é de 25 mM de Tris, 192 mM de Glicina e 0,1% de SDS, e o pH sem ajuste é de aproximadamente 8.3. Para o preparo de 1 L da solução de trabalho, deve ser usado 200 mL da solução 5X e 800 mL de água Deionizada. A solução poderá ser reutilizada mais 2X.

²⁷ A concentração da solução de coloração é de 0,1% (p/v) de Azul de Coomassie R-250, 45% de metanol, 45% de água ultrapura e 10% de ácido acético. A solução poderá ser reutilizada várias vezes. Em temperatura ambiente, o tempo de coloração do gel é por volta de 30-60 min sob agitação lenta e

1. Pesar 0,5 g de Azul de Coomassie R-250 e diluir em 45 mL de metanol 100%
2. Agitar o tubo por inversão até a completa dissolução do corante
3. Adicionar 225 mL de água ultrapura num béquer de vidro e sob agitação lenta e constante adicionar: 50 mL de ácido acético glacial, 180 mL de metanol 100% seguido do corante dissolvido
4. Manter sob agitação lenta até a completa homogeneização e filtrar a solução com papel 3mm
5. Armazenar em frasco de vidro ambar à ~25°C

- *Solução de Descoloração Lenta – 1L*²⁸

1. Aferir 885 mL de água ultrapura, adicionar ácido acético até obter 960 mL (75 mL) e completar para 1L com metanol (40 mL)
2. Homogeneizar com bastão de vidro e armazenar à ~25°C

- *Tampão de Transferência 10X – 1 L*²⁹

1. Pesar 30 g de Tris-Base (PM: 121,14) e diluir em aproximadamente 800 mL de água ultrapura
2. Adicionar 144 g de Glicina (PM: 75,07) e manter sob agitação lenta até a completa dissolução dos sais
3. Completar para 1 L com água ultrapura e filtrar em membrana de 0,45 µm
4. Armazenar em frasco ambar autoclavado

- *Ponceau 0,1% - 500 mL*

1. Aferir 475 mL de água ultrapura e sob agitação lenta, adicionar 25 mL de ácido acético e 500 mg de Ponceau S (PM: 760,57)
2. Manter sob agitação lenta até a completa dissolução do corante
3. Filtrar a solução com papel 3mm no funil de porcelana
4. Armazenar em ausência de luz à ~25°C. A solução pode ser reutilizada várias vezes

- *Tampão para o Substrato da Fosfatase Alcalina – 500 mL*³⁰

1. Pesar 6,05 g de Tris-Base (PM: 121,14) e dissolver em aproximadamente 400 mL de água ultrapura
2. Adicionar 10 mL de NaCl 5M e 0,5 mL de MgCl₂ 5M
3. Manter sob agitação lenta até a completa dissolução dos sais
4. Ajustar o pH para 9,5 (com HCl ou NaOH diluído), completar para 500 mL com água ultrapura e filtrar em membrana de 0,45 µm
5. Armazenar em frasco estéril à 4°C

constante. Caso a coloração fique tênue após o período máximo (60 min), a solução deverá ser descartada e substituída por uma nova.

²⁸ A solução de descoloração lenta é composta por 4% de metanol e 7,5% de ácido acético diluídos em água deionizada. A solução poderá ser reutilizada mais 2X após ser filtrada em carvão ativado. Para completa descoloração do gel, em temperatura ambiente, a solução deverá ser trocada 3X, sendo a primeira entre 30-60 min, a segunda deverá permanecer por 16 h e a terceira cerca de 60 min, todas devem ser mantidas sob agitação lenta e constante.

²⁹ A concentração final da solução de trabalho (1X) é de 25 mM de Tris, 192 mM de Glicina e 20% de Metanol. Para o preparo de 1 L da solução de trabalho, deve ser usado 100 mL da solução 10X, 700 mL de água ultrapura e 200 mL de Metanol 100%. Atenção: a solução de trabalho deve ser preparada necessariamente nesta ordem.

³⁰ Este tampão é composto por 100 mM de Tris, 100 mM de NaCl e 5 mM de MgCl₂, com pH de 9,5. Para cada membrana usar 10 mL do tampão em temperatura ambiente com 66 µL do substrato NBT e 33 µL do BCIP.

- *Tampão para Stripping de membrana – 500 mL*

1. Pesar 1,4 g de Glicina (PM: 75,07) e diluir em aproximadamente 400 mL de água ultrapura
2. Adicionar 50 mL de SDS 10%
3. Manter sob agitação lenta até a completa homogeneização
4. Ajustar o pH para 2,2 com HCl concentrado e completar para 500 mL com água ultrapura
5. Filtrar em membrana de 0,45 µm e armazenar em frasco estéril à ~25°C

PROCEDIMENTOS

- *Preparo da amostra*

1. Suspender o pellet de células em tampão de lise gelado³¹
2. Homogeneizar com auxílio de um vortex por 10 seg
3. Sonicar a amostra por 30 seg no gelo
4. Centrifugar o extrato proteico (12000 g, 20 min, 4 °C)
5. Transferir o sobrenadante para um novo microtubo pré-resfriado no gelo
6. Manter as amostras no gelo para análise imediata ou armazenar em -20 °C ou -80 °C para análises posteriores
7. Adicionar 2,5 µL de tampão de amostra 4X para cada 7,5 µL de amostra a ser preparada
8. Homogeneizar por pipetagem
9. Aquecer a 95°C por 5 min
10. Centrifugar rapidamente para recuperar o conteúdo da parede do microtubo

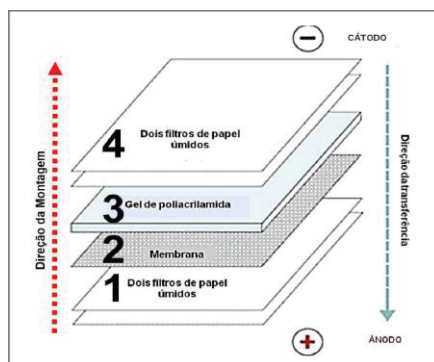
- *SDS-PAGE*

1. Aplicar 10 µL-20 µL da amostra previamente preparada por poço do gel 15% de 1 mm³
2. Aplicar 6µL do marcador pré-corado no primeiro ou no ultimo poço
3. Preencher a parte interna do tanque do eletrodo com tampão de corrida 1X novo e a externa com o tampão de corrida usado (até 2X)
4. Fechar a cuba e conectar adequadamente o cabo de alimentação na fonte
5. Ligar a fonte, programar para 20 mA (para cada gel) e iniciar a corrida
6. Aguardar até a completa evasão do corante da placa
7. Equilibrar o gel com ~20 mL do tampão de transferência gelado por 20 min

- *Transferência semi-seca*

1. Umedecer os papeis filtro no tampão de transferência
2. Ativar a membrana de PVDF em Metanol por 20 seg e deixar pelo mesmo período em água ultrapura - Atenção: NÃO ativar membranas de nitrocelulose
3. Equilibrar a membrana (PVDF ou Nitrocelulose) no tampão de transferência gelado
4. Montar o “sanduiche” no equipamento de transferência na ordem crescente abaixo:

³¹ 50mM de Tris-HCl pH8,0, 150 mM de NaCl, 1% de NP-40, 1mM de EDTA, 2 mM DTT e PMSF 1mM



5. Remover as bolhas pressionando levemente um bastão sobre o “sanduiche”
6. Fechar o equipamento e conectar o cabo de alimentação na fonte
7. Ligar a fonte e programar para 20 V
8. Transferir por 40 min
9. Corar as membranas com *Ponceau* por 5 min em temperatura ambiente sob agitação lenta e constante para verificar a eficácia da transferência
10. Descorar a membrana com 0,1M de NaOH por 1 min sob agitação constante
11. Lavar a membrana com 15 mL de TBS-T por 5 min em temperatura ambiente sob agitação lenta e constante

- *Detecção*

1. Bloquear os sítios inespecíficos com 20 mL por membrana da solução de bloqueio por 60 min em temperatura ambiente³² sob agitação lenta e constante
2. Lavar a membrana 3X com 15 mL de TBS-T por 5 min em temperatura ambiente sob agitação lenta e constante
3. Incubar a membrana com $1\mu\text{g mL}^{-1}$ do anticorpo primário diluído em 15 mL da solução de bloqueio por 90 min em temperatura ambiente sob agitação lenta e constante
4. Lavar a membrana 4X com 15 mL de TBS-T por 5 min em temperatura ambiente sob agitação lenta e constante
5. Incubar a membrana com $0,2\mu\text{g mL}^{-1}$ do anticorpo secundário diluído em 10 mL da solução de bloqueio por 60 min em temperatura ambiente sob agitação lenta e constante
6. Lavar a membrana 3X com 15 mL de TBS-T por 5 min em temperatura ambiente sob agitação lenta e constante

