

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU**

**ESTUDO METALOPROTEÔMICO EM AMOSTRAS DE TECIDO
MUSCULAR DE TILÁPIA DO NILO ALIMENTADAS COM FONTES DE
ZINCO ORGÂNICO E INORGÂNICO**

PAULA MONTEIRO DE LIMA

Tese apresentada ao Programa
de Pós-graduação em Zootecnia
como parte das exigências para
obtenção do título de Doutor

**BOTUCATU – SP
Janeiro - 2014**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU**

**ESTUDO METALOPROTEÔMICO EM AMOSTRAS DE TECIDO
MUSCULAR DE TILÁPIA DO NILO ALIMENTADAS COM FONTES DE
ZINCO ORGÂNICO E INORGÂNICO**

PAULA MONTEIRO DE LIMA

Zootecnista

ORIENTADOR: Prof. Dr. PEDRO DE MAGALHÃES PADILHA

COORIENTADOR: Prof. Dr. LUIZ EDIVALDO PEZZATO

Tese apresentada ao Programa
de Pós-graduação em Zootecnia
como parte das exigências para
obtenção do título de Doutor

BOTUCATU – SP

Janeiro - 2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

L732e Lima, Paula Monteiro de, 1983-
Estudo metaloproteômico em amostras de tecido muscular de tilápia do Nilo alimentadas com fontes de zinco orgânico e inorgânico / Paula Monteiro de Lima. - Botucatu : [s.n.], 2014
xvii, 137 f. : tabs., grafs., ils. color.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2014
Orientador: Pedro de Magalhães Padilha
Coorientador: Luiz Edivaldo Pezzato
Inclui bibliografia

1. Proteômica. 2. Tilápia-do-Nilo. 3. Eletroforese bidimensional. 4. Espectrometria atômica. 5. Espectrometria de massa. 6. Zinco. I. Padilha, Pedro de Magalhães. II. Pezzato, Luiz Edivaldo. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. IV. Título.

Há várias maneiras de sonhar. Uma é abandonar-se aos sonhos, sem procurar torná-los nítidos, deixar-se ir no vago e no crepúsculo das suas sensações. É inferior e cansa, porque esse modo de sonhar é monótono, sempre o mesmo. Há o sonho nítido e dirigido, mas aí o esforço em dirigir o sonho trai o artifício demasiadamente. O artista supremo, o sonhador como eu o sou, tem só o esforço de querer que o sonho seja tal, que tome tais caprichos... e ele desenrola-se diante dele assim como ele o desejaria, mas não poderia conceber, se fatigaria de fazê-lo. (...) Porque eu cheguei a esta vitória sobre o que sonho – que os meus sonhos trazem-me inesperadamente o que eu quero.(...) Deslumbra-me o excesso de imaginação que desconhecia em mim e vou vendo. Deixo os sonhos ir... Tenho-os tão puros que eles excedem sempre o que eu espero deles. São sempre mais belos do que eu quero. Mas isto só o sonhador aperfeiçoado pode esperar obter. Tenho levado anos a buscar sonhadoramente isto. (...)

A melhor maneira de começar a sonhar é mediante livros.

(Fernando Pessoa, 1935, p. 454)

*Aos meus pais Sérgio e Olga,
Pela criação, educação, proteção,
Por serem os grandes alicerces da nossa estrutura familiar
Minha eterna gratidão, admiração e respeito.*

*Aos meus irmãos Thaís e Lucas,
Pelo cuidado de sempre,
Pela parceria,
e acolhimento.*

*A vocês, minha família,
Não só pela torcida como pela intensa participação de cada etapa atingida,
Pelo conforto, apoio e por serem a minha fortaleza.
Pelos sonhos compartilhados
E pela concretização deles.
Amo vocês!!*

DEDICO

Agradecimentos

A Deus, pela minha família, proteção e iluminação dos meus caminhos permitindo realizar mais uma etapa. Agradeço por esta conquista.

Aos meus pais Sérgio e Olga, que abriram mão de muitos sonhos para a realização dos meus.

Aos meus irmãos Thaís e Lucas, que estiveram presentes em todos os momentos da realização deste trabalho, me fortalecendo sempre e me fazendo companhia nas horas mais inusitadas do trabalho.

Ao meu namorado Augusto, pela participação mesmo à distância e auxílio nos finais de semana, pela paciência, conselhos, acolhimento e carinho.

Ao meu cunhado Ivan, pela amizade, conselhos e grande torcida.

Aos nossos cachorros Hany, Liz, Mel e Scott, pelo companheirismo de sempre, onde tornaram os dias mais divertidos.

A minha família de Piracicaba, pelo amor, carinho e torcida de sempre.

Ao meu orientador Pedro, pela oportunidade, confiança, amizade e ensinamentos.

Ao meu coorientador Luiz Edivaldo, pela indicação, sugestões, acolhimento, confiança e pela grande amizade.

Aos amigos do AquaNutri (Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos), Flávia, Mariucha, Jakeline, Lara, Felipe, Eric, Rafael, João, Pedro, Xuxa, Vivian, Renan e Carol, pela amizade e grande auxílio na execução das rações, preparo das instalações, no andamento do experimento e ensinamentos durante todo o período. Vocês foram muito importante.

Aos meus amigos do Laboratório: Mariana, Paula, Camila, José, Carla, Bruna, Welder, João, pelas discussões, pelas descobertas, auxílio, aprendizado e comemorações nos êxitos e diversões. Agradeço pela participação, torcida e amizade.

A professora Luciana, pelas sugestões, ensinamentos, torcida, acolhimento e amizade.

A professora Martha, pelo auxílio e ensinamentos na estatística deste trabalho, torcida e amizade.

Aos funcionários do Departamento de Química e Bioquímica: Gabriela, pela prontidão e amizade; Vânia, pela amizade, conversas, torcida e auxílio; Lourdes, Fábio e Elaine, pela amizade e colaboração; Cilene, pela amizade e ensinamentos.

Aos meus amigos: Fernanda, Alessandra, Marília, Izaias, Mariana, Flávia, por estarem sempre presentes, pelo acolhimento, carinho, torcida e eterna amizade; Berne, Bolor, Jaca, Thaila, K-Xu, Fozzi, que mesmo distantes sempre torceram por mim.

À FAPESP, pela concessão da bolsa de estudo e ao CNPQ pelo auxílio financeiro.

E a todos que contribuíram de certa forma para a realização deste trabalho,

Muito Obrigada!

Sumário

Capítulo I – Revisão de Literatura	1
1.Considerações Iniciais	2
1.1.Metaloproteínas de zinco	5
1.2.Especiação química	6
1.3.Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite	6
1.4.Zinco	10
1.5. Minerais Quelatados	12
1.6.Zinco orgânico x Zinco Inorgânico	13
1.7.Espectrometria de Massa	14
1.8 Referências	18
 Capítulo II – Determinação de zinco em amostras de tecido de tilápia do Nilo por GFAAS utilizando mineralização ácida em banho termostatizado de ultrassom	 25
 Resumo	 27
Abstract	28
1.Introdução	29
2. Material e Métodos	30
2.1. Reagentes e soluções	30
2.2. Coleta e preparo das amostras	31
2.3. Mineralização das amostras de tecido muscular	32
2.4. Determinação da concentração de zinco por GFAAS	32
2.4.1. Preparo do tubo de grafite recoberto internamente com carbetto de tungstênio	32
2.4.2 Preparo da curva analítica	33
2.4.3. Preparo dos extratos ácidos para injeção no tubo de grafite	33
2.4.4. Procedimentos analíticos	33

2.4.5. Análise estatística	34
3. Resultados e discussão	34
3.1. Otimização das condições experimentais para determinação do zinco por GFAAS	34
3.2. Obtenção da curva analítica	35
3.3. Concentração de zinco nas amostras de tecido muscular de tilápia do Nilo	35
4. Conclusões	36
5. Referências	37
Capítulo III – Utilização de estratégias bioanalíticas para fracionamento de zinco em amostras de tecido muscular de tilápia do Nilo alimentadas com dietas de fontes de zinco orgânica e inorgânica	44
Resumo	46
Abstract	47
1. Introdução	48
2. Material e Métodos	49
2.1. Dietas experimentais	49
2.2. Coleta das amostras	51
2.3. Determinação da proteína total	51
2.4. Separações eletroforéticas	52
2.5. Mineralização dos spots	53
2.6. Mapeamento/quantificação do zinco nos spots protéicos por espectrometria de absorção atômica	53
2.7. Análise estatística	54
2.8. Caracterização das proteínas por ESI MS/MS	54

3. Resultados e discussão	54
3.1. Determinação da concentração de zinco total nas amostras de tecido muscular de tilápia do Nilo	54
3.2. Determinação da concentração de proteínas totais nos extratos dos pellets protéicos	56
3.3. Otimização das separações eletroforéticas	58
3.4. Detecção e seleção dos spots	60
3.5. Concentração de zinco nos spots protéicos	61
3.6. Caracterização das proteínas	67
4. Conclusão	77
5. Referências	78
Capítulo IV – Expressão diferencial de proteínas do tecido muscular de tilápia do Nilo alimentadas com fontes orgânica e inorgânica de zinco	85
Resumo	87
Abstract	88
1. Introdução	89
2. Material e Métodos	90
2.1. Dietas experimentais	90
2.2. Coleta das amostras	91
2.3. Determinação da proteína total	92
2.4. Separações eletroforéticas	93
2.5. Tratamento de imagem e análise de expressão nos spots protéicos	94
2.6. Preparo das amostras para espectrometria de massa	94
3. Resultados e discussão	96
3.1. Expressão proteica	96
3.1.1. Análise dos spots entre os tratamentos	96
3.1.2. Análise comparativa dos grupos entre as fontes	98
3.1.3. Análise comparativa das fontes entre os grupos	103

3.2. Caracterização das proteínas	110
4. Conclusão	125
5. Referências	126
Implicações	132
Anexo – Proteínas caracterizadas por ESI MS/MS nos spots proteicos, onde o zinco foi identificado e quantificado	133

Lista de Abreviaturas

%V – volume relativo

μ SXRF - Microfluorescência de Raios X Síncrotron

2D-PAGE – two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis

ACN – acetonitrila

Ca – calico

CHAPS - 3-[(3- cloroamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato

CRIP – proteína intestinal

Da - dalton

DNA - ácido desoxirribonucleico

DORM-4 - Padrão certificado de proteína de peixe contendo valor certificado de Zn

DTT - 1,4-ditiotreitol

EROs - Espécies reativas de oxigênio

ESI - Ionização por electrospray

ESI MS – Electrospray ionization mass spectrometry

ESI MS/MS – Electrospray ionization tandem mass spectrometry

Fe – ferro

GFAAS - Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry

I – iodo

ICP MS - Inductively Coupled Mass Spectrometry

ICP OES - Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry

IOF - isofocalização elétrica

kDa - quilodalton

LC - Liquid Chromatography

LOD - limites de detecção

LOQ - de quantificação

m/z - razão massa/carga

MALDI - Ionização por desorção a laser assistida por matriz

Mg – magnésio

MM – massa molar

NaOH – hidróxido de sódio

P – fósforo

Pd(II) – Nitrato de paládio

pI – ponto isoelétrico

ppb – parte por bilhão

RNA - ácido ribonucleico

SDS - Dodecil Sulfato de Sódio

Se - selênio

STPF - Stabilized Temperature Platform Furnace

TEMED - N,N',N,N'-tetrametilenodiamina

THGA - Transversely-Heated Graphite Atomizer

v/v – razão volume/volume

Zn - zinco

Zn – zinco

Zn-AA - complexo zinco-aminoácido

ZnO - óxido de zinco; zinco orgânico

ZnSO₄ - sulfato de zinco

ZnSO₄.H₂O – sulfato de zinco monohidratado

Lista de Tabelas

Capítulo II

Tabela. 1. Composição das dietas experimentais	42
Tabela. 2. Concentração de zinco total no tecido muscular de tilápia considerando os tratamentos utilizados com diferentes concentrações de zinco e no padrão certificado	43

Capítulo III

Tabela 1. Composição das dietas experimentais	50
Tabela 2. Concentração de zinco total no tecido muscular de tilápia considerando os tratamentos utilizados no experimento	55
Tabela 3. Concentração de proteína total obtida nos <i>pellets</i> de cada tratamento ...	57
Tabela 4. Análise de correlação entre as repetições dos géis de poliacrilamida a 12.5% do músculo de tilápia do Nilo obtidos nos tratamentos	59
Tabela 5. Concentração do zinco nos spots para os tratamentos	62
Tabela 6. Concentração de zinco nos spots protéicos separadas de acordo com as fontes	64
Tabela 7. Concentração de zinco nos spots protéicos separadas de acordo com o grupo	66
Tabela 8. Proteínas identificadas pó ESI MS/MS em amostras de tecido muscular dos três grupos de peixes alimentados com zinco controle, orgânico e inorgânico.	68

Capítulo IV

Tabela 1. Composição das dietas experimentais	91
Tabela 2. Razão dos spots protéicos com porcentagens de alterações de volume entre os diferentes grupos	108
Tabela 3. Concentração de zinco nos spots diferencialmente expressos	109
Tabela 4. Proteínas diferencialmente expressas entre os tratamentos caracterizadas por ESI MS/MS	112

Lista de Figuras

Capítulo I

Figura 1. Etapas de secagem das amostras no programa de aquecimento para determinação por GFAAS	7
Figura 2. Etapas de pirólise das amostras no programa de aquecimento para determinação por GFAAS	7
Figura 3. Etapa de atomização das amostras no programa de aquecimento para determinação por GFAAS.....	8
Figura 4. Etapas envolvidas no programa de aquecimento para determinação de metais/metaloídes por GFAAS	8
Figura 5. Ilustração do processo de formação de íons em uma fonte <i>electrospray</i> .	15

Capítulo II

Figura 1. Curvas de temperatura de pirólise dos extratos ácidos das amostras de tecido muscular de tilápia do Nilo e de padrão contendo $0,50 \mu\text{g L}^{-1}$ de zinco.....	39
Figura 2. Curvas de temperatura de atomização dos extratos ácidos das amostras de tecido muscular de tilápia do Nilo e do padrão contendo $0,50 \mu\text{g L}^{-1}$ de zinco..	40
Figura 3. Curva analítica obtida a partir de soluções padrão aquosas contendo 0,20, 0,40, 0,60, 0,80 e $1,00 \mu\text{g L}^{-1}$ de zinco.....	41

Capítulo III

Figura 1 . Curva analítica utilizada na determinação de proteína total nos extratos dos pellets proteicos	57
Figura 2 .Exemplos dos géis de poliacrilamida a 12,5% do músculo de tilápia do Nilo obtidos nos tratamentos	59
Figura 3. (A) Tratamento da imagem do gel de poliacrilamida ; (B) visualização de dois spots selecionados em 3D	61
Figura 4. Spots proteicos do tecido muscular de tilápia do Nilo onde o zinco foi identificado	63
Figura 5. Concentração de zinco nos spots destacados dos peixes dos grupos 1, 2 e 3	65

Figura 6. Concentração de zinco nos spots destacados dos animais alimentados com ZnC, ZnO e ZnI	66
---	----

Capítulo IV

Figura 1. Correlação entre o volume normalizado (%V) dos spots presentes nos géis T2O e T2I	96
Figura 2. Histograma de distribuição dos spots proteicos por ponto isoelétrico (pI) nos géis dos diferentes tratamentos dos grupos experimentais	97
Figura 3. Histograma de distribuição dos spots proteicos por massa molar (MM) nos géis dos diferentes tratamentos dos grupos experimentais	98
Figura 4. Gel representativo contendo spots em comum aos dois tratamentos do grupo 1 sobrepostos	99
Figura 5. Os spots circulados apresentam diferença de expressão entre os tratamentos 1C e 1O.....	99
Figura 6. Gel representativo contendo spots em comum aos dois tratamentos do grupo 1 sobrepostos	100
Figura 7. Os spots circulados apresentam diferença de expressão entre os tratamentos 1C e 1I	100
Figura 8. Gel representativo contendo spots em comum aos tratamentos do grupo 2 (2Cx2O; 2Cx2I; 2Ox2I)	101
Figura 9. Spot 1209 diferencialmente expresso entre os tratamentos 2Cx2I	101
Figura 10. Spot 1402 diferencialmente expresso entre os tratamentos 2Ox2I	101
Figura 11. Gel representativo contendo spots em comum aos tratamentos do grupo 3 sobrepostos (3Cx3O; 3Cx3I; 3Ox3I)	102
Figura 12. Spots circulados que apresentaram diferença de expressão entre os tratamentos 3Cx3O	103
Figura 13. Spots circulados que apresentaram diferença de expressão entre os tratamentos 3Cx3I	103
Figura 14. Spot 1394 destacado por apresentar diferença de expressão entre os tratamentos 1Ox3O	104

Figura 15. Spots diferencialmente expressos entre os tratamentos 1Ox2O	104
Figura 16. Spot 1405 diferencialmente expresso entre os tratamentos 3Ox2O	105
Figura 17. Spots circulados que apresentaram diferença de expressão entre os tratamentos 1Ix3I	105
Figura 18. Spots circulados identificados por diferença de expressão entre os tratamentos 1Ix2I	105
Figura 19. Spots destacados por apresentarem diferença de expressão entre os tratamentos 3Ix2I	106
Figura 20. Spots destacados por apresentarem diferença de expressão entre os tratamentos 1Cx3C	106
Figura 21. Spots diferencialmente expressos entre os tratamentos 1Cx2C	107
Figura 22. Diferença de expressão dos spots entre os tratamentos 3Cx2C	107
Figura 23. Proteínas diferencialmente expressas no tecido muscular de tilápia do Nilo, caracterizadas por ESI MS/MS	111
Figura 24. Correlação metabólica das principais proteínas diferencialmente expressas, englobando processos de síntese proteica e vias de obtenção de energia	124

CAPÍTULO I

REVISÃO DE LITERATURA

1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

As novas ferramentas para o estudo do metabolismo incluem a genômica, a proteômica, a metabolômica e as ferramentas modernas da bioinformática. Serão estas as forças motrizes capazes de integrar na comunidade científica conhecimentos sobre ligações entre o que somos e o que comemos [1].

A biologia de sistemas informa sobre as vias metabólicas, permitindo o monitoramento de variações resultantes dos efeitos nutricionais e a sua integração na investigação nutricional, conduzindo ao desenvolvimento da genômica nutricional, ou nutrigenômica, que aborda o modo como a alimentação influencia a transcrição genética, a expressão proteica e o metabolismo [2-4]. Por sua vez, a genética nutricional, ou nutrigenética, tenta compreender a relação entre a genética e a dieta [5-8]. A nutrigenômica e a nutrigenética são, portanto, duas áreas com abordagens diferentes, mas ambas objetivam a compreensão da interação entre a alimentação e os genes, e da forma como a alimentação modula os mecanismos moleculares [9]. O sequenciamento genético é, portanto, apenas o primeiro passo na compreensão dos organismos em nível molecular e, a maioria das perguntas permanece sem resposta [10].

Contudo, muitas informações não podem ser obtidas somente por estudos genômicos, como elucidar doenças, envelhecimento e efeitos ambientais, porque a proteômica permite que as proteínas modificadas possam ser caracterizadas e as drogas alvo identificadas, ou seja, cientistas acreditam que as respostas não serão fornecidas somente pela genética, pois são as proteínas que determinam as transformações químicas dentro da célula [11].

Portanto, ao contrário do genoma, que é praticamente constante, o conjunto de proteínas expresso por um determinado organismo, ou seu proteoma, permite compreender os efeitos estruturais e funcionais causados por fatores ambientais, incluindo a nutrição [12]. Assim, o mesmo organismo pode apresentar diferentes proteomas, que são resultados da expressão de um conjunto de genes e das modificações pós-tradução das proteínas sintetizadas, em resposta às condições ambientais definidas [13].

Se proteoma é o conjunto de todas as proteínas expressas por um genoma, é importante saber de que maneira essas proteínas intervêm nos processos biológicos e

como elas interagem entre si [14]. Nesse contexto, os estudos proteômicos podem ser de caráter: expressivo, onde a expressão das proteínas é comparada entre as amostras [15]; estrutural, onde o objetivo é mapear as estruturas proteicas/complexos em uma organela celular específica [16]; e funcional, podendo isolar as proteínas, caracterizá-las e aplicar suas informações [15].

Cada vez mais plataformas tecnológicas têm sido utilizadas nas mais diversas áreas científicas e com o aumento da demanda da produção de peixes juvenis, a tecnologia OMICS (como *genomics*, *proteomics* e *metalomics*), passou a ser implementada na aquicultura. A proteômica tem sido considerada uma importante ferramenta no entendimento da biologia da piscicultura, auxiliando para atingir alta produtividade e melhor qualidade do produto [17].

Aquicultura é o setor de produção que tem crescido de maneira significativa nos últimos 50 anos, aumentando a produção de 1 milhão de toneladas a 51,7 milhões, [6] o que acaba refletindo em um interesse maior em estudos proteômicos. Além disso os peixes têm se tornado cada vez mais foco de trabalhos, pelo aumento da sua participação nas dietas humanas proporcionando cerca de 40% de proteína consumida pela população mundial, visando a saúde humana [18-21].

No caso do salmão do Atlântico e truta rainbow, os estudos proteômicos são voltados para: o aumento de produção; diminuição de infecções, levando em consideração o estresse causado por densidade; manuseio e na alimentação dos mesmos [21-24]. No bagre do canal estão direcionados: resistência às doenças [25]; qualidade dos gametas; componentes da dieta; desenvolvimento e crescimento de alevinos. Em trutas: análise das proteínas relacionadas com a diminuição da viabilidade dos ovos [26] e perfil proteico do fígado quando alimentadas com diferentes dietas contendo proporções distintas de ingredientes [27].

A utilização da proteômica na investigação com peixes é recente, ainda que já existam alguns estudos na área da nutrição. Estes trabalhos permitiram já identificar múltiplas alterações metabólicas em resposta a fatores nutricionais, tais como a variação no conteúdo energético ou a inclusão de fontes de proteína vegetal nas dietas de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) [28-30].