- *Revelação*

1. Adicionar 10 mL do tampão para o substrato da Fosfatase Alcalina num tubo envolvido em papel alumínio
2. Aguardar até que o tampão chegue em temperatura ambiente
3. Da mesma forma, deixar que o substrato NBT/BCIP chegue à temperatura ambiente
4. Adicionar 66 μL do NBT e agite o frasco por inversão
5. Acrescentar 33 μL do BCIP e agite novamente o frasco
6. Incubar a membrana na solução de revelação por até 2 min em ausência de luz à temperatura ambiente e agitação constante
7. Parar a reação com 10 mL da solução de interrupção
8. Digitalizar a imagem da membrana para análises posteriores

³² Caso seja necessário, este passo pode ser realizado por 16 h a 4°C

ELISA DE CAPTURA

SOLUÇÕES E REAGENTES

- Tampão de Sensibilização: Carbonato/Bicarbonato (50 mM pH 9,6)
- Tampão de Bloqueio: 2% de Albumina do Soro Bovino (BSA) em PBS-T 0,05%
- Tampão de lavagem: PBS 1x acrescido de 0,1 % de Tween-20 (PBS-T)
- Tampão de Diluição: PBS acrescido de Tween 0,05% (para anti-MTR-B)
- Tampão de Diluição: PBS (para SA-HRP)
- TMB: Substrato para a enzima Peroxidase
- Solução de interrupção: Ácido sulfúrico 2M

PREPARO DAS SOLUÇÕES E REAGENTES

PROCEDIMENTOS

- *Sensibilização (captura)*
 1. Diluir a amostra para as concentrações teste no tampão de sensibilização (Carbonato/Bicarbonato (50 mM pH 9,6) em triplicata – 400 μL , normalizar para 1 mg L^{-1})
 2. Adicionar 100 μL da solução em cada poço a ser utilizado
 3. Cobrir a placa com selo adesivo e incubar à 37 °C por 40 min
 4. Descartar a solução por inversão; (não bater no papel pano)
 5. Lavar os poços 2X com 200 μL do tampão de lavagem (PBS-T 0.1%) por 2 min
 6. Bater no papel pano, apenas na final da lavagem
- *Bloqueio*
 1. Adicionar 200 μL do tampão de bloqueio (BSA 2% em PBS-T 0,05%) por poço
 2. Cobrir a placa com o selo adesivo e incubar em 37°C por 60 min
 3. Descartar a solução por inversão
 4. Lavar os poços 2X com 200 μL do tampão de lavagem (PBS-T 0.1%) por 2 min
 5. Bater no papel pano. Apenas na final da lavagem
- *Detecção primária*
 1. Diluir o anticorpo de detecção (anti-MTR-B, 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$) para a concentração no tampão de diluição (PBS-T 0,05%)
 2. Adicionar 100 μL da solução de anticorpo por poço
 3. Cobrir a placa com o selo adesivo e incubar em 37 °C por 90 min sob agitação
 4. Descartar a solução por inversão
 5. Lavar os poços 4X com 200 μL do tampão de lavagem (PBS-T 0.1%) por 1 min
 6. Bater no papel pano, apenas na final da lavagem
- *Detecção secundária*
 1. Diluir a SA-HRP para 1:6.000 no tampão de diluição (PBS)
 2. Adicionar 100 μL da solução por poço
 3. Cobrir a placa com o selo adesivo e incubar em 37°C por 45 min sob agitação
 4. Descartar a solução por inversão
 5. Lavar os poços 3X com 200 μL do tampão de lavagem (PBS-T 0.1%) por 1 min
 6. Lavar os poços 2X com 200 μL do tampão de lavagem (PBS) por 1 min
 7. Bater no papel pano, apenas na final da lavagem

- *Revelação*

1. O substrato TMB deve estar em temperatura ambiente para uso
2. Adicionar rapidamente 100 μL de TMB por poço
3. Incubar a placa em ausência de luz por 15-30 min em 37 °C
4. Parar a reação com 50 μL por poço da solução de interrupção
5. Incubar por 10 min em ausência de luz
6. Medir a absorbância em 450 nm por até 30 min após finalizar a reação

IMUNOCITOQUÍMICA

SOLUÇÕES E REAGENTES

- Solução de permeabilização: PBS + 0,2 % de triton X-100
- Solução de bloqueio: BSA 1%, 22,5 mg mL⁻¹ de glicina em PBS-T (PBS + 0,1% de tween 20)
- Anticorpos anti-MT e anti-MTF (Abcam, ref. AB183897)
- Anticorpo secundário anti-rabbit conjugada com Cy 3 (Jackson, ref. 305166047)
- Solução de diluição dos anticorpos: PBS-T com 1% de BSA
- Solução de lavagem: PBS

PROCEDIMENTOS

- *Permeabilização*

1. Incubar as células com solução de permeabilização por 10 min
2. Lavar as células com PBS 3X por 5 min

- *Bloqueio, detecção primária e secundária*

1. Incubar as células com solução de bloqueio por 30 min
2. Incubar as células com os anticorpos primários diluídos em solução de diluição (anti-MT 1:100, anti-MTF: 1:200) por 1 h a temperatura ambiente
3. Lavar as células com PBS 3X por 5 min
4. Incubar as células com anticorpo secundário diluído em solução de diluição (cy3, 1:200) por 1 h a temperatura ambiente
5. Lavar as células com PBS 3X por 5 min

- *Marcação de núcleo e citoesqueleto*

1. Incubar as células com DAPI (1:1000) por 1 min
2. Lavar as células com PBS 1X
3. Incubar as células com faloidina-FITC (1:400) por 20 min
4. Lavar as células com PBS 1X

- *Montagem da lâmina*

1. Remover as lamínulas redondas do poço e colocar sobre a lâmina com uma gota de *fluormount*
2. Selar a lamínula com esmalte transparente
3. Armazenar no escuro a 4 °C até a captura das imagens

DOCKING MOLECULAR

SERVIDORES E PROGRAMAS

- STRING

- PredZinc
- AlphaFold
- MIB2

PROCEDIMENTOS

1. Selecionar proteínas que formam redes de interação com a metalotioneína de *Danio rerio* usando a ferramenta
2. Identificar e selecionar as proteínas que possuem sítios de ligação ao zinco usando o servidor PredZinc
3. Obter o modelo 3D das proteínas selecionadas por meio do banco de dados AlphaFold
4. Analisar como os metais interagem com as proteínas por meio de docking molecular usando o servidor MIB2
5. Considerar o maior score de ligação entre o zinco e a proteína e comparar com os scores de ligação dos outros metais (Cd, Cu, Pb, Mn e Hg) para o mesmo sítio de ligação ou com pelo menos um resíduo semelhante

ANEXO 4 – PROTOCOLOS DETALHADOS-CAPÍTULO III

EXPOSIÇÃO DOS EMBRIÕES DE ZEBRAFISH AOS CONTAMINANTES AMBIENTAIS

TESTE DE TOXICIDADE

SOLUÇÕES E REAGENTES

- Água do sistema
- DMSO
- 100 mg L⁻¹ de cloreto de cádmio em água ultrapura- [1000X]
- 10 µg L⁻¹ de deltametrina em DMSO - [1000X]
- 1 g L⁻¹ de diclorvós em água ultrapura - [1000X]
- 4 g L⁻¹ de 3,4-dicloroanilina em DMSO - [1000X]

PREPARO DAS SOLUÇÕES E REAGENTES³³

- *Água do sistema*
 1. Filtrar a água fornecida ao sistema por osmose reversa (pH 7,8) e adicionar o sal Instant Ocean® para aumentar a condutividade para 500 µS cm⁻¹ 34
- *Cloreto de cádmio [1000X]*
 1. Diluir 10 mg em 1 mL de água reconstituída
 2. Fazer diluição seriada até [1000x]
- *Deltametrina [1000X]*
 1. Diluir 10 mg em 1 mL de DMSO [1000000000x]
 2. Fazer diluição seriada até [1000x]
- *Diclorvós [1000X]*
 1. Diluir 10 mg em 1 mL de água reconstituída [10000x]
 2. Fazer diluição seriada até [1000x]
- *3,4-dicloroanilina [1000X]*
 1. Diluir 10 mg em 2,5 mL de DMSO

PROCEDIMENTOS

- *Criação de zebrafish*
 1. Manter os zebrafish adultos tipo selvagem (AB) em um sistema de circulação automática a 26 °C e ciclo de 14 h/10 h claro/escuro

³³Volatilidade:

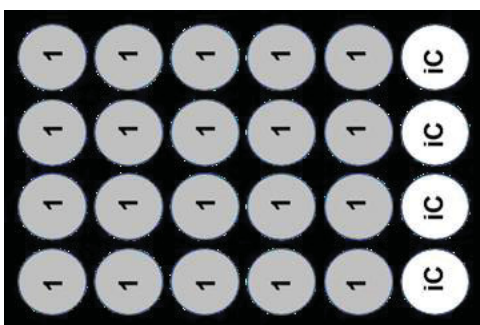
Cloreto de cádmio: **não**. Deltametrina: **não** (constante da Lei de Henry: 4,99X10⁻⁶ atm-cu m mol⁻¹ a 25 °C). Diclorvos: altamente volátil em superfícies secas, mas **não** em água (constante da Lei de Henry: 5,7X10⁻⁷ atm-cu m mol⁻¹ a 25 °C). 3,4-dicloroanilina: **sim** (constante da Lei de Henry: 1,46X10⁻⁵ atm-cu m mol⁻¹). A lei de Henry é uma lei dos gases que afirma que a quantidade de gás dissolvido em um líquido é proporcional à sua pressão parcial acima do líquido. O fator de proporcionalidade é chamado de constante da lei de Henry. Substâncias químicas com altos valores de constante da Lei de Henry se volatilizarão da água para o ar e serão distribuídas por uma grande área. Substâncias químicas com baixos valores tendem a persistir na água e podem ser adsorvidas no solo ou sedimento.

³⁴ A concentração de oxigênio dissolvido deve atingir pelo menos 90% de seu valor de saturação de ar (ASV) e o pH deve ser constante em 7,8 + 0,2. A dureza deve ser de aproximadamente 250 mg L⁻¹, expressa em carbonato de cálcio

2. Filtrar a água fornecida ao sistema filtrada por osmose reversa (pH 7,8) e adicionar o sal Instant Ocean® para aumentar a condutividade para 500 $\mu\text{S cm}^{-1}$
3. Alimentar os peixes adultos duas vezes ao dia com artemia viva e ração seca em flocos
4. Obter embriões saudáveis a partir da desova de zebrafish adultos

- *Seleção dos ovos e exposição aos contaminantes*

1. Selecionar 20 embriões saudáveis com 4 horas pós-fertilização (hpf)³⁵ por grupo experimental e 4 embriões por controle de placa interna
2. Colocar um embrião por poço de placa de 24 poços
3. Usar uma placa por contaminante e 200 μL de meio de exposição por poço



4. A cada 24 h remover embriões mortos, trocar metade do meio de exposição e registrar o número de embriões mortos e número de embriões eclodidos
5. Após 96 hpf, remover os embriões mortos e registrar
6. Observar o desenvolvimento e as deformidades letais e sub letais e registrar³⁶ usando um microscópio estéreo e capturar imagens
7. Descartar as larvas sobreviventes depois de eutanasiar com eugenol
8. Analisar conforme descrito nas orientações da OECD

EXPOSIÇÃO DOS EMBRIÕES PARA ANÁLISES DE WESTERN BLOT, PROTEÔMICA E QUANTIFICAÇÃO DE ZINCO

SOLUÇÕES E REAGENTES

- *Mesmos usados no teste de toxicidade, exceto controle positivo do teste de toxicidade, 3,4-dicloroanilina*

PREPARO DAS SOLUÇÕES E REAGENTES

- *Mesmo preparo descrito para o teste de toxicidade*

PROCEDIMENTOS

- *Criação de zebrafish*

³⁵Alguns estudos começaram o tempo de exposição o mais cedo possível (max 1 hpf), mas outros começaram em momentos diferentes. A qualidade dos embriões de zebrafish pode ser difícil de avaliar, segundo alguns autores, o teste deve ser iniciado apenas com os ovos fertilizados com formato esférico e sem coagulação ou bolhas a 4 hpf. A criação de zebrafish fêmeas e machos saudáveis também é muito importante para a obtenção de ovos saudáveis.

³⁶ Normalmente desenvolvido, embrião eclodido, bexiga natatória inflada ou com deformidades letais ou subletais: coagulado, convulsões, cauda não destacada, somitos não desenvolvidos, sem o reduzido batimento cardíaco, subdesenvolvido, edema da gema ou cardíaco, fluxo sanguíneo inexistente ou reduzido, tremor, escoliose, amplitude ocular ausente, somitos e cauda deformada, pigmentação ausente ou reduzida, malformação da nadadeira peitoral, malformação geral, sem movimentos espontâneos da cauda, etc.

1. Mesmo procedimento descrito para teste de toxicidade
 - *Seleção dos ovos e exposição aos contaminantes*
1. Selecionar 100 embriões saudáveis com 4 hpf por grupo experimental com 4 replicatas biológicas e colocar em béqueres com 100 mL de meio de exposição
2. A cada 24 h remover embriões mortos e trocar metade do meio de exposição
3. Após 96 hpf, lavar e coletar em criotubos 30 larvas para proteômica e western blot e 10 para quantificação de zinco
4. Transferir para nitrogênio líquido e armazenar a -80 °C até que as análises sejam feitas
5. Descartar as larvas restantes depois de eutanasiar com eugenol

EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNA TOTAL

HOMOGENEIZAÇÃO DOS EMBRIÕES E EXTRAÇÃO DE PROTEÍNA

SOLUÇÕES E REAGENTES

- Tris-HCl 50 mM pH 8,2
- Tampão de lise
- Benzonase
- Tampão de diluição de amostra
- Etanol 96% gelado
- Acetona gelada
- Solução de água ultrapura, etanol 96% e acetona (1:2:2)

PREPARO DAS SOLUÇÕES E REAGENTES

- *Tris-HCl 50 mM pH 8,2*
 1. Pesar 0,604 g de Tris Base e diluir em aproximadamente 100 mL de água ultrapura
 2. Ajustar o pH com HCl
 3. Ajustar o volume com uma proveta
- *Tampão de lise*
 1. Pesar 15,01 g de uréia (5 M), 0,0095 g de MgCl₂ (2 Mm) e diluir em aproximadamente 50 mL de Tris-HCl 50 mM pH 8,2
 2. Adicionar solução de inibição de protease
 3. Ajustar o volume com uma proveta
- *Tampão de Diluição de Amostra*
 1. Pesar 7,51 g de uréia (5 M) e diluir em aproximadamente 25 mL de Tris-HCl 50 mM pH 8,2
 2. Ajustar o volume com uma proveta

PROCEDIMENTOS

1. Adicionar 350 µL de tampão de lise e *beads* de cerâmica aos criotubos
2. Homogeneizar as amostras em instrumento de ruptura de amostra (FastPrep-24™ 5G, 3 ciclos de 40 segundos, com intervalo de 3 min)
3. Adicionar 1 µL (~25U) de benzonase a cada amostra e mantenha em gelo por 1,5 h
4. Centrifugar a 16.000 g por 30 min a 4 °C
5. Transfira 150 µL do sobrenadante para dois microtubos diferentes que serão combinados posteriormente

6. Adicionar 660 μL , 4,4:1 (v/v), de etanol 96% gelado em cada tudo e misture
7. Adicionar 600 μL , 4:1 (v/v) do volume inicial da amostra, de acetona gelada e misture
8. Manter as amostras a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ overnight
9. Centrifugar a 20.000 g por 15 min a $2\text{ }^{\circ}\text{C}$
10. Remover o sobrenadante
11. Adicionar 500 μL da solução de água, etanol e acetona (1:2:2) e misturar
12. Manter as amostras por 1,5 h a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$
13. Centrifugar a 20000 g por 15 min a $2\text{ }^{\circ}\text{C}$
14. Descartar o sobrenadante
15. Manter os microtubos abertos na capela de exaustão por cerca de 30 min para evaporar a acetona residual
16. Solubilizar o pellet em 100 μL em tampão de diluição de amostra

QUANTIFICAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA

SOLUÇÕES E REAGENTES

- Kit BCA

PREPARO DAS SOLUÇÕES E REAGENTES

- *Solução de trabalho*
8. Misturar as soluções A e B (50:1)

PROCEDIMENTOS

1. Diluir as amostras 1:20 em água ultrapura
9. Adicionar 10 μL de amostra por poço em uma placa de 96 poços em triplicata
10. Adicionar 10 μL de concentrações conhecidas de BSA (25 a $1000\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$) na mesma placa
11. Adicionar 200 μL da solução de trabalho por poço
12. Manter a placa a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$
13. Ler a absorbância em 562 nm

WESTERN BLOT

PREPARO DAS AMOSTRAS

SOLUÇÕES E REAGENTES

- Tampão de diluição de amostra
- Tampão de amostra para SDS-PAGE

PREPARO DAS SOLUÇÕES E REAGENTES

- *Tampão de Diluição de Amostra*
1. Pesar 7,51 g de uréia (5 M) e diluir em aproximadamente 25 mL de Tris-HCl 50 mM pH 8,2
 2. Ajustar o volume com uma proveta
- *Tampão de amostra para SDS-PAGE*
3. Misturar tampão de amostra NuPage NuPage LDS (4X), água ultrapura e agente redutor de amostra NuPage (DTT, 10X) nas razões 1:0,9:0,1

PROCEDIMENTOS

1. Transferir 20 µg de proteína por amostra para novos microtubos
2. Adicionar tampão de diluição da amostra para 10 µL no total em cada microtubo
3. Adicionar 10 µL de tampão de amostra para SDS-PAGE em cada microtubo
4. Aquecer as amostras a 70 °C por 10 min sob agitação
5. Centrifugar por 1 min à temperatura ambiente

SDS-PAGE

SOLUÇÕES E REAGENTES

- Tampão de corrida Bolt™ MES SDS
- Gel Bolt™ 12% com 15 poços
- Marcador de peso molecular PageRuler