E para esses fins, na década passada algumas pesquisas envolvendo nutrição de peixes, não visam maximizar o crescimento, mas sim ter alta produção de ovos com

larvas viáveis [31]. Porém, existe uma grande e complexa interação entre os processos metabólicos e as vias afetadas pela nutrição, devido aos processos de regulação dos genes e a variação de proteínas nos diversos tecidos onde estão relacionados com os componentes da dieta e conseqüentemente com o crescimento. Dessa forma, os processos envolvidos na modulação de aglomerados proteicos ou órgãos em resposta a determinados estímulos ambientais ou dietéticos, têm sido estudados por meio da proteômica [28, 32]. Considerando que o perfil proteico dos tecidos se altera de acordo com a nutrição, conseqüentemente as vias metabólicas também serão alteradas, o que faz com que exista uma relação muito próxima entre a proteômica e a metabolômica [33].

Para chegar à real função dos genes, os sistemas biológicos devem ser analisados em diferentes níveis de controle – através de parâmetros externos (ambiente, o estágio de desenvolvimento, os sinais moleculares, etc.) e de parâmetros internos [transcrição e degradação de ácido ribonucleico mensageiro (RNAm), modificação pós-tradução, dinâmica proteica e concentrações e fluxos de metabólitos]. A metabolômica, ou seja, a identificação e quantificação de todos os metabólitos de baixo peso molecular numa amostra biológica (metaboloma) desempenha um papel fundamental em toda esta análise [10].

Considerando que as biomoléculas ligadas a metais e metalóides constituam uma porção substancial nas moléculas envolvidas no comportamento e metabolismo celular, e que a identificação de um cofator metálico pode auxiliar a definir a função proteica, uma nova área, denominada metalômica, começou a se destacar nesses estudos no início da década atual [34].

Aproximadamente 25 elementos da tabela periódica são requeridos pela maioria dos sistemas biológicos [35]. Sendo que mais de 30% de todas as proteínas exploram um ou mais minerais para desempenhar sua função específica, e 40% de todas as enzimas contém cátions metálicos [35, 36].

1.1. Metaloproteínas de Zinco

O zinco ligado às proteínas participa no estabelecimento permanente e na modulação transitória das interações entre proteínas, exercendo funções catalíticas e inibitórias enzimáticas, arranjos e desarranjos de complexos de subunidades macromoleculares e formação de proteína/receptor complexo [37, 38]. Participa também na estabilização de membranas e interage com outros cátions bivalentes, sendo um composto que forma a maioria das metaloproteínas [39]. Estas, por apresentar uma ligação estável com proteínas, necessita de um ou mais átomos de zinco para exercer funções catalíticas, co-catalíticas e estruturais [40].

Na função catalítica, o elemento é essencial na catálise enzimática, conferindo de fato função à proteína, diferentemente da co-catalítica que pode ou não potencializar a catálise, dependendo do número de átomos associados [40].

Devido à grande versatilidade de suas características físico-químicas, o zinco tornou-se um foco de investigação nos processos de controle da expressão gênica e outros mecanismos biológicos [40].

Metaloenzimas de zinco são reconhecidas em todos os seis tipos de enzimas, na qual incluem óxido redutases (catalisando óxido reduções entre dois substratos), transferases (catalisando a transferência de um grupo exceto hidrogênio), hidrolases (catalisando a hidrólise de ésteres, éter, peptídeo, ácido anidro, C – C, C – haleto), liases (catalisando a remoção de grupos a partir de substratos por mecanismos que quebram duplas ligações), isomerases (catalisando a conversão de isômeros ópticos, geométricos ou de posição), e ligases (catalisando a quebra de uma interligação pirofosfato em ATP ou composto similar) [41]. Encontram-se distribuídas em todos os tecidos do organismo exercendo funções importantes, entre as quais se destacam a síntese e degradação de carboidratos, lipídios e proteínas, sendo importantes também no funcionamento adequado do sistema imunológico, da transcrição e da tradução de polinucleotídeos [42].

Numerosas enzimas associadas à síntese de DNA e RNA são metaloenzimas dependentes de zinco, incluindo a RNA polimerase, transcriptase reversa e fator de transcrição IIIA. Nestas enzimas, o zinco está firmemente ligado, estabilizando estruturas que são funcionalmente importantes. Por outro lado, o zinco também pode

influenciar a regulação hormonal da divisão celular, especialmente no GH e IGF-I, além de interferir em hormônios mitogênicos, atuando sobre a proliferação celular [30].

As propriedades antioxidantes do zinco são explicadas pelo seu papel na regulação da síntese da metalotioneína, na estrutura da enzima superóxido dismutase e na proteção de agrupamentos sulfidril de proteínas de membranas celulares, onde promove a inibição da produção de EROs (Espécies reativas de oxigênio) por antagonismo com metais pró-oxidantes, como ferro e cobre. Estudos têm demonstrado que a fragilidade osmótica de eritrócitos está relacionada à função desse mineral na membrana celular [43].

1.2. Especiação química

Define-se análise de especiação como atividade analítica de identificar e/ou quantificar uma ou mais espécies químicas individuais em uma amostra de caráter ambiental, geoquímico, bioquímico, toxicológico e nutricional, devendo-se considerar o nível estrutural de cada elemento químico e a determinação da composição nuclear eletrônica ou estado de oxidação, de complexos e compostos orgânicos, inorgânicos, organometálicos e complexos macromoleculares [44].

Os estudos de especiação necessitam de técnicas com sistema sensível de detecção, podendo ser dois tipos de acoplamentos separador-detector: (1) acoplamentos on-line de técnicas com colunas de separação como cromatografia líquida (LC, *Liquid Chromatography*) ou eletroforese capilar, acoplado a detectores como espectrometria óptica de emissão com plasma de argônio induzido (ICP OES, *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*) ou espectrometria de massa com plasma de argônio induzido (ICP MS, *Inductively Coupled Mass Spectrometry*), e (2) separação off-line por gradiente de eletroforese em gel ou isoeletrica e detecção pelas técnicas anteriormente citadas ou por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS, *Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry*) [45].

1.3. Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite

Nas determinações por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite, a amostra é introduzida por uma micropipeta ou um amostrador automático no tubo de grafite através de um orifício no tubo. A amostra pode ser injetada no tubo, caindo

diretamente em sua parede ou sobre uma plataforma de L'vov presente na parte inferior do tubo. Dentre as diferentes configurações de tubos de grafite, a THGA (Transversely-Heated Graphite Atomizer) é uma das mais utilizadas, pois permite uma distribuição uniforme da temperatura ao longo do tubo de grafite, reduzindo eventuais condensações nas extremidades do tubo, o que diminuiria a sensibilidade. A GFAAS permite a utilização de um programa de aquecimento, pré-definido, que submete a amostra injetada no tubo de grafite a diferentes ciclos de temperatura e tempo. As cinco etapas básicas de aquecimento do tubo são [46-53]:

SECAGEM: etapa de eliminação do solvente, que é evaporado lentamente da amostra para evitar respingos e conseqüente perda do analito, restando apenas os resíduos sólidos (Figura 1).

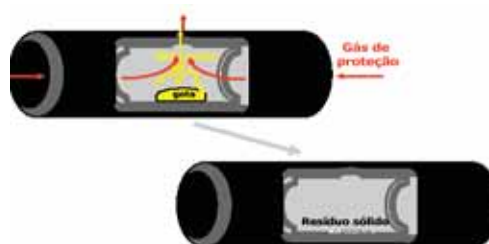


Figura 1. Etapa de secagem das amostras no programa de aquecimento para determinação por GFAAS [54]

PIRÓLISE: nesta etapa a temperatura e o tempo de pirólise devem ser ajustados para remoção da maior parte da matriz orgânica da amostra, reduzindo a interferência química e o sinal de fundo. Geralmente modificadores químicos são utilizados para estabilizar o analito a temperaturas mais altas, garantindo a eliminação da matriz sem perda do analito (Figura 2).

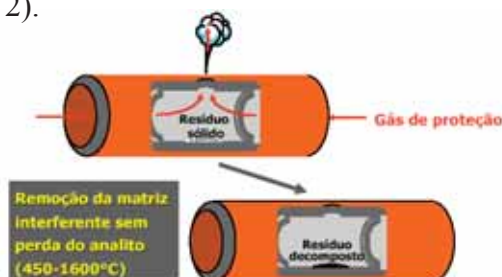


Figura 2. Etapa de pirólise das amostras no programa de aquecimento para determinação por GFAAS [54]

ATOMIZAÇÃO: etapa em que a temperatura deve ser alta o suficiente para garantir a completa e rápida atomização do analito, formando a nuvem atômica para a conseqüente medida da radiação absorvida pelo analito no estado fundamental (Figura 3)

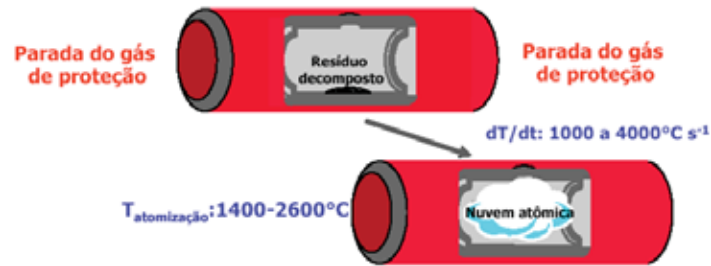


Figura 3. Etapa de atomização das amostras no programa de aquecimento para determinação por GFAAS [54]

LIMPEZA: etapa para eliminar qualquer resíduo que possa ter ficado no tubo e posteriores efeitos de memória, onde as temperaturas são elevadas a 2400-2550°C por um curto período de tempo.

RESFRIAMENTO: retorna à temperatura ambiente para introdução de uma nova amostra.

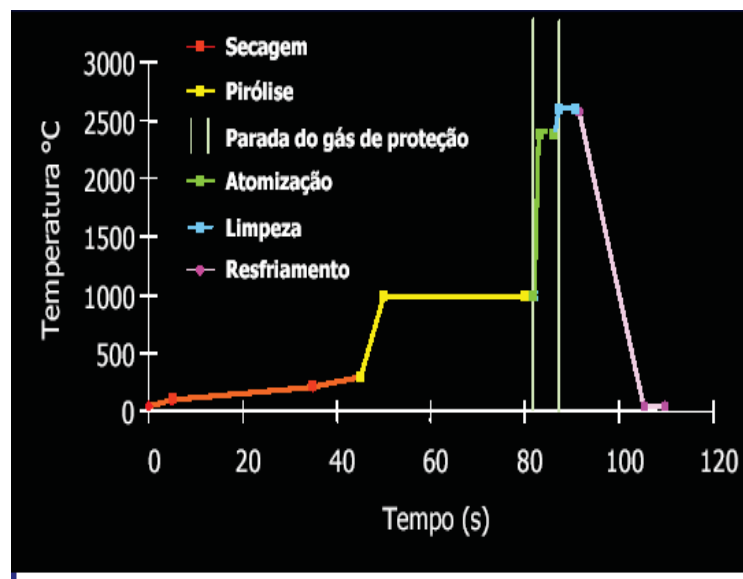


Figura 4. Etapas envolvidas no programa de aquecimento para determinação de Metais/metalóides por GFAAS [54]

Durante todo o programa de aquecimento, um fluxo externo de argônio (gás inerte) passa ao redor do tubo protegendo-o do excessivo desgaste devido às elevadas temperaturas e o contato com o oxigênio atmosférico. Ao mesmo tempo, um fluxo interno de argônio – exceto na etapa de atomização – auxilia na eliminação do ar e dos vapores formados a partir da volatilização das amostras. A Figura 4 mostra um exemplo de um programa de aquecimento com as cinco etapas envolvidas no processo de atomização do analito metálico [46-50].