PREPARO DAS SOLUÇÕES E REAGENTES

- *Tampão de corrida Bolt™ MES SDS*

1. Diluir o tampão de corrida Bolt™ MES SDS 20X em água ultrapura

PROCEDIMENTOS

1. Adicionar 3 µL de marcador de peso molecular em um poço no gel
2. Misturar uma vez as amostras com uma pipeta e adicionar 20 µL por amostra nos poços do gel
3. Correr as amostras no gel a 160 V até que o marcador de peso molecular chegue ao final do gel (fronteira azul)
4. Abrir o gel e corte a parte inferior

TRANSFERÊNCIA

SOLUÇÕES E REAGENTES

- Towbin buffer
- TBS 10X
- TBS 1X
- TBST
- Tampão de bloqueio
- Ponceau-S 0,2%

PREPARO DAS SOLUÇÕES E REAGENTES

- *Towbin buffer*

1. Pesar 3,03 g de Tris Base, 14,4 g de glicina para 800 mL com água
2. Adicionar 0,01% SDS (1mL do estoque de 10%)
3. Adicionar 200 mL de metanol
4. Não ajustar o pH

- *TBS 10X*

1. Pesar 30,3 g de Tris Base, 80 g de NaCl e 2 g de KCl para 1 L com água
2. Ajustar o pH para 7,4 com HCl
3. Ajustar o volume

- *TBS 1X*

1. Diluir 100 mL de TBS 10X para 1 L de água

- *TBST*

1. Diluir 1 mL de Tween 20 e 100 mL de TBS 10X para 1 L de água

- *Tampão de bloqueio*

1. Adicionar 3% de BSA em TBST

- *Ponceau-S 0,2%*

1. Pesar 1 g de Ponceau-S

2. Diluir em 25 mL de ácido acético 5% para 500 mL de água

PROCEDIMENTOS

1. Incubar o gel a 4 °C em um agitador em Towbin buffer por 10-20 min

2. Cortar um pedaço de membrana PVDF e dois pedaços de papel absorvente no tamanho do gel

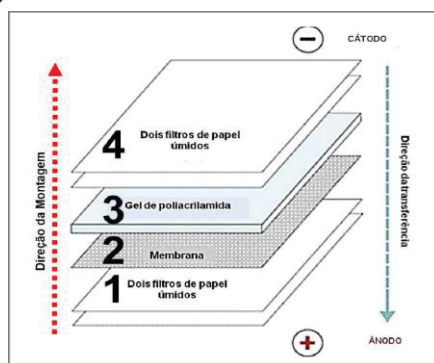
3. Umedecer a membrana de PVDF por 1 min em metanol, seguido de 30 segundos de enxágue em água

4. Transferir a membrana para o Towbin buffer até o momento de uso

5. Umedecer os papeis absorventes apenas antes do uso em Towbin buffer gelado

6. Fazer a transferência das proteínas do gel para a membrana usando o sistema Trans-Blot Turbo

7. Montar o sanduíche de transferência e use o mini rolo para remover quaisquer bolhas de ar entre as camadas



8. Inserir o cassete na unidade de transferência

9. Selecionar o botão LIST no menu HOME, selecionar o protocolo de transferência e executar - escolha A ou/e B

10. Transferir usando 25V por 15 min

11. Para observar a eficiência da transferência usar a solução de Ponceau-S 0,2%, incubando por 5 min

12. Descorar sob agitação suave em água

13. Incubar a membrana em 5 mL de tampão de bloqueio em um tubo de 50 mL por 1 h com rotação

DETECÇÃO

SOLUÇÕES E REAGENTES

- Substrato para HRP (Immobilon® Forte)
- Anticorpo para metalotioneína, anti-MT (Invitrogen, ref. MA1-25479)
- Anticorpo secundário para IgG de camundongo conjugado com HRP (Abcam, ref. ab6728)
- Anticorpo para β -actina conjugado com HRP (Invitrogen, ref. PA5-98583)
- Solução de stripping

PREPARO DAS SOLUÇÕES E REAGENTES

- *As diluições dos anticorpos são feitas apenas no momento do uso*

PROCEDIMENTOS

1. Incubar a membrana com o anticorpo anti-MT 1:1000 em tampão de bloqueio overnight com rotação a 4 °C
2. Lavar a membrana em TBST por 15 min (3 vezes)
3. Incubar a membrana com anticorpo secundário 1:5000 em TBST por 2 h
4. Lavar a membrana em TBST por 15 min (3 vezes)
5. Lavar a membrana em TBS por 15 min
6. Colocar a membrana com as proteínas voltadas para cima em um recipiente ou protetor de plástico transparente e adicione o substrato
7. Usar aproximadamente 0,5 mL para uma membrana inteira
8. Incubar a membrana por 2 a 5 min à temperatura ambiente
9. Drenar o excesso de substrato e transferir para um protetor limpo e cobrir com plástico protetor
10. Transfiriir para a câmera CCD (Amersham 680 Imager) e colocar na bandeja para quimioluminescência
11. Expo a membrana por um período de tempo apropriado
12. Salvar as imagens
13. Lavar as membranas foram lavadas como descrito anteriormente
14. Remover os anticorpos com solução de stripping
15. Lavar as membranas foram lavadas como descrito anteriormente
16. Incubar em solução de bloqueio por 1 h
17. Incubar com anticorpo β -actina 1:5000 por 1 h
18. Lavar e detectar como descrito anteriormente

PROTEÔMICA E FOSFOPROTEÔMICA

EMPACOTAMENTO DE PRÉ-COLUNA

SOLUÇÕES E REAGENTES

- Solução de Silicato de Potássio Kasil
- Formamida $\geq 99.0\%$
- ReproSil-Pur 120 C18-AQ, 5 μ m
- Metanol $\geq 99.8\%$
- 2-Propanol

PROCEDIMENTOS

1. Cortar um pedaço longo (150 cm)³⁷ de capilar de sílica fundida, com 100 μ m de diâmetro interno usando uma pastilha de cerâmica (comprimento de cada pré-coluna é de cerca de 13 cm)
2. Examinar a extremidade cortada em um microscópio e, se necessário, fazer o polimento com a pastilha de cerâmica
3. Limpar a extremidade cortada com etanol para remover os fragmentos de poliamida que estão presos à coluna
4. Lavar o capilar com metanol usando a bomba de pressão por 10 seg
5. Esvaziar o capilar e pressurizar novamente até que não saia mais líquido

³⁷ O comprimento do capilar pode ser calculado com base no número de pré-colunas que serão feitas

6. Cortar em pedaços de 13 cm com pastilha de cerâmica
7. Limpar a extremidade cortada com etanol
8. Transfiriir 88 μL de Kasil para um microtubo e adicionar 16 μL de formamida para fazer o “frit”
9. Misturar por 30 seg com auxílio de um vórtex³⁸
10. Mergulhar 1 mm do capilar na mistura observando contra a luz
11. Remover o capilar quando a mistura atingir aproximadamente 0,5 cm de altura
12. Mantenha o capilar com a extremidade revestida na posição horizontal overnight em 110 °C para polimerização
13. Cortar o frit em um comprimento de 2-3 mm, polir a extremidade cortada com pastilha de cerâmica e limpar com etanol
14. Enxaguar o capilar com metanol para remover a formamida restante e observar se o líquido escorre continuamente pela lateral da sílica, então o capilar com frit está pronto para o empacotamento
15. Preparar a pasta de resina (Reprosil-Pur C18-AQ, 5 μm) usando 500 mL de metanol, 100 mL de isopropanol e ímã para agitação magnética
16. Pegar com uma espátula a resina (peso em torno de 5 mg ml⁻¹, 3 mg para 600 μL)
17. Colocar a pasta de resina em uma bomba de pressão e ligar a agitação magnética
18. Verificar a velocidade de agitação e certificar-se de que o ímã não se mexa muito rápido, pois criará um redemoinho no frasco e, em seguida, nenhum líquido estará no meio do frasco onde o capilar é colocado
19. Colocar o capilar na bomba de pressão com a frit para cima
20. Empurrar todo o caminho até encontrar resistência, então puxar 2-3 mm para cima e apertar a porca
21. Ligar a pressão (N₂) entre 50 e 100 bar
22. Quando a coluna atingir o comprimento desejado (as pré-colunas são normalmente empacotadas de 3 a 4 cm) levantar cuidadosamente o capilar (ainda pressurizado) para que a extremidade dentro da bomba fique acima do líquido
23. Retirar a pressão da bomba quando não sair mais líquido da coluna e retirar a coluna
24. Marcar a direção do fluxo (\uparrow)
25. Cortar no comprimento desejado e polir a ponta cortada na pastilha de cerâmica
26. Armazenar as colunas em temperatura ambiente

EMPACOTAMENTO DE COLUNA ANALÍTICA

SOLUÇÕES E REAGENTES

- Reprosil-Pur 120 C18-AQ, 3 μm
- Metanol $\geq 99.8\%$
- 2-Propanol

PROCEDIMENTOS

1. Verificar a ponta do capilar de sílica fundida com 75 μm de diâmetro interno no microscópio (forma, está aberta etc., a ponta é feita usando um laser puller)
2. Lavar o capilar com metanol para ver se a ponta não está bloqueada
3. Se nenhum líquido estiver saindo, usar chama na a ponta até que o líquido saia
4. Preparar a pasta de resina (Reprosil-Pur C18-AQ, 3 μm) usando 500 μL de metanol, 100 μL de isopropanol e um ímã para agitação magnética

³⁸ Se o líquido não se misturar adequadamente, descarte a formamida e substitua por uma nova ou/e verifique a viscosidade do Kasil

5. Verificar a velocidade de agitação e certificar-se de que o imã não se mexa muito rápido, pois criará um redemoinho no frasco e, em seguida, nenhum líquido estará no meio do frasco onde o capilar é colocado
6. Colocar cuidadosamente o capilar na bomba de pressão com a ponta para cima
7. Empurrar todo o caminho até encontrar resistência, puxar 2-3 mm para cima e aperte a porca
8. Ligar a pressão (N₂) entre 150 e 200 bar
9. Quando a coluna atingir o comprimento desejado (colunas analíticas são normalmente empacotadas em 22-25 cm) levantar a coluna (ainda pressurizada) de forma que a ponta dentro da bomba fique acima no líquido
10. Aguardar até que a coluna se esvazie (30 min - 1 h) ou deixe a pressão cair lentamente durante a noite
11. Lentamente remover o restante da pressão da bomba
12. Colocar a pressão de volta cada vez que você observar que o material da coluna está se movendo para trás dentro da coluna
13. Remover a coluna da bomba
14. Continuar o pré-empacotamento/equilíbrio da coluna em um Easy-nLC com tampão B (95% acetonitrila, 0,1% ácido fórmico)
15. Conectar a coluna de saída com a coluna analítica usando um plug
16. Iniciar o fluxo de tampão B no EASY-nLC com as válvulas nas seguintes posições:
Válvula A: 1-2, Válvula B: 1-6 e Válvula S: 1-2
17. Iniciar a bomba B manualmente com fluxo de 10 µL min⁻¹ até atingir 150 bar
18. Baixar o fluxo até 5 µL min⁻¹ até atingir 180 bar
19. Baixar o fluxo até 1 µL min⁻¹ até atingir 200 bar
20. Ajustar o fluxo para que a pressão permaneça estável em torno de 200 bar (0,5 µL min⁻¹)
21. Manter por 5 a 10 min
22. Verificar a pressão para não ultrapassar 300 bar
23. Uma vez que a coluna esteja equilibrada, deixar a pressão cair lentamente desligando o fluxo e esperar até que a pressão esteja abaixo de 20 bar antes de remover a coluna
24. Verificar o material dentro da coluna ao microscópio
25. Cortar no comprimento desejado³⁹ e polir a ponta cortada com a pastilha de cerâmica
26. Armazenar as colunas analíticas em temperatura ambiente ou em uma pequena caixa com 10% de etanol

CONFIGURAÇÃO DE SISTEMA LC-MS/MS COM EASY-nLC 1000

SOLUÇÕES E REAGENTES

- Tampão A: 0,1% ácido fórmico
- Tampão B: 95% acetonitrila, 0,1% ácido fórmico
- Padrão de BSA digerido, 10 fmol µL⁻¹

PREPARO DAS SOLUÇÕES E REAGENTES

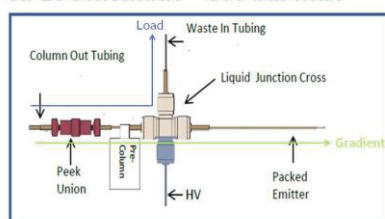
- *Tampão A e B*
1. Misturar com água ultrapura até chegar nas concentrações desejadas

PROCEDIMENTOS

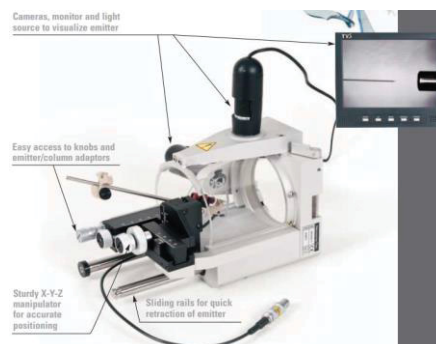
³⁹ Ao usar uma pré-coluna, é melhor evitar qualquer volume morto no final da coluna de cromatografia

1. Conectar o EASY-nLC 1000 com o espectrômetro de massas (Q Exactive, Exploris ou outro)
2. Executar os scripts Purge Solvent e Flush Air⁴⁰
3. Lavar o loop antes de conectar sua pré-coluna e coluna analítica, primeiro com tampão B e depois tampão A
4. Verificar se o LC está com configuração de 2 colunas
5. Conectar a coluna de saída com a pré-coluna, lembrando de verificar a direção do fluxo
6. Abrir o script de equilíbrio de pré-coluna
7. Verificar se líquido está passando pela coluna e se o fluxo está em torno de 3 - 4 $\mu\text{L min}^{-1}$
8. Usar um “cross” para conectar a coluna analítica e os outros capilares como no esquema abaixo

HPLC Schematic—300 bar max



9. Executar o script de equilíbrio da pré-coluna outra vez
10. Executar o script de equilíbrio da coluna analítica
11. Verificar se líquido está passando pela coluna e se o fluxo está em torno de 350-500 nL min^{-1}
12. Verificar o spray enquanto se equilibra a coluna analítica e colocar a coluna na fonte de íons Nanoflex como no esquema abaixo



13. Verificar as configurações antes de injetar as amostras usando como standart uma digestão tríplica de BSA, 10 $\text{fmol } \mu\text{L}^{-1}$ (50 fmol por injeção) com gradiente LC de 23 min
14. Começar executando um padrão de 500 fmol de BSA, seguido por algumas execuções de 50 fmol para condicionar as colunas
15. Quando a separação e a forma dos picos parecem estabilizar, usar o cromatograma para avaliação

⁴⁰O script Purge Solvent é usado para trocar o solvente e remover ar dos capilares ou abastecer as bombas. O script Flush Air pressuriza a bomba e depois libera essa pressão nas linhas de fluxo em direção ao descarte de resíduos, o que é eficaz para remover o ar da bomba.

16. Converter o arquivo .raw em um arquivo .mgf (Mascot Generic Format) e abrir o servidor Mascot⁴¹
17. Começar a injetar suas amostras "reais" quando a cobertura do BSA for no mínimo de 70%⁴²

REDUÇÃO E ALQUILAÇÃO

SOLUÇÕES E REAGENTES

- Tampão de Diluição de Amostra
- Solução de Redução 50X
- Solução de Alquilação 50X

PREPARO DAS SOLUÇÕES E REAGENTES

- *Tampão de Diluição de Amostra*
 1. Pesar 7,51 g de uréia (5 M) e diluir em aproximadamente 25 mL de Tris-HCl 50 mM pH 8,2
 2. Ajustar o volume com uma proveta
- *Solução de Redução (50X)*
 1. Tris(2-carboxietil)fosfina 500 Mm é fornecido como solução 50X
- *Solução de Alquilação (50X)*
 2. Pesar 92,5 mg de 2-Cloroacetamida (2 M)
 3. Diluir em 500 µL de água ultrapura

PROCEDIMENTOS

1. Usar 100 µg de proteínas totais
2. Corrigir o volume com tampão de diluição de amostra para que todas as amostras apresentem o mesmo volume
3. Adicionar solução de redução e alquilação: TCEP a uma concentração final de 10 mM e CAA a uma concentração final de 40 mM
4. Incubar as amostras à temperatura ambiente por 1 h

DIGESTÃO ENZIMÁTICA

SOLUÇÕES E REAGENTES

- 50 mM Tris-HCl pH 8,2
- Tripsina
- Ácido trifluoroacético ≥ 99%

PREPARO DAS SOLUÇÕES E REAGENTES

- *Tris-HCl 50 mM pH 8,2*
 1. Pesar 0,604 g de Tris Base e diluir em aproximadamente 100 mL de água ultrapura
 2. Ajustar o pH com HCl
 3. Ajustar o volume com uma proveta

⁴¹ O resultado da pesquisa mostrará, entre outras informações, a cobertura, íons fragmentados, precisão de massa (ambos no nível MS e MSMS)

⁴² Porcentagens mais baixas são frequentemente causadas pela não detecção de íons relativamente pesados (ou seja, não escolhidos para fragmentação devido à sua baixa abundância ou interferência de contaminantes)

3. Pesar

PROCEDIMENTOS

1. Diluir as amostras de proteína adicionando 50 mM Tris-HCl pH 8,2 para atingir 1 M de ureia
2. Adicionar tripsina 1:50 (peso da enzima:peso de proteína total) e misturar
3. Incubar a 37 °C durante 4 h
4. Adicionar mais enzima 1:100 (peso da enzima:peso de proteína total)
5. Incubar a 37 °C overnight
6. Parar a reação adicionando TFA às amostras até uma concentração final de 2%

DESALINIZAÇÃO

SOLUÇÕES E REAGENTES

- Ácido trifluoroacético 0,1%
- Acetonitrila 30%, 50% e 100%
- Ácido fórmico 0,1%

PREPARO DAS SOLUÇÕES E REAGENTES

- *Soluções de ácido trifluoroacético 0,1%, acetonitrila 30%, 50% e 100% e ácido fórmico 0,1%*
1. Adicionar água ultrapura para que fique nas concentrações desejadas