Uma grande vantagem da espectrometria de absorção atômica em forno de grafite consiste na análise direta de amostras sólidas e/ou suspensões, eliminando a etapa de digestão ácida, o que reduz o tempo de análise, o custo e a contaminação, além de minimizar, consideravelmente, a exposição do analista à manipulação de ácidos concentrados. Além disso, a GFAAS apresenta outras vantagens devido a sua versatilidade, como: ação do atomizador como reator químico; obtenção de excelentes limites de detecção; separação do analito da matriz no reator; utilização de pequenos volumes de amostra; caráter multielementar; rapidez; espectro simples etc [51-54].

Entretanto, apesar de ser uma técnica bem desenvolvida e robusta, a susceptibilidade a efeitos de matriz, que pode diminuir a sensibilidade ou provocar excessivo desgaste do tubo, limita uma aplicação mais ampla desta técnica em análises de rotina. Além dos erros sistemáticos e aleatórios que podem prejudicar a exatidão e precisão dos resultados e o desempenho do método analítico em questão. Porém, estando todos os parâmetros instrumentais devidamente otimizados e se o conceito STPF (Stabilized Temperature Platform Furnace) for adotado, o desempenho analítico da técnica pode ser melhorado. O conceito STPF consiste no uso de tubos de grafite com aquecimento transversal, recoberto piroliticamente e com plataforma; uso de modificadores químicos; aquecimento rápido; fluxo de gás interno interrompido durante a atomização; sinal analítico em absorbância integrada; rápido processamento do sinal e corretor de fundo eficiente (Zeeman) [51,52].

Os erros resultantes de alterações nas variáveis instrumentais e/ou operacionais podem ser reduzidos através da padronização interna em GFAAS, minimizando erros sistemáticos e corrigindo efeitos de matriz. Os métodos de adição de padrão e de compatibilização de matriz são bem estabelecidos e conhecidos, porém, a adição de padrão demanda muito tempo nas determinações quando comparada com a calibração

externa e a compatibilização de matriz requer diluentes de elevada pureza e de composição química similar à matriz, o que é de difícil obtenção. Sendo assim, a padronização interna é uma alternativa para esses dois métodos de calibração, onde os cálculos são feitos baseados na suposição de que tanto o analito quanto o padrão interno apresentam influência similar à da matriz e que ambos são perturbados da mesma forma pelas condições instrumentais ou operacionais [53,54].

1.4. Zinco

O zinco ocorre como cinco isótopos estáveis: ^{64}Zn , ^{66}Zn , ^{67}Zn , ^{68}Zn e ^{70}Zn . Este mineral combina-se com aminoácidos, peptídeos e nucleotídeos, diferindo dos outros metais de transição por conter a camada eletrônica “d” completa; assim, não participa diretamente das reações redox, mas se comporta quimicamente como ácido de Lewis, aceitando um par de elétrons livres, o que determina sua passagem pelas membranas biológicas através de mecanismos de difusão passiva e transporte ativo [42, 43, 55].

A absorção de zinco ocorre principalmente no intestino delgado, sendo que no interior das células intestinais sua concentração é regulada pela metalotioneína e pela proteína intestinal rica em cisteína (CRIP). Dentro da célula da mucosa, a transferência do zinco é realizada através da metalotioneína, proteína produzida no fígado, cuja síntese é influenciada pelos níveis dietéticos e plasmáticos de zinco. Em baixa concentração, predomina o mecanismo mediado por carreadores, e em elevado consumo a absorção se dá por difusão passiva [56].

A quantidade desse mineral no lúmen intestinal aumenta de uma a três vezes, devido à soma entre o mineral proveniente da dieta e aquele secretado nos sucos digestivos. Não obstante, os mecanismos de absorção e excreção deste oligoelemento obedecem a sistemas de auto-regulação com alta sensibilidade, o que faz com que os reajustes nos estoques dependam da necessidade e da biodisponibilidade do íon no organismo. Dessa forma, é lícito supor que a absorção de zinco depende dos estoques corporais, sendo menor se houver quantidades razoáveis no organismo, e maior nas deficiências [57].

Após ser absorvido, o mineral é captado pelo fígado e posteriormente liberado no plasma e sítios celulares para exercer as devidas funções. Cerca de 90% do zinco é

carreado ligado à albumina e 10% à alfa-2-macroglobulina e aminoácidos para outros tecidos ligados [40, 42, 58].

O zinco é excretado nas fezes. A maior parte do zinco fecal é proveniente da dieta que não foi absorvido e, em menor quantidade, zinco de origem endógena que foi secretado dentro do intestino delgado. Do zinco fecal endógeno, $\frac{1}{4}$ é proveniente do suco pancreático e o restante deriva das secreções gastrointestinais, biliares e do ceco [59]. Além destes meios, também pode ser excretado pelo rim e pela pele [58].

A disponibilidade dos minerais do alimento depende da idade e espécie do animal, ingestão do mineral, da forma química na qual é ingerido, conteúdo e proporção de outros elementos da dieta, bem como suas interações metabólicas [60]. Diferença considerada pode ser observada quanto à disponibilidade de um mineral proveniente de fontes diferentes [61].

No alimento, admite-se que a presença de zinco não é indicativa de sua biodisponibilidade [56]. Fatores antinutricionais presentes na dieta podem interagir com o zinco, complexando-o e afetando sua biodisponibilidade. A presença de fitatos e outros íons no alimento limitam a utilização do zinco, devido à formação de quelatos indigeríveis, o que ocorre em condições normais de alimentação.

Frações expressivas do zinco presente no milho e farelo de soja encontram-se indisponíveis nas dietas de frango de corte em função da presença de fatores antinutricionais, como o ácido fítico. Dentre os fatores antinutricionais de maior destaque na alimentação dos monogástricos, o fitato tem recebido atenção devido à sua ação formadora de compostos insolúveis com o zinco, cálcio e íons bivalentes. Aminoácidos como a histidina e cisteína, e outras substâncias, podem agir, facilitando a absorção, aumentando a disponibilidade de zinco [62].

Minerais traços isolados com aminoácidos ou complexo de polissacarídeo têm disponibilidade biológica, estabilidades e solubilidades mais altas, necessitando de uma interação com vitaminas e outros íons, sendo efetivas a baixos níveis [63].

1.5. Minerais Quelatados

Quelatados são compostos formados por íons metálicos sequestrados por aminoácidos, peptídeos ou complexos polissacarídeos que proporcionam a esses íons alta disponibilidade biológica, alta estabilidade e solubilidade. Portanto, o uso do termo “quelato” é adequado, por ser uma palavra proveniente do grego “*chele*”, que significa “garra”, o que descreve a maneira na qual os íons metálicos polivalentes são ligados a compostos orgânicos ou sintéticos [64]. Após a hidrólise de uma fonte proteica e a exposição do elemento mineral ao hidrolisado, resulta na formação de complexos íons metálicos quelatados [65].

Estes possuem uma maior estabilidade elétrica no lúmen intestinal, portanto apresentam melhor biodisponibilidade quando comparada aos minerais convencionais [66].

Os quelatos, ou “minerais orgânicos” são moléculas formadas pela ligação de um íon metálico a um carreador orgânico como aminoácido ou carboidrato, por ligações covalentes, através de seus grupos amino ou oxigênio, permitindo que o produto tenha carga elétrica praticamente nula [67].

Os minerais orgânicos podem ser definidos segundo a “*Association of American Feed Control Officials*” em cinco classes [68]:

- *Complexo metal – aminoácido específico*: produto resultante da reação de um sal metálico solúvel com um aminoácido específico;

- *Complexo metal – aminoácido*: produto resultante da complexação de um sal metálico solúvel com aminoácidos;

- *Quelato metal – aminoácido*: produto resultante da reação de um íon metálico de um sal solúvel com aminoácidos em uma reação molar de um mol de metal para um a três mols de aminoácidos, formando ligações coordenadas, onde a massa molar do quelato hidrolizado não deve ultrapassar 88 Da;

- *Metal proteinado*: produto resultante da quelação de um sal solúvel com uma proteína ou aminoácidos parcialmente hidrolisados;

- *Complexo metal – polissacarídeo*: produto resultante da complexação de um sal solúvel com uma solução de polissacarídeos declarado com um ingrediente do complexo específico.

1.6. Zinco Orgânico x Zinco Inorgânico

A forma química da fonte mineral influencia a biodisponibilidade do elemento para o organismo, em se tratando de inorgânica ou orgânica [69].

As concentrações de zinco em diferentes tecidos como fígado, músculo, ossos, rins e no soro/plasma sanguíneo têm sido os critérios de avaliação mais utilizados para determinar a biodisponibilidade desse mineral em diferentes fontes [70].

Estudos conduzidos com fontes de óxido de zinco (ZnO) e complexo zinco-aminoácido (Zn-AA) com tilápia do Nilo, a fonte orgânica acarretou pior desempenho produtivo nos peixes estudados. Além disso, a suplementação das dietas com mais de 150mg Zn/kg, para quaisquer das fontes suplementares de zinco testadas, prejudicou a utilização da proteína da dieta pelos animais [71]. Porém, não foi encontrada diferença significativa na digestibilidade entre a suplementação de sulfato de zinco e do complexo zinco-aminoácido para a tilápia do Nilo, concluindo que as absorções dessas fontes são equivalentes [72].

Em outros trabalhos, não observaram diferença no ganho de peso e eficiência alimentar de truta arco-íris, alimentadas com fontes suplementares orgânica (zinco metionina) e inorgânica (sulfato de zinco), porém a atividade da fosfatase alcalina foi maior para os alimentados com fonte orgânica [69].

Em alguns estudos, relatou-se que a disponibilidade aparente do quelato de zinco e cobre foram de 106 e 120%, respectivamente, quando comparado com fonte inorgânica desses minerais, sulfato de zinco e sulfato de cobre [73]. Em contrapartida, demonstraram que $ZnSO_4$ e o complexo Zn-lisina foram igualmente eficientes na absorção de Zn e no crescimento em suínos jovens, verificando que as fontes orgânicas de zinco (Zn-lisina e Zn-metionina) não foram mais biodisponíveis que o sulfato de zinco para suínos desmamados [70,74].

Portanto, sua suplementação na ração apresenta respostas conflitantes nas variadas espécies, onde estudos mostraram que a inclusão dos microminerais quelatados para a tilápia, por exemplo, não apresentou diferença, ou até foram observados valores inferiores de aproveitamento, quando comparados com fontes inorgânicas.

1.7. Espectrometria de Massa

A Espectrometria de massa tem se tornado uma ferramenta essencial na química moderna, graças a sua sensibilidade, ao grande número de informações fornecidas. Os espectrômetros de massa podem ser usados em uma simples determinação da massa molar de um peptídeo, como até para uma determinação da sequência de aminoácidos, identificação de novos biomarcadores, interações proteína-proteína e caracterização de modificações pós-traducionais [75-76].