PROCEDIMENTOS

1. Centrifugar as amostras a 10000 g por 10 min
2. Condicionar o cartridge adicionando 600 µL de acetonitrila e 600 µL de ácido trifluoroacético 0,1%
3. Passar a amostra pelo cartridge de 10 mg (1:100 massa de peptídeos:massa das beads no cartridge)
4. Remover os sais adicionando 600 µL de ácido trifluoroacético 0,1%
5. Eluir os peptídeos com 300 µL de acetonitrila 30% e 300 µL de acetonitrila 50%
6. Liofilize as amostras de peptídeos por centrifugação a vácuo
7. Solubilizar as amostras em 50 µL de ácido fórmico 0,1%
8. Estimar a concentração de peptídeos usando kit BCA depois de diluir as amostras 1:10 em água
9. Injetar 1 µg de peptídeo no sistema LC-MS/MS em 5 µL de ácido fórmico 0,1% para checar a eficiência da digestão

MARCAÇÃO

SOLUÇÕES E REAGENTES

- HEPES 100 Mm pH 8,5
- Kit TMT 11-plex
- Acetonitrila anidro
- Hidroxilamina 50%
- Ácido trifluoroacético 0,1%
- Acetonitrila 30%, 50% e 100%
- Ácido fórmico 0,1%
- Tampão A – High pH

PREPARO DAS SOLUÇÕES E REAGENTES

- *HEPES 100 Mm pH 8,5*
 1. Pesar 0,48 g e diluir em água ultrapura
 2. Aferir e corrigir o pH
 3. Volume final de 20 mL
- *Hidroxilamina 50%, ácido trifluoroacético 0,1%, acetonitrila 30%, 50% e 100% e ácido fórmico 0,1%*
 1. Adicionar água ultrapura para que fique nas concentrações desejadas
- *Tampão A – High pH*
 1. Formato de amônio 20 mM pH 9,3
 2. Pesar 252,24 mg e diluir em água ultrapura
 3. Aferir e corrigir o pH com NH₄OH
 4. Volume final de 200 mL

PROCEDIMENTOS

1. Solubilizar os peptídeos depois de digeridos, dessalinizados e liofilizados em 100 µL de HEPES 100 mM (pH 8,5) com cerca de 50 µg de peptídeo de cada amostra usada para marcação de TMT
2. Verificar o pH em cada amostra e ajustar com uma pequena quantidade de HEPES concentrado se necessário (geralmente não é necessário para amostras adequadamente dessalinizadas)
3. Usar um kit TMT 11-plex (126, 127N, 127C, 128N, 128C, 129N, 129C, 130N, 130C, 131N and 131C) para marcar as amostras de cada réplica biológica (controle, controle-DMSO, cádmio, diclorvos, deltametrina, brigde channel)
4. Para o brigde channel misturar 5 µg de peptídeo de cada uma das 20 amostras antes de marcar
5. Incubar as alíquotas (0,25 mg) de cada reagente em 41 µl de acetonitrila anidro com as amostras de peptídeo por 1 h à temperatura ambiente com agitação leve (400 rpm)⁴³
6. Tentar adicionar a solução com as tags a todas as amostras ao mesmo tempo (para iniciar a marcação simultaneamente)
7. Verificar a eficiência da marcação e proporção entre as tags misturando uma pequena quantidade igual de cada amostra, por exemplo 1 µL, liofilizando, solubilizando em ácido fórmico 0,1% e analisando com gradiente de LC-MS/MS de 30 min (1 µg por coluna)
8. Usar 60K de resolução para MS2 ao executar TMT10/11 e TMT16/18
9. Armazenar as amostras em -20 °C antes de misturar e do quenching
10. Pesquisar o arquivo resultante com o Proteome Discover para verificar a eficiência da marcação, pesquisando com modificações variáveis de TMT⁴⁴
11. Ajustar os volumes das amostras ao misturar para ficar com a proporção de 1:1:1:1:1:1:1:1:1:1:1⁴⁵ para cada duas réplicas biológica, misturar as quantidades adequadas das 11 amostras marcadas com TMT usando os coeficientes de ajuste⁴⁶

⁴³NHS-ésteres irão hidrolisar, portanto é necessário balancear orgânicos capazes de dissolver todos os peptídeos e ainda desacelerar a hidrólise

⁴⁴ Espera-se que mais de 99% dos peptídeos estejam marcados

⁴⁵ O ajuste de proporção pode ser ignorado se você esperar mudanças significativas na concentração de proteína total entre as amostras

⁴⁶ Diferenças entre os canais <10% são aceitáveis e podem ser facilmente corrigidas durante a análise de dados, no entanto, pode ser ajustado cada canal

12. Fazer o quench da reação com hidroxilamina (concentração final de hidroxilamina 0,4%), incubando por 15 min em temperatura ambiente⁴⁷
13. Para proteoma total, separar 10% de cada amostra mista (em torno de 50 µg de peptídeo), liofilizar a solução por centrifugação a vácuo e ressuspender em ácido trifluoroacético 0,1%
14. Dessalinizar os peptídeos marcados com TMT como descrito anteriorente⁴⁸
15. Liofilizar as amostras por centrifugação a vácuo
16. Solubilizar os peptídeos em Tampão A – High pH

ENRIQUECIMENTO DE FOSFOPEPTÍDEOS

SOLUÇÕES E REAGENTES

- Ácido trifluoroacético 100%
- Acetonitrila
- Ácido glicólico
- Beads de TiO²
- Tampão 1
- Tampão 2
- Solução de hidróxido de amônio 1%, pH 11,3
- Tampão A – High pH

PREPARO DAS SOLUÇÕES E REAGENTES

- *Tampão 1*
 1. Acetonitrila 80% e ácido trifluoroacético 1%
 2. Adicionar água ultrapura para que fique nas concentrações desejadas
- *Tampão 2*
 1. Acetonitrila 10% e ácido trifluoroacético 0,2%
 2. Adicionar água ultrapura para que fique nas concentrações desejadas
- *Solução de hidróxido de amônio 1%, pH 11,3*
 1. Pesar 0,25 g
 2. Adicionar 25 mL de água ultrapura
- *Tampão A – High pH*
 1. Formato de amônio 20 mM pH 9,3
 2. Pesar 252,24 mg e diluir em água ultrapura
 3. Aferir e corrigir o pH com NH₄OH
 4. Volume final de 200 mL

PROCEDIMENTOS

1. Liofilizar as amostras por centrifugação a vácuo e solubilizar em 150 µL de água ultrapura
2. Adicionar 50 µL ácido trifluoroacético 100%, 800 µL acetonitrila e 76 mg de ácido glicólico
3. Manter a amostra em agitação até obter uma solução límpida

⁴⁷ O papel importante da hidroxilamina é reverter as reações do TMT com, por exemplo, O-aminoácidos (tirosina, serina), embora menores, eles levarão a menos ids, portanto, não ignore esta etapa

⁴⁸ A amostra mista pode ser dessalinizada como descrito anteriormente e processada para proteoma total, para enriquecimento de fosfopeptídeo não é necessário dessalinizar

4. Adicionar beads de TiO₂ (0,6 mg por amostra de 100 µg) e incubar por 10 min com agitação vigorosa à temperatura ambiente
5. Centrifugar (centrífuga de bancada) por 1 min para sedimentar as beads e transferir o sobrenadante para outro microtubo de baixa ligação
6. Adicionar novas beads de TiO₂ (metade da quantidade usada inicialmente) ao sobrenadante e incubar agitando por 10 min⁴⁹
7. Após a incubação, centrifugar para sedimentar as beads e transferir o sobrenadante para outro microtubo de baixa ligação (peptídeos não modificados)
8. Mover ambas as beads de TiO₂ para um novo microtubo de baixa ligação, suspendendo em baixo volume de tampão 1⁵⁰
9. Lavar as beads, misturar com vórtex e transferir o sobrenadante para o microtubo com peptídeos não modificado
10. Repetir a lavagem
11. Lavar o pellet com 100 µL de tampão 2, misturar com vórtex e centrifugar
12. Liofilizar as beads de TiO₂ por 10 min em centrifugação a vácuo
13. Adicionar 150 µL de solução de hidróxido de amônio 1%, pH 11,3 e incubar em agitação por 10 min
14. Centrifugar por 1 min e recuperar o sobrenadante sem quaisquer beads em um microtubo de baixa ligação
15. Opcionalmente, repetir a eluição de peptídeos com 50 µL da solução de eluição e combinar os eluídos
16. Liofilizar a solução por centrifugação a vácuo
17. Solubilizar os peptídeos em Tampão A – High pH

FRACIONAMENTO

SOLUÇÕES E REAGENTES

- Tampão A
- Tampão B

PREPARO DAS SOLUÇÕES E REAGENTES

- *Tampão A- Formato de amônio 20 mM pH 9,3*
 1. Pesar 252,24 mg e diluir em água ultrapura
 2. Aferir e corrigir o pH com NH₄OH
 3. Volume final de 200 mL
- *Tampão B- Acetonitrila 80% em formato de amônio 20 mM (pH 9,3)*
 1. Misturar Acetonitrila 80% em formato de amônio 20 mM (pH 9,3) nas concentrações desejadas