Os espectrômetros de massa consistem em uma fonte de íons, um analisador de massa, um detector de íons e uma unidade de aquisição de dados. Trata-se de um instrumento analítico capaz de converter moléculas neutras em íons na forma gasosa e separá-las de acordo com a sua razão massa/carga (m/z), utilizando campos eletromagnéticos para isso.

As técnicas de ionização mais usadas em análises de proteínas são: a MALDI (ionização por desorção a laser assistida por matriz) e a ESI (ionização por electrospray), que é empregada na elucidação da sequência peptídica e identificação da proteína correspondente [77-78].

No presente trabalho a técnica utilizada foi a ESI-MS, por apresentar alta sensibilidade e seletividade, facilidade de uso e consumo reduzido de amostra, além de pode analisar uma ampla variedade de substâncias, incluindo proteínas, ácidos nucleicos, e até mesmo complexos metálicos, desde que sejam iônicos ou apresentem sítios ácidos ou básicos [79].

No processo *electrospray* a produção de íons requer, dispersão de gotas altamente carregadas, quase à pressão atmosférica, seguida por condições que permitam a evaporação da gota. Envolve a formação de um *spray* eletrolítico, que gera pequenas gotas carregadas e destas são liberados os íons, sendo necessária uma fonte de alta tensão (1,0 a 7,0 kV) que esteja em contato com a solução contendo os eletrolíticos. Esta solução é bombeada através de um microcapilar (d.i. 50 a 100 μm) com uma velocidade de fluxo da ordem de 1 a 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ ou menores. Quando um potencial positivo é aplicado na solução, os íons positivos tendem a se afastar para uma região menos positiva, isto é, em direção ao contra-eletrodo. Conforme a densidade de carga aumenta na gota, o campo elétrico formado entre o capilar e o eletrodo aumenta provocando uma deformação na gota que está presa na ponta do capilar. A gota ganha

forma de cone e permanece “presa” ao capilar até o momento em que a densidade de carga na superfície da gota e o aumento da repulsão entre os íons vençam a tensão superficial, ocorrendo liberação de pequenas gotas com alta densidade de carga. Como resultado final, os íons tornam-se completamente dessolvatados. Pode-se presumir que a ESI envolve apenas o rompimento gradual de interações não covalentes, principalmente a remoção de moléculas de solventes [80-82]. A Figura 5 ilustra o processo que acontece em uma fonte ESI.

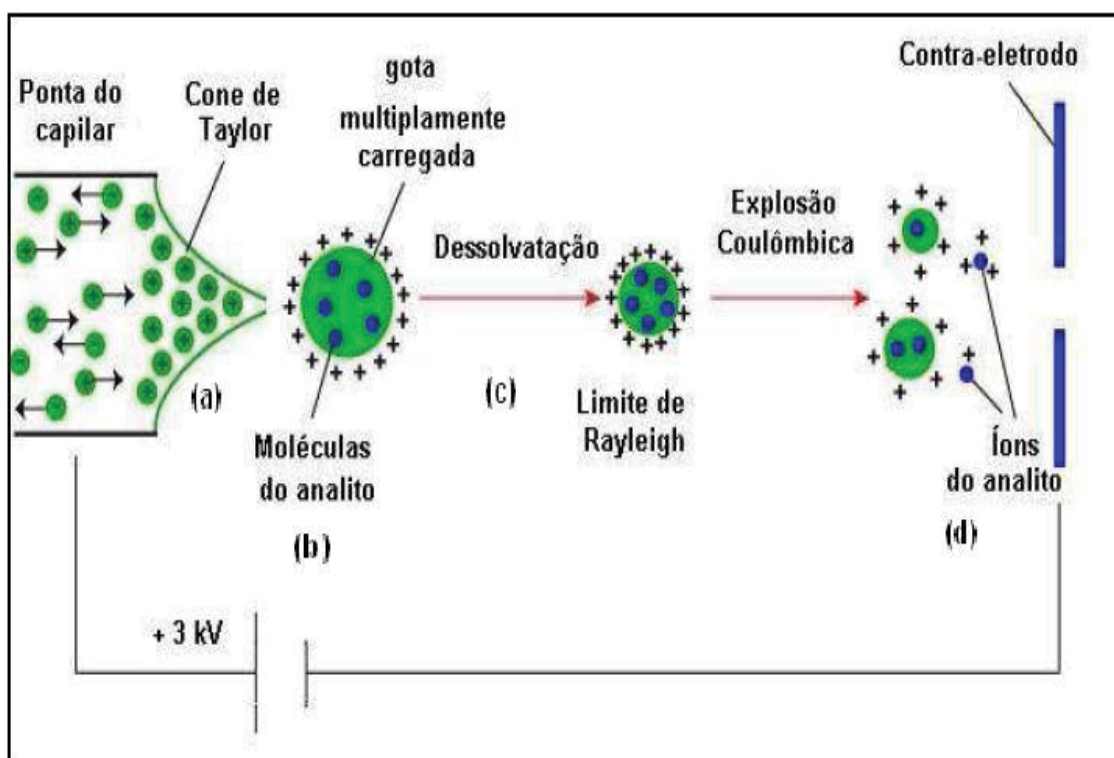


Figura 5. Ilustração do processo de formação de íons em uma fonte de *electrospray* [79].

Esta versatilidade de técnicas tem aumentado significativamente a gama de substâncias capazes de serem determinadas, possibilitando, por exemplo, que polipeptídeos possam ser analisados sem que haja sua decomposição [83].

Na etapa de preparo da amostra para o seqüenciamento por espectrometria de massas, utiliza-se a digestão proteolítica, etapa crítica onde são gerados os peptídeos com massas molares dentro da faixa de massas dos espectrômetros, sendo essencial a fragmentação feita de maneira eficiente. A tripsina é o reagente mais utilizado nos

experimentos de seqüenciamento por espectrometria de massas por ter um custo de produção relativamente baixo, por possuir uma alta atividade proteolítica, produzir peptídeos pequenos (na faixa de 600 a 2500 Da) e poder ser covalentemente modificada, de modo a minimizar os processos de autodigestão ou autólise [84].

A tripsina cliva as ligações peptídicas de proteínas após os grupos carbonila dos resíduos de lisina (K) e arginina (R), exceto quando estas ligações são com resíduos de prolina (P), ou seja, ligações K-P ou R-P [84,85].

Existem dois tipos de digestão proteolítica: em gel ou em solução. A digestão em gel é assim chamada porque a proteína é processada e digerida enquanto está contida em um *spot* de gel de poliacrilamida. Já a digestão em solução é aplicada em proteínas ou mistura de proteínas que estão presentes na solução do extrato proteico sem a utilização da separação eletroforética [86].

Na maioria das aplicações proteômicas, a digestão é feita mais adequadamente pelo tratamento da proteína em um *spot* de gel 2D-PAGE. Ao utilizar a digestão em gel, é possível estabelecer uma relação direta entre as observações feitas pelos experimentos eletroforéticos e os peptídeos digeridos [85-86]. Para a análise por espectrometria de massas, a mistura de peptídeos obtida pela digestão trípica é misturada com solução de matriz. Esta matriz é utilizada para proteger os peptídeos de uma possível fragmentação, causada pela incidência direta do feixe do laser [86].

Dessa forma, apresentam-se três pesquisas que se encontram nos capítulos II, III e IV. O Capítulo II, intitulado “Determinação de zinco em amostras de tecido de tilápia do Nilo por GFAAS utilizando mineralização ácida em banho termostaticado de ultrassom” se apresenta nas normas da Food Chemistry Methods, com objetivo de otimizar nova metodologia de mineralização ácida para posterior determinação de zinco por GFAAS utilizando combinação de modificadores químicos.

O Capítulo III, intitulado “Utilização de estratégias bioanalíticas para fracionamento de zinco em amostras de tecido muscular de tilápia do Nilo alimentadas com dietas de fontes de zinco orgânica e inorgânica”, teve por objetivo mapear e quantificar zinco por GFAAS no spots proteicos obtidos após separação das proteínas por 2D-PAGE.

O Capítulo IV, intitulado “Expressão diferencial de proteínas do tecido muscular de tilápia do Nilo alimentadas com fontes orgânica e inorgânica de zinco”, a fim de investigar e caracterizar o perfil diferencial de proteínas expressas dos tecidos musculares destes peixes.

1.8.Referências

- 1 GERMAN, J.B.; BAUMAN, D.E.; BURRIN, D.G.; FAILLA, M.L.; FREAKE, H.C.; KING, J.C.; et al. Metabolomics in the opening decade of the 21st century: building the roads to individualized health. **J Nutr.**, p.134, n.10, p.2729-32, 2004.
- 2 VAN OMMEN, B.; STIERUM, R. Nutrigenomics: exploiting systems biology in the nutrition and health arena. **Curr Opin Biotechnol.**, v.13, n.5, p.517-21, 2002.
- 3 CORTHESEY-THEULAZ, I.; DEN DUNNEN, J.T.; FERRE, P. GEURTS, J.M.W.; MULLER, M.; VAN BELZEN, N.; et al. Nutrigenomics: The impact of biomics technology on nutrition research. **Annals of Nutrition and Metabolism.**, v.49, n.6, p.355-65, 2005.
- 4 TRUJILLO, E.; DAVIS, C.; MILNER, J. Nutrigenomics, proteomics, metabolomics, and the practice of dietetics. **J Am Diet Assoc.**, v.106, n.3, p.403-13, 2006.
- 5 JAENISCH, R.; BIRD, A. Epigenetic regulation of gene expression: how the postgenomic era. **Physiol Genomics.**, v.16, n.2, p.166-77, 2004.
- 6 ORDOVAS, J.M.; CORELLA, D. Nutritional genomics. **Annu Rev Genomics Hum Genet.**, v.5, p.71-118, 2004.
- 7 SEBAT, J.; LAKSHMI, B.; TROGE, J. ALEXANDER, J.; YOUNG, J.; LUNDIN, P.; et al. Largescale copy number polymorphism in the human genome. **Science.**, 2004.
- 8 WIECZOREK, S.J.; TSONGALIS, G.J. Pharmacogenomics: will it change the field of medicine? **Clin Chim Acta.**, v.308, n.1-2, p.1-8, 2001.
- 9 KAPUT, J.; RODRIGUEZ, R.L. Nutritional genomics: the next frontier in the genome integrates intrinsic and environmental signals. **Nat Genet.**, v.33, p.245-54, 2003.
- 10 WECKWERTH, W. Metabolomics: Methods and Protocols. **New Jersey: Humana Press Inc.**, v.305, n.5683, p.525-8, 2007.
- 11 LANÇAS, F.M.; SILVA, J.C.R.; BICUDO, R.C.; NETO, M.B. A QUÍMICA ANALÍTICA DO PROTEOMA. **Revista Analytica**, Nº 06, 2003.
- 12 WILKINS M.R., SANCHEZ J.C., GOOLEY A.A., APPEL R.D., HUMPHERY-SMITH I., HOCHSTRASSER D.F., WILLIAMS K.L. Progress with proteome projects:

why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. **Biot. Genetic**, v.13, p.19-50, 1996.