PROCEDIMENTOS

1. Injetar os peptídeos marcados com TMT solubilizadas em tampão A em um C18 Acquity UPLC MClass CSH 1,7 µm, 300 µm × 100 mm, usando um sistema HPLC
2. Eluir os peptídeos a 100 nL min⁻¹ aumentando o tampão B de 2% para 95%, ao longo de 100 min para proteoma total e 60 min para fosfoproteômica

⁴⁹Aumenta o rendimento dos fosfopeptídeos

⁵⁰ Pode exigir várias tentativas para obter todas as beads, mantenha o volume final de 200 µL (mas o volume não é tão crucial, melhor obter todas as beads)

3. Concatenar as frações em 10 amostras para proteoma total e em 4 para fosfoproteômica
4. Liofilizar as 11 amostras do proteoma total de cada duas réplicas biológicas (10 amostras mais o flow through - peptídeos eluídos no início das condições iniciais de separação de high pH) e 5 amostras do fosfoproteoma (4 amostras mais o flow through - peptídeos eluídos no início das condições iniciais de separação de high pH) de cada duas réplicas biológicas

INJEÇÃO DAS FRAÇÕES NO SISTEMA LC-MS/MS

SOLUÇÕES E REAGENTES

- Ácido fórmico 0,1%

PREPARO DAS SOLUÇÕES E REAGENTES

- *Solução*

1. Misturar ácido fórmico e água ultrapura na concentração desejada

PROCEDIMENTOS

1. Solubilizar as frações em ácido fórmico 0,1%
2. Injetar a frações no sistema LC-MS/MS em 5 µL de ácido fórmico 0,1%

ANÁLISE

PROCEDIMENTOS

1. Adicionar os arquivos .raw na plataforma MaxQuant e o proteoma de *Danio rerio* (UniProt UP000000437) em formato .fasta
2. Ajustar os parâmetros usados no experimento (enzima utilizada, *label-based*, proteômica, fosfoproteômica, etc.)
3. A partir dos arquivos de saída proteinGroups.txt e Phospho(STY)Sites.txt, organizar os dados, aplicar \log_2 e normalizar pela mediana
4. Fazer a análise estatística (ANOVA) para a identificação das proteínas reguladas
5. Usar o servidor ShinyGO 0.77 para as análises de enriquecimento e anotações a partir de ontologia genética e vias KEGG, adicionando a lista de proteínas reguladas
6. Construir as redes de interação entre proteínas usando a ferramenta STRING e o programa Cytoscape

QUANTIFICAÇÃO DE ZINCO

ESPECTROMETRIA DE MASSAS COM PLASMA INDUTIVAMENTE ACOPLADO (ICP-MS)

SOLUÇÕES E REAGENTES

- HNO₃ 67-69% (ICP-MS grade)
- H₂O₂ 30%

PROCEDIMENTOS

1. Dissolver a amostra (10 embriões) em 0,5 mL de H₂O₂ 30%
2. Colocar em banho ultrassônico por 15 min
3. Adicionar 1 mL de HNO₃ 67-69% (ICP-MS grade)
4. Colocar no agitador de mesa durante a noite

5. Diluir até 5 mL com água ultrapura e filtrar 2,5 mL
6. Armazenar as soluções filtradas e não filtradas a -20 °C até o dia da análise
7. Diluir a amostra 2:8 com água ultrapura
8. Injetar no sistema para medição em ICP-MS

**ANEXO 5 – TABELA DE PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS
NO PROTEOMA DAS LARVAS DE *D. rerio* EXPOSTAS AOS
CONTAMINANTES**

PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS NO PROTEOMA DAS LARVAS DE <i>D. rerio</i> EXPOSTAS AO CÁDMIO			
PROTEIN ID	GENE	FOLD CHANGE	P VALUE
A0A8M2BL17	wipf2b	0.680	0.032
A0A8M1P5S3	pole4	0.643	0.024
A0A8M9P6W4	LOC103910005	0.616	0.027
Q6DHT8	fthl27	0.576	0.025
A0A8M2B9X2	fi17a12	0.522	0.049
A0A8M2BHX5	lztfl1	0.501	0.049
A3KPZ9	si:ch211-152p11.4	0.420	0.028
Q6PBT1	zgc:73262	0.419	0.028
A0A8M3B0N4	sh2b2	0.385	0.048
A0A8M9Q6F6	tacc1	0.369	0.014
Q7ZUY0	seta	0.274	0.048
Q58EQ1	tgfbr2	0.242	0.013
A0A8M3ATU3	nadk2	0.218	0.029
Q504J1	caspb	0.212	0.036
Q6NYE1	fgb	0.163	0.008
Q7ZVG7	fgg	0.156	0.012
A0A8M2B8T5	srsf6a	0.123	0.015
A0A8M2B557	si:ch211-125o16.4	0.080	0.050
A0A8M2BBH0	gfap	-0.125	0.007
Q6AXK1	tango2	-0.212	0.046
A0A8M6YTM4	pclob	-0.319	0.047
Q9I9E5	snrpb	-0.343	0.042
A0A8M9Q1I3	map7d3	-0.377	0.044
PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS NO PROTEOMA DAS LARVAS DE <i>D. rerio</i> EXPOSTAS AO DICLORVÓS			
PROTEIN ID	GENE	FOLD CHANGE	P VALUE
Q7ZTU4	pafah1b3	0.813	0.000
A0A8N7T6V1	si:dkey-183i3.5	-0.400	0.000
Q8AX99	actn3b	0.630	0.000
A0A8M1RLU4	otos2	-0.302	0.000
Q7T002	psmb7	-0.116	0.001
Q1JPX3	farsa	0.321	0.001
A0A8M9PPJ2	ces2	-0.435	0.001
Q90XS8	aldh1a2	0.305	0.001
Q4VBV2	rps27.1	0.245	0.001
A0A8N7V0N1	serpina11	-0.157	0.002
Q6PC44	calb2a	-0.233	0.002
A0A8M2BA46	dnm11	0.438	0.002

A0A8M2BBY4	ngs	0.205	0.003
Q1RM09	baspl	-0.266	0.003
Q7ZUW5	rab5aa	0.352	0.003
A0A8M9PZF8	LOC110438424	-0.495	0.003
Q7SZP4	zgc:65851	-0.252	0.003
REV__A0A8M9PNA6	Si:dkey-81e3.2	1.036	0.003
Q6DHF0	myoz1b	-0.302	0.004
E7F1Q8	clta	-0.172	0.004
Q1LYB6	atp5if1b	-0.215	0.004
A0A8M9QHJ0	hnrnpa1a	-0.310	0.004
A0A8M2B5M3	aars1	0.488	0.004
B8A568	myhz1.1	0.557	0.005
Q503D8	txndc12	-0.398	0.006
A0A8M9PEW6	glipr2	-0.265	0.006
Q6PBJ9	rplp2	-0.307	0.006
Q6TH07	flot1b	0.476	0.006
Q6NV07	mcm5	0.483	0.006
A0A8M3BCF4	si:ch211-140m22.7	-0.189	0.006
A0A8M1P8G3	zgc:113436	0.255	0.006
A0A8M1PUZ3	calb1	-0.212	0.006
A0A8M3AWE5	uba2	0.348	0.006
Q7ZVD9	rps3	0.250	0.007
Q6PHE4	krt18b	-0.124	0.008
B8JM34	atp5pf	-0.180	0.008
Q8QFU2	gpia	-0.341	0.008
A0A8M1P8Z3	ddx39aa	0.274	0.008
Q7SXL4	nme2b.2	-0.229	0.009
A0A8M2BIX4	maptb	-0.420	0.009
A0A8M2B316	rrbp1a	0.085	0.009
A0A8M1NSZ1	elob	-0.245	0.010
Q6PGY6	ufl1	-0.494	0.011
Q6AZV8	hpdb	0.375	0.011
Q6PEI6	aco2	0.150	0.011
A0A8M9QBU7	actn4	0.212	0.011
X1WH50	si:ch211-137a8.4	-0.144	0.012
Q6PC56	calb2b	-0.253	0.012
Q6PC13	phb2a	0.238	0.012
Q5U3H4	rpia	-0.215	0.013
Q6PH46	cct4	0.298	0.013
Q6IQM0	sf3b6	0.282	0.013
A0A8M9PFC7	myh7bb	0.863	0.013
A0A8M1PFH7	phgdh	0.390	0.013
A0A8N7UZL1	pcxb	0.493	0.014
Q8JHV7	lamb1a	0.262	0.014
A5PLC6	bag1	-0.344	0.014
A0A8M9Q944	cgn11	0.751	0.014