13 CELIS J. E., KRUIHOFFER M., GROMOVA I., FREDERIKSEN C., OSTERGAARD M., THYKJAER T., GROMOV P., YU J., PÁLSDÓTTIR H., MAGNUSSON N. ORNTOFT T. F. Gene expression profiling: monitoring transcription and translation products using DNA microarrays and proteomics. **FEBS Lett.** v.480, p. 2-16, 2000.

14 KAZMI, S.; KRULL, I.S. Proteomics and the current state of protein separations science, Part one. **Pharma Genomics**, p.14-29, 2001.

15 GRAVES, P.R.; HAYSTEAD, T.A.J. Molecular Biologist's Guide to Proteomics. **Microbiology And Molecular Biology Reviews**, p. 39–63, 2002.

16 BLACKSTOCK, W. P., WEIR, M. P. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. **Trends Biotechnol.**, v.17, p.121–127, 1999.

17 PANDEY, A. Mann M. Proteomics to study genes and genomes. **Nature**, v.405, p.837–46, 2000.

18 AMATRUDA, J.F.; PATTON, E. Genetic Models of Cancer in Zebrafish. In: Jeon KW, editor. International Review of Cell and Molecular Biology. San Diego, CA: **Academic Press.**, p.1–34, 2008.

19 SCHMALE, M.C. Aquatic animal models of human disease. **Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol.**, v.138, p.229–31, 2004.

20 AMATRUDA, J. F., PATTON, E., Genetic Models of Cancer in Zebrafish, in: Jeon, K. W., (Ed.), International Review of Cell and Molecular Biology, **Academic Press, San Diego**, p.1–34, 2008.

21 FORNÉ, I.; ABIÁN, J.; CERDÀ, J. Fish proteome analysis: Model organisms and nonsequenced species. **Proteomics**, v.10, p.858–872, 2010.

22 LIU, X., AFONSO, L., ALTMAN, E., JOHNSON, S. et al., O-acetylation of sialic acids in N-glycans of Atlantic salmon (*Salmo salar*) serum is altered by handling stress. **Proteomics**, v.8, p.2849–2857, 2008.

23 WULFF, T., HOFFMANN, E. S., ROEPSTORFF, P., JESSEN, F., Comparison of two anoxia models in rainbow trout cells by a 2-DE and MS/MS-based proteome approach. **Proteomics**, v.8, p.2035–2044, 2008.

- 24 WULFF, T., JESSEN, F., ROEPSTORFF, P., HOFFMANN, E.S., Long term anoxia in rainbow trout investigated by 2-DE and MS/ MS. **Proteomics**, v.8, p.1009–1018, 2008.
- 25 BOOTH, N. J., BILODEAU-BOURGEOIS, L., Proteomic analysis of head kidney tissue from high and low susceptibility families of channel catfish following challenge with *Edwardsiella ictaluri*. **Fish Shellfish Immunol.**, v.26, p.193–196, 2009.
- 26 RIME, H., GUITTON, N., PINEAU, C., BONNET, E. et al., Postovulatory ageing and egg quality: A proteomic analysis of rainbow trout coelomic fluid. **Repr. Biol. Endocr.**, v.2, p.26, 2004.
- 27 MARTIN, S. A., VILHELMSSON, O., MEDALE, F., WATT, P. et al., Proteomic sensitivity to dietary manipulations in rainbow trout. **Biochim. Biophys. Acta.**, v.165, p.17–29, 2003.
- 28 MARTIN, S.A.M.; VILHELMSSON, O.; MEDALE, F.; WATT, P.; KAUSHIK, S.; HOULIHAN, D.F. Proteomic sensitivity to dietary manipulations in rainbow trout. **Biochim Biophys Acta**, v.1651, p.17–29, 2003.
- 29 VILHELMSSON, O.T.; MARTIN, S.A.M.; MEDALE, F. Dietary plant-protein substitution affects hepatic metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **British Journal of Nutrition**, v.92, p.71-80, 2004.
- 30 KOLDITZ, C.-I.; PABOEUF, P.; BORTHAIRE, M. Changes induced by dietary energy intake and divergent selection for muscle fat content in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), assessed by transcriptome and proteome analysis of the liver. **BMC Genomics**, v.9, p.506, 2008.
- 31 DAHM, R.; GEISLER, R. Learning from small fry: the zebrafish as a genetic model organism for aquaculture fish species. **Mar Biotechnol**, v.8, p.329–345, 2006.
- 32 MARTIN, S.A.M.; CASH, P.; BLANEY, S.; HOULIHAN, D.F. Proteome analysis of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver proteins during short term starvation. **Fish Physiol Biochem**, v.24, p.259–270, 2001.
- 33 HACK, C.J. Integrated transcriptome and proteome data:the challenges ahead. **Brief Funct Genomic Proteomic.**, v.3, p.212–219.
- 34 HARAGUCHI, H. Metallomics as integrated biometal science. **J Anal At Spectrom**, v.19, p.5–14, 2004.

- 35 CRICHTON, R.R; *Biological Inorganic Chemistry – An Introduction*. **Oxford, Elsevier**, p.369, 2008.
- 36 GOMES, C.M. & WITTUNG-STAFSHEDE, P. **Protein Folding and Metal Ions – Mechanism: Biology and Disease**. EUA: CRC Press, 2011.
- 37 MARET, W. In *Handbook of Metalloproteins*, ed. A. Messerschmidt, Wiley, **Chichester, UK**, 2003.
- 38 MARET, W.; VALLEE, B. L. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.95, p.3478, 1998.
- 39 KHALED, S.; BRUN, J. F.; BARDET, L.; CASSANAS, G. Importance physiologique du zinc dans l'activité physique. **Science & Sports**, v. 12, p.179-191, 1997.
- 40 VALEE, B.L.; FALCHUK, K.H. The biochemical basis of zinc physiology. **Physiol Rev**, v.73, p.79-111, 1993.
- 41 KEILIN, D.; MANN, T. Carbonic anhydrase, purification and nature of the enzyme. **Biochemistry Journal**, v.34, p.1163-1176, 1940.
- 42 SALGUEIRO, M. J. et al. Zinc as an essential micronutrient: a review. **Nutrition Research**, v.20, n.5, p.737-755, 2000.
- 43 POWELL, J. J. The antioxidant properties of zinc. **The Journal of Nutrition**, v.130, n 5, p.1447-1545, 2000.
- 44 TEMPLETON, D.M. "Guidelines for terms related chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects and methodological approaches". **Pure Appl. Chem.**, v.72, p.1453, 2000.
- 45 GÓMEZ-ARIZA, J.L.; GARCIA-BARRERA, T.; LORENZO, F.; BERNAL, V.; VILLEGAS, M.J.; OLIVEIRA, V. Use of mass spectrometry techniques for the characterization of metal bound to proteins (metalloomics) in biological systems". **Anal. Chim. Acta**, v.524, p.15, 2004.
- 46 MCCALL, K. A.; HUANG, C.; FIERKE, C. A. Function and mechanism of zinc metalloenzymes. **The Journal of Nutrition**, v.130, n.5, p.1437-1446, 2000.
- 47 MAFRA, D.; COZZOLINO, S.M.F. The importance of zinc in human nutrition. **Rev. Nutr.**, v.17, n.1, 2004.
- 48 KREBS NF. Overview of zinc absorption and excretion in the human gastrointestinal tract. **J Nutr.**, v.130, p.1374S-7S, 2000.

- 49 MOCHEGANI, E.; GIACCINI, R.; MALAVOLTA, M. Zinc signaling and subcellular distribution: emerging targets in type 2 diabetes. **Trends in Molecular medicine, Oxford**, v.14, n.10, p.419-428, 2008.
- 50 UNDERWOOD, E. **Trace elements in human and animal nutrition**. 4th. New York: Academic Press, 1977.
- 51 BOUGLE, D.L.; SABATIER, J.P.; GUAYDIER-SOUQUIERES, G.; GUILLON-METZ, F.; LAROCHE, D.; JAUZAC, P. Zinc status and bone mineralization in adolescent girls. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v.18, p.17-21, 2004
- 52 YOSHIKAWA, Y.; UEDA, E.; KOJIMA, Y.; SAKURAI, H. The action mechanism of zinc(II) complexes with insulinomimetic activity in rat adipocytes. **Life Sciences**, v.75, p.741-751, 2004.
- 53 UNDERWOOD, E.J.; SUTTLE, N.F. **The mineral nutrition of livestock**. 3ª ed. Wallingford: CABI, 1999. 614p.
- 54 KRUG, F.J.; NÓBREGA, J.A.; OLIVEIRA, P.V. espectrometria de Absorção Atômica Parte 1 – Fundamentos e Atomização com Chama. *Disciplina de Pós Graduação* Espectrometria de Absorção Atômica, 40p. ESALQ, 2004.
- 55 LI, B.T.; VAN KESSEL, A.G.; CAINE, W.R. et al. Small intestinal morphology and bacterial populations in ileal digesta and feces of newly weaned pigs receiving a high dietary level of zinc oxide. **Can. J. of Anim. Sci.**, v.81, p.511-516, 2001.
- 56 ELIAS AM. **Análise de curvas de crescimento de vacas da raça Nelore, Guzerá e Gir**. [dissertação]. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queirós; 1998.
- 57 WEATHERLEY, A. H. and H. S. GILL. **Dynamics of muscle growth in fish**. Weatherley. New York: A. H. and H. S. Gill. The Biology of Fish Growth. Academic Press, Inc., 1987.
- 58 LOVELL, T. Nutrition and Feeding os fish. Alabama: **Kluwer Academic Publishers**, 1998.
- 59 MCDOWELL, L.R. **Minerais para Ruminantes sob Pastejo em Regiões Tropicais Enfatizando o Brasil**. Gainesville: University of Florida, 1999. 93p.

- 60 MILLER, J.K.; RAMSEY, N.; MADSEN, F.C. Elementos vestigiales. In: CHURCH, D.C. **Fisiologia digestiva y nutrición de los ruminantes**, 1993. p.391-457.
- 61 MCDOWELL, L.R. Recent advances in minerals and vitamins on nutrition of lactating cows. In **Simpósio Internacional em Bovinocultura de Leite**, 2001, Lavras. Anais... Lavras: UFLA-FAEPE, 2001. p.51-76.
- 62 LEE, J. KNOWLES, S.O.; JUDSON, G.J.; **Trace element and vitamin nutrition of grazing sheep**. In: BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. **Nutrição de Ruminantes**, 2006. 583p.
- 63 CLYDESDALE, F.M. Mineral interactions in foods. In: BODWELL, C.E.; ERDMAN, **Jr.J.W. Nutrient interactions**. New York: Marcel Dekker, 1998. p. 257-268.
- 64 MELLOR, D. Historical background and fundamental concepts of chelation". In: DWYER, F.; MELLOR, D. (Ed). **Chelating agents and metal chelates**. New York: **Academic Press**, p.1, 1964.
- 65 HAYNES, AND D. B. LINDSAY, editors. **Protein Deposition in Animals**. Boston: Butterworths.
- 66 CLOSE, W.H. **The role of mineral proteinates in pig nutrition**. In: **Biotechnology in the Feed Industry**. Nottingham UK: Nottingham University Press, 1998. P.469-484.
- 67 LESSON, S.; SUMMERS, J.D. **Commercial poultry nutrition**. 2ed. Guelph, Ontario: University Books, 1997.
- 68 AAFCO. **Association of American Feed Control Officials**. Official Publication. Oxford, 2000.
- 69 APINES, M.J.SATOH, S.; KIRON, V. Bioavailability of amino acids chelated and glass embedded zinc to rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, fingerlings. **Aquaculture Nutrition**, v.7, p.221-228, 2001.
- 70 CHENG, J. E. T. et al. Influence of dietary lysine on the utilization of zinc from zinc sulphate and zinclysine complex by young pigs. **J. Anim. Sci.**, v.76, p.1064-1074, 1998.
- 71 BARROS, M.M., PEZZATO, L.E., MIRANDA, E.C. SÁ, M.V.C., SAMPAIO, F.G.. Complexo zinco aminoácido em dietas práticas para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Animal Scientiarum Animal Sciences**, v.26, n.4, p.437-441, 2004.

- 72 DO CARMO E SÁ, M.V., PEZZATO, L.E., BARROS, M.M., PADILHA, P.M.. Apparent absorption of zinc from supplemental inorganic and organic sources to Nile tilapia *Oreochromis niloticus* juveniles. **Journal of the World Aquaculture Society**, v.26, n.3, p.375-383, 2005.
- 73 SECHINATO, A. S. **Efeito da suplementação dietética com micro minerais orgânicos na produção e qualidade de ovos de galinhas poedeiras**. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. 2003.
- 74 WEDEKIND, K. J. et al. Bioavailability of zinc from inorganic and organic sources for pigs fed corn-soybean meal diets. **J. Animal Sci.**, v.72. p.2681-2689. 1994.
75. POTH, A. G.; DEETH, H. C.; ALEWOOD, P. F.; HOLLAND, J. W. Analysis of the human casein phosphoproteome by 2-D electrophoresis and MALDI-TOF/TOF MS reveals new phosphoforms. **J. Proteome Res.**, v.7, p.5017-5027, 2008.
76. PICARIELLO, G.; FERRANTI, P.; MAMONE, G.; ROEPSTORFF; ADDEO, F. Identification of N-linked glycoproteins in human milk by hydrophilic interaction liquid chromatography and mass spectrometry. **Proteomics**, v.8, p.3833-3847, 2008.
77. GIRON, P.; DAYON, L.; SANCHEZ, J. Cysteine tagging for MS-based proteomics. **Mass Spectrometry Reviews**, v.30, p.366-395, 2011.
78. MAMONE, G.; CAIRA, S.; GARRO, G.; NICOLAI, A.; FERRANTI, P.; PICARIELLO, G.; MALORNI, A.; CHIANESE, L.; ADDEO, F. Casein phosphoproteome: identification of phosphoproteins by combined mass spectrometry and two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis*, v.24, n.16, p.2824-2837, 2003.
- Epígrafe. PESSOA, F. (1888-1935). **Livro do desassossego**. São Paulo: Companhia das Letras, 2006.

CAPÍTULO II

DETERMINAÇÃO DE ZINCO EM AMOSTRAS DE TECIDO DE TILÁPIA DO NILO POR GFAAS UTILIZANDO MINERALIZAÇÃO ÁCIDA EM BANHO TERMOSTATIZADO DE ULTRASSOM

**Determinação de zinco em amostras de tecido de tilápia do Nilo por GFAAS
utilizando mineralização ácida em banho termostático de ultrassom**

**Paula M. Lima^a, Bruna Cavecci^a, João Vitor de Queiroz^a, Cilene do Carmo
Federici Padilha^b, Paulo dos Santos Roldan^d, Luiz E. Pezzato^a, Pedro M.
Padilha^{b,c,*}**

^a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/UNESP – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Botucatu, SP, Brasil.

^b Instituto de Biociências/UNESP – Departamento de Química e Bioquímica, Botucatu, SP, Brasil.

^c Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Bioanalítica/UNICAMP, Campinas, SP, Brasil.

^d Universidade Federal de Alagoas - Instituto de Química e Biotecnologia - IQB

*Autor correspondente: e-mail: padilha@ibb.unesp.br

Resumo

O objetivo do presente trabalho foi determinar a concentração de zinco em amostras de tecido de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) produzidas no Laboratório de Nutrição de Peixes/FMVZ-UNESP/Botucatu-SP/Brasil e alimentadas com rações contendo fonte orgânica e inorgânica de zinco. Na etapa de preparação, as amostras de tecido muscular foram liofilizadas e moídas criogenicamente até obtenção de partículas menores que 60 μm e a extração do zinco feita por mineralização ácida utilizando-se ácido sulfúrico concentrado e peróxido de hidrogênio 30% (m/m) em banho termostático de ultrassom. As determinações de zinco foram feitas por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS) utilizando temperaturas de secagem de 90°C - 250°C, temperatura de pirólise de 1400°C, temperatura de atomização de 2400°C e temperatura de limpeza de 2800°C. Foi utilizado como modificador químico nitrato de paládio injetado junto com as amostras e tungstênio como modificador permanente. Considerando as amostras de tecido muscular de Tilápia do Nilo analisadas foram encontradas concentrações de zinco na faixa de 3,70 a 19,00 mg kg^{-1} . A exatidão e precisão do método de determinação de zinco proposto foi validado utilizando padrão certificado *Fish Protein* DORM-4 NRC.

Palavras-chave: Nutrição de peixes; zinco em peixes; essencialidade de zinco; modificador químico.

Determination of zinc in tissue samples of Nile tilapia by GFAAS using acid digestion in constant temperature bath of ultrasound

Abstract

The aim of this paper was to determine the zinc concentrations in muscle samples of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) produced at the Laboratory of Fish Nutrition/ FMVZ-UNESP / Botucatu-SP / Brazil and fed diets containing inorganic and organic zinc source. In the samples preparation step, the samples were lyophilized and ground steak cryogenically to produce particles smaller than 60 μm and the zinc extraction was carried out by acid mineralization using concentrated sulfuric acid and hydrogen peroxide in thermostatically batch ultrasonic. The zinc determinations were carried out by GFAAS, at a drying temperature of 90°C - 250°C, pyrolysis temperature of 1400°C, atomization temperature of 2400°C, and cleaning temperature of 2800°C. Palladium nitrate was used as a chemical modifier coinjected with the samples, and tungsten as a permanent modifier. Among the muscle tissue samples of Nile Tilapia analyzed zinc concentrations were found to range in 3,7 to 19,00 mg kg^{-1} . The accuracy and precision of the proposed method of zinc determination was validated using certified standard Fish Protein 4 NRC DORM.

Keywords: Nutrition fish, zinc in fish; essentiality of zinc; chemical modifier.

1. Introdução

A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é uma espécie de peixe bastante versátil na piscicultura, pois se adapta tanto ao cultivo extensivo sem qualquer tecnologia empregada, quanto ao sistema de criação em tanques-rede com rações completas, com alta tecnologia de produção. Além do que, é bastante apreciada pela indústria de filetagem, graças às qualidades organolépticas e à inexistência de espinhos em “Y” no seu filé [1]. Devido ao seu potencial para a aquicultura, as tilápias tiveram sua distribuição expandida nos últimos cinquenta anos. Pelo fato de ser uma espécie apropriada para a piscicultura de subsistência nos países em desenvolvimento, e devido à sua importância na aquicultura, muitos aspectos da nutrição desta espécie são estudados [2]. Nos últimos anos no Brasil ocorreu um considerável aumento na produção de tilápias, o que tem levado pesquisadores que trabalham com aquicultura a desenvolverem trabalhos relacionados ao comportamento, fisiologia, genética e nutrição dessa espécie de peixe [3-5].

É consenso na comunidade científica a fundamental importância dos íons metálicos para os organismos, pois eles são essenciais como componentes estruturais e em muitos processos vitais, podendo funcionar como agentes sinalizadores, como catalisadores, ou ainda alterar a expressão gênica [6-8]. Por apresentarem proporções e quantidades variáveis no tecido corporal dos animais, os íons metálicos são classificados como macroelementos (elementos que o organismo necessita em grandes quantidades) e microelementos (elementos que o organismo necessita em menores quantidades). São considerados macroelementos essenciais o cálcio, fósforo, magnésio, potássio, sódio, cloro e enxofre; e como microelementos essenciais o cobre, cobalto, ferro, iodo, manganês, selênio e zinco [9, 10].

O zinco é um micromineral, cuja função é essencial para muitos processos bioquímicos. É componente de diversas proteínas envolvidas no metabolismo intermediário, via de secreção de hormônios e atua na defesa imunológica. Algumas enzimas Zn dependentes participam da síntese e do metabolismo de proteínas, lipídeos, carboidratos e ácidos nucleicos [11]. Esse elemento também participa da expressão genética, sendo componente de muitos fatores de transcrição. A sua presença nas células é processado por transportadores proteicos e nos processos de armazenagem, por meio

das metalotioneínas. Alterações na concentração desse elemento em tecidos podem ser observadas em muitos processos patológicos [12].

Dessa forma, o desenvolvimento de novas metodologias que permitam a quantificação segura dos microminerais, como o zinco, que são incorporados aos órgãos e tecidos dos animais nos estudos de nutrição de peixes, torna-se fundamental. Neste contexto, a determinação de analitos metálicos por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS), apresenta-se como uma técnica bastante robusta [13]. Essa técnica proporciona diversas vantagens, como alta sensibilidade, limites de detecção em níveis de ng kg^{-1} , utilização de pequenos volumes de amostra, determinação de uma ampla variedade de elementos traços e, considerando-se que o atomizador pode agir como um reator químico, tem-se a possibilidade de amostragem sólida, o que elimina a etapa de decomposição prévia total da amostra [14, 15].

Com base no exposto, o presente trabalho apresenta os resultados obtidos na otimização de nova metodologia de mineralização ácida com ácido sulfúrico e peróxido de hidrogênio em banho termostaticado de ultrassom das amostras tecido muscular de peixes para posterior determinação de zinco por GFAAS utilizando combinação de modificadores químicos.

2. Material e métodos

2.1. Reagentes e soluções

Água ultrapura ($18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$) obtida pelo sistema Elga modelo PURELAB Ultra Ionic e soluções extratoras de ácido sulfúrico suprapuro Merck foram utilizados em todo o trabalho. As soluções estoque de zinco e dos modificadores químicos (paládio e tungstênio) foram preparadas por diluições de padrões titrisol Merck. Todas as soluções foram estocadas em frascos de polipropileno.

Todos os frascos de estocagem de amostras e soluções padrão, vidrarias e os frascos do amostrador do espectrômetro de absorção atômica foram lavados com ácido nítrico suprapuro Merck a 10% (v/v) por 24 horas e em seguida enxaguados com água ultrapura e secos por jatos de ar puro antes da injeção de padrões e/ou amostras.