Q6PBW7	rps19	0.220	0.015
Q6TNS5	zgc:153867	-0.248	0.015
Q8JHG7	cct7	0.257	0.015
Q6DGE2	pcca	0.303	0.015
Q5RKQ3	fubp3	-0.112	0.015
A0A8M1RF06	hnrnpull1	-0.108	0.016
Q803G0	erlec1	0.134	0.016
Q5XFY0	pgm3	0.488	0.017
A0A8M9Q1I3	map7d3	-0.458	0.018
Q08C61	abi1b	-0.381	0.019
A0A8M6YVR9	gars1	0.308	0.019
Z4YIA7	calua	-0.143	0.019
A0A8M3ATU3	nadk2	0.237	0.019
Q6DBT3	txndc17	-0.281	0.020
Q7ZU46	hspa4a	0.328	0.020
A0A8M6Z319	akap8l	-0.281	0.020
A0A8M9P806	zgc:114181	0.173	0.020
A0A8M3AM03	ubap2a	-0.176	0.020
Q6AXK1	tango2	-0.268	0.021
Q7ZUG5	rps21	-0.190	0.021
A0A8M2BGK7	hmgn1b	-0.223	0.021
B8A516	tuba1b	0.934	0.021
A0A8M1P781	cb759	-0.271	0.021
Q6IQ91	zgc:86896	1.377	0.021
Q7SY46	atp6v1aa	0.297	0.021
A0A8M9QDQ9	rbm39b	-0.427	0.022
Q7T339	chmp5b	0.274	0.023
A0A8M6YXS6	krt5	-0.299	0.023
A0A8M2BL17	wipf2b	0.723	0.024
F6P9S6	si:ch211-243g18.2	-0.090	0.025
Q803B0	hspd1	-0.215	0.025
A0A8M2B824	ncaml1a	0.462	0.025
A0A0R4I9C1	yars1	0.219	0.025
A0A8M1N7D8	apobb.1	0.644	0.025
A0A0R4IFJ4	pcxa	0.424	0.025
Q92005	eef1a111	0.171	0.025
A0A8M9PI97	spna2	-0.153	0.026
A0A8M2B7I0	prrx1b	0.556	0.026
A0A8M9QAC4	matn4	0.195	0.026
A4IGC8	aldh18a1	0.283	0.027
A2BF67	ensab	-0.101	0.027
Q802Z2	prkesh	-0.210	0.028
A0A8M9QGA6	ttn.1	0.584	0.028
A0A8N7UZM3	cmlc1	-0.214	0.028
A0A8M1RPD2	myom2b	0.473	0.028
A0A8M1P2Q9	cb159	0.286	0.029

A0A8M1P7Q0	hmgn1a	-0.229	0.029
Q6AXI7	acads	0.270	0.029
Q8AY63	ckbb	-0.177	0.029
A0A8M9QEI5	mapta	-0.096	0.029
A0A8M1NZC1	si:dkey-183c16.5	0.354	0.030
Q6NYT9	otx5	-0.176	0.030
A0A8N7V044	si:busml-132m23.1	0.390	0.030
Q8JHI7	cct3	0.193	0.031
Q6PE26	calr3a	-0.220	0.031
B3DFN3	lmnb2	-0.111	0.031
A0A8M3AXM5	LOC792627	-0.215	0.031
Q7ZVT2	pkma	0.228	0.032
B0UYN4	zgc:162944	-0.285	0.032
Q568Q7	stmn1b	-0.167	0.033
A0A8M2BAV2	upf1	0.229	0.033
Q8UVG7	fabp3	-0.336	0.033
Q8JGS9	rps18	0.189	0.033
F1QB54	pabpc1a	-0.200	0.034
A3KMH5	hadhab	0.341	0.035
Q6P038	hmga2	0.403	0.035
A0A8M9QKG2	ttn.2	0.513	0.035
Q90X38	gpkow	0.270	0.036
Q803T6	sh3gl2a	-0.173	0.036
A0A8M1RK21	aldh1l2	0.773	0.036
A0A8M2BBH0	gfap	-0.092	0.037
Q9PVK5	ldha	0.390	0.037
Q6PFL9	txndc5	-0.235	0.037
Q4U0S5	paf1	-0.191	0.038
B1WB51	hypk	-0.243	0.038
Q6PC53	ppiab	-0.226	0.038
A0A8M2B3E7	si:dkeyp-121d4.3	0.456	0.038
B7ZV62	nsfa	0.226	0.038
F1QDY2	ugp2b	0.211	0.039
F1Q5S2	proza	0.340	0.040
Q29R96	zgc:136930	-0.297	0.040
A0A8M9QAI4	nasp	-0.257	0.041
A0A8N7TCS4	gnpda2	-0.212	0.041
Q5BKV9	rpl9	0.266	0.041
A0A8M9Q6F6	tacc1	0.270	0.042
Q6DHT4	aldh6a1	0.230	0.042
Q66HX8	gdap2	-0.127	0.043
A0A8M2BHX5	lztfl1	0.522	0.043
Q802C9	EIF4A1A	0.198	0.043
Q7SYD3	actn3a	0.305	0.043
Q6NYJ1	lasp1	-0.220	0.043
Q6IQL7	ppid	-0.251	0.044

Q6NV32	ptmaa	-0.257	0.044
A0A8M3ATG7	serbpl1a	-0.145	0.044
Q1LUI2	hdcc2	-0.233	0.045
Q803K8	creb1a	-0.276	0.046
F1QGW6	eif2s3	0.230	0.046
A0A8M2B227	coll1a1b	-0.140	0.046
Q7ZUK2	gtf2a1	-0.399	0.046
Q9IAD3	nme2b.1	-0.130	0.048
A0A8M9QB34	asph	-0.213	0.049
A0A8M9P6W4	LOC103910005	0.540	0.049
Q568D0	histh111	0.482	0.049
O57521	hsp90ab1	0.256	0.050
PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS NO PROTEOMA DAS LARVAS DE <i>D. rerio</i> EXPOSTAS À DELTAMETRINA			
PROTEIN ID	GENE	FOLD CHANGE	P VALUE
A0A8M2B557	si:ch211-125o16.4	0.134	0.003
A0A8M2BBY9	sox5	0.131	0.004
Q08CQ0	zgc:152830	-0.496	0.005
Q63ZW0	gca	0.459	0.007
A0A8M3B0N4	sh2b2	0.553	0.007
Q6GMK3	rgcc	-0.344	0.008
A0A8N7V0N1	serpina11	-0.126	0.009
Q3YA99	itgb1b.1	0.435	0.009
Q5PRB9	ptgr1.1	-0.271	0.011
Q5RKM3	stip1	-0.144	0.012
A0A8M1P8Y9	znf408	0.415	0.012
Q803G0	erlec1	0.143	0.013
A0A8M1RF07	cep170ab	0.650	0.014
A0A8M1REK0	cetn4	-0.437	0.015
A0A8M2BL16	zgc:153397	-0.188	0.016
F1QFJ8	hnrnph11	-0.507	0.016
Q7ZUS2	nucb2b	-0.385	0.017
Q6DRF3	psmb1	-0.508	0.018
A0A8M9QHJ0	hnrnpa1a	-0.241	0.019
Q7ZUP0	anp32a	-0.363	0.019
Q6PFV1	arpp19a	0.182	0.021
A3KPZ9	si:ch211-152p11.4	0.444	0.021
F1QVC6	srsf9	-0.315	0.022
A3QK39	cb585	-0.150	0.025
Q7SXP4	srsf1a	-0.238	0.025
Q7ZUG0	snrpe	0.388	0.025
REV__A0A8M1PHT9	fc01g05	0.694	0.026
Q6DGU4	nedd81	-0.207	0.027
X1WBQ1	wdr53	0.589	0.028
Q6PC90	rps12	-0.602	0.029
A5WVX0	itpa	0.183	0.031

A0A8M1P4H7	si:dkey-4e7.3	0.231	0.031
Q7ZSY6	mt2	0.553	0.033
Q0P4B3	nucb1	-0.126	0.033
B3DJV8	cenps	-0.463	0.035
Q7SYK7	got2a	-0.518	0.036
A0A8M1P500	ist1	0.170	0.036
A0A8M1NXX7	eif3f	-0.248	0.037
A0A8M1NA95	hmg20b	-0.481	0.037
Q6P0J0	ppp1r2	-0.394	0.037
A0JMK6	scg2b	0.220	0.037
Q7SZQ8	ptges3a	0.203	0.039
Q92005	eefla11	-0.155	0.040
Q7ZU99	vcp	-0.193	0.040
Q6NX08	wdr12	0.308	0.040
Q7ZUG5	rps21	-0.163	0.041
A0A8M3AHX3	cstf2	0.229	0.042
A8WFZ2	nup62l	-0.244	0.042
Q7ZU55	ctbp1	0.244	0.043
A0A8M1RKK4	znf318	0.241	0.043
A0A8M1N2Z2	SMRT	0.322	0.043
A0A8N7UVR9	zc3h6	0.303	0.044
Q90YS5	lyz	-0.449	0.045
Q803W0	ddx39ab	0.321	0.045
Q6P020	mapre1a	-0.318	0.045
Q0ZBR7	mif	-2.090	0.047
A0A8M9QAZ9	optn	0.215	0.048
Q6PHJ8	myl12.1	-0.198	0.048
Q803H1	rbm39a	-0.466	0.049
CON__P13647	CON__P13647	1.222	0.049
Q503E6	Ezra	0.355	0.049
Q8JH70	Aldocb	0.132	0.050