2.2. Coleta e preparo das amostras

As amostras de tecido muscular foram obtidas a partir do experimento realizado no Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos/FMVZ-UNESP/Botucatu-SP/Brasil. Na criação dos peixes foram utilizadas dietas práticas balanceadas (Tabela 1) de acordo com a literatura [16-18], com fontes orgânica e inorgânica de zinco, sendo orgânica o Bioplex da Altech, (zinco-metionina), inorgânica (sulfato de zinco monohidratado – $ZnSO_4 \cdot H_2O$), e controle (isento de suplementação de zinco), fornecidas para três grupos de animais com diferentes pesos iniciais, constituindo os seguintes tratamentos:

- Grupo 1- Peixes com peso inicial médio de 24g
 - T1C: alimentados com zinco controle;
 - T1O: alimentados com zinco orgânico;
 - T1I: alimentados com zinco inorgânico;
- Grupo 2 – Peixes com peso inicial médio de 74g
 - T2C: alimentados com zinco controle;
 - T2O: alimentados com zinco orgânico;
 - T2I: alimentados com zinco inorgânico;
- Grupo 3 – Peixes com peso inicial médio de 85g
 - T3C: alimentados com zinco controle;
 - T3O: alimentados com zinco orgânico;
 - T3I: alimentados com zinco inorgânico.

Após 80 dias de experimento, os peixes foram eutanasiados com benzocaína para a retirada do tecido muscular. Em seguida, para a obtenção do pool de amostras para cada tratamento, fez-se a maceração das amostras com turrax para armazenamento em frascos de polipropileno a $-20^{\circ}C$ em freezer. Todas as amostras foram preparadas para a etapa de extração do zinco procedendo-se inicialmente a liofilização por 48 horas e posteriormente a moagem por maceração em almofariz e pistilo na presença de nitrogênio líquido até a obtenção de partículas com granulometria menor que $60 \mu m$.

2.3. Mineralização das amostras de tecido muscular

Cerca de 100 mg das amostras de tecido muscular liofilizadas foram transferidos para balões de digestão de 25 mL. Para cada balão de digestão foram transferidas alíquotas de 3 mL de ácido sulfúrico concentrado e 1 mL de peróxido de hidrogênio 30% (m/m). O conjunto de balões de digestão foi colocado em banho de ultrassom da UNIQUE à temperatura de 40°C e 135 Watts de potência, até completa mineralização das amostras, ou seja, até o extrato ficar transparente. Em seguida, os extratos ácidos obtidos foram transferidos para balões volumétricos de 10 mL completando-se os volumes com água ultrapura para posterior determinação do zinco por GFAAS.

2.4. Determinação da concentração de zinco por GFAAS

2.4.1. Preparo do tubo de grafite recoberto internamente com carbeto de tungstênio

Os tubos de grafite pirolíticos com plataforma integrada utilizados nas determinações de zinco tiveram suas paredes internas recobertas com tungstênio. Para isso, alíquotas de 25 μL de solução contendo 1000 mg L^{-1} do modificador tungstato de sódio foram injetadas dentro do atomizador, o qual em seguida foi submetido ao seguinte programa de aquecimento: Secagem: 110°C por 10 s (Rampa) e 25 s (Aquecimento), 150°C por 10 s (Rampa) e 25 s (Aquecimento); Pirólise: 600°C por 10 s (Rampa) e 20 s (Aquecimento), 1500°C por 10 s (Rampa) e 20 s (Aquecimento); Atomização: 2500°C por 2 s (Aquecimento); e Limpeza: 2600°C por 5 s (Aquecimento). Em todas as etapas foi utilizado argônio como gás de limpeza com fluxo de 1 L min^{-1} . Esse procedimento foi repetido 20 vezes e permite obter uma camada de carbeto de tungstênio sobre a plataforma do tubo de grafite, que atua como modificador químico. A massa de tungstênio depositado na plataforma do tubo de grafite foi de 500 μg .

2.4.2. Preparo da curva analítica

A curva analítica foi preparada utilizando-se solução padrão estoque de zinco (Merck). Para isso, volumes de 8, 16, 24, 32 e 40 μL de solução padrão de zinco contendo $25 \mu\text{g L}^{-1}$, 5 μL de ácido clorídrico suprapuro 12 mol L^{-1} , 50 μL de Triton X-100 a 1% (v/v), 100 μL de solução 1000 mg L^{-1} de Pd(II) e água ultrapura foram transferidos para os frascos do autoamostrador do espectrômetro, de modo que o volume final das soluções padrão ficasse igual 1000 μL e as concentrações de zinco na faixa de 0,20 a $1,00 \mu\text{g L}^{-1}$.

2.4.3. Preparo dos extratos ácidos para injeção no tubo de grafite

Os extratos ácidos das amostras foram transferidos diretamente para os copos do autoamostrador do espectrômetro de absorção atômica e em seguida foram adicionados 50 μL de Triton X-100 a 1% (v/v), 100 μL de solução 1000 mg L^{-1} de Pd(II) e 350 μL de água ultrapura.

2.4.4. Procedimentos analíticos

Após a etapa de preparo das amostras (extratos ácidos) e das soluções padrão, preparadas diretamente nos copos do autoamostrador, um volume de 20 μL de padrão e/ou amostra foi injetado para dentro do tubo de grafite (recoberto internamente com carbeto de tungstênio) pela micropipeta do autoamostrador. As medidas foram feitas com três repetições. O programa de aquecimento do tubo de grafite otimizado para determinação de zinco foi o seguinte: Secagem: 90°C por 10 s (Rampa), 150°C por 10 s (Rampa) e 5 s (Aquecimento), 250°C por 10 s (Rampa) e 5 s (Aquecimento); Pirólise: 1400°C por 5 s (Rampa) e 10 s (Aquecimento); Atomização: 2400°C por 2 s (Aquecimento); Limpeza: 2800°C por 5 s (Aquecimento). Em todas as etapas, com exceção da etapa de atomização, argônio com fluxo de 1 L min^{-1} foi utilizado como gás de limpeza.

2.4.5. Análises estatísticas

Os dados experimentais foram analisados em conformidade com os procedimentos estabelecidos pelo Statistics Analysis System Institutes [19]. O teste de Tukey foi utilizado para demonstrar possíveis diferenças significativas entre os resultados obtidos nas determinações de zinco em amostras de tecido muscular de tilápia do Nilo nos três grupos de animais com diferentes pesos e para validar os resultados obtidos em padrão certificado utilizando-se o método de determinação de zinco proposto. A variabilidade dos dados foi expresso como o desvio padrão, com nível de significância estabelecido em 5% ($P < 0,05$).

3. Resultados e discussão

3.1. Otimização das condições experimentais para determinação de zinco por GFAAS

Curvas de pirólise e de atomização foram feitas para se determinar as temperaturas ótimas de pirólise e atomização do zinco nas soluções padrão e nos extratos ácidos das amostras de tecido muscular de tilápia do Nilo. A influência das temperaturas de pirólise e atomização sobre o sinal de absorvância obtido para o zinco em padrão contendo $0,50 \mu\text{g L}^{-1}$ e nos extratos ácidos das amostras de materiais biológicos são mostradas nas Figuras 1 e 2.

A temperatura de pirólise de 1400°C foi escolhida, porque conforme mostra a Figura 1 os sinais de absorvância obtidos para o zinco permanecem constantes a partir de 1000°C , sofrendo um rápido decréscimo a partir de 1400°C , demonstrando que até esse valor de temperatura o zinco apresentou-se termicamente estável. Em relação à temperatura de atomização (Figura 2), observa-se que os sinais de absorvância obtidos para o zinco são constantes a partir de 2200°C . Considerando esse comportamento e variáveis como a reprodutibilidade e repetibilidade de leituras, a temperatura de atomização de 2400°C foi escolhida. A boa estabilidade térmica do zinco obtida nesses experimentos demonstra a eficiência do modificador químico Pd(II) injetado junto com a amostra e do carbeto de tungstênio que atuou como modificador permanente [20-24].

3.2. Obtenção da curva analítica

Considerando-se os parâmetros físico-químicos otimizados (temperatura de pirólise e atomização), que permitiu elaborar o programa de aquecimento mostrado no item 2.4.4., foi preparada curva analítica de zinco na faixa de concentração de 0,20 – 1,00 $\mu\text{g L}^{-1}$. A Figura 3 mostra a curva analítica obtida com a sua respectiva equação da reta.

Os valores obtidos nas leituras de absorvância dos padrões de zinco ($n=3$) apresentaram boa repetibilidade e reprodutibilidade (desvios padrão relativo menores que 1%), o que reforça a eficiência dos modificadores químicos, Pd(II) e carbeto de tungstênio, e na estabilização térmica do zinco durante as etapas de pirólise e de atomização do programa de aquecimento utilizado. As massas características calculadas em relação ao padrão de 0,50 $\mu\text{g L}^{-1}$ de zinco foi de 12 pg e os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ), calculados considerando o desvio padrão de 20 leituras obtidas em relação ao branco das soluções padrão e da inclinação da curva analítica ($\text{LOD} = 3\sigma/\text{slope}$ e $\text{LOQ} = 10\sigma/\text{slope}$), foram respectivamente 0,12 e 0,41 $\mu\text{g L}^{-1}$ de zinco. O tempo de vida útil do tubo de grafite foi equivalente a 400 queimas, que para o método proposto é aceitável quando comparada com outros métodos descritos na literatura, considerando-se a complexidade das matrizes biológicas [25-30].

3.3. Concentração de zinco nas amostras de tecido muscular de tilápia do Nilo

Após a otimização dos parâmetros físico-químicos no processo de extração por ultrassom e do programa de aquecimento para determinação de zinco por GFAAS, o método otimizado foi aplicado na determinação do analito em amostras de tecido muscular de tilápia do Nilo. A precisão e exatidão do método foram avaliadas por determinação de zinco em padrão certificado *Fish Protein* DORM-4 NRC. Os resultados obtidos estão sumarizados na Tabela 2. Observa-se que concentração de zinco total no músculo dos grupos de peixes alimentados com zinco controle (T1C, T2C e T3C) não apresentou diferença significativa, porque não houve suplementação do elemento ($P < 0,05$), portanto, a fração presente foi proveniente dos ingredientes que compunham a dieta, dificultando a absorção intestinal, uma vez que o zinco pode estar

complexado com ácido fítico [17]. Analisando cada grupo separadamente, verificou-se que também não apresentou diferença entre os tratamentos T1OxT1I e T2OxT2I ($P,0,05$), porém entre T3OxT3I a concentração foi diferente ($P<0,05$), sendo maior para T3O ($18,93 \pm 0,20 \text{ mg kg}^{-1}$) e menor para T3I ($12,45 \pm 0,14 \text{ mg kg}^{-1}$). Esse resultado pode ser indicativo de que houve maior incorporação de zinco no tecido muscular nos peixes alimentados com fonte orgânica do que àqueles alimentados com zinco inorgânico.

Em relação aos resultados obtidos utilizando-se o método de determinação de zinco proposto, os dados apresentados podem ser considerados bastante robustos porque foram validados com base no resultado obtido na determinação de zinco no padrão certificado DORM 4 de proteína de músculo de peixe. A Tabela 2 mostra que o desvio padrão relativo do valor experimental em relação ao padrão certificado é menor que 1%, e que o valor experimental absoluto ($52,05 \pm 0,80 \text{ mg kg}^{-1}$) é cerca de 0,30% menor que o valor certificado absoluto ($52,20 \pm 3,20 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$), resultados esses que não apresentaram diferença estatística pelo Teste de Tukey ($P,0,05$), o que comprova a exatidão e precisão do método otimizado para determinação de zinco.

4. Conclusões

Os resultados obtidos utilizando-se o método proposto para mineralização das amostras de tecido muscular de tilápia do Nilo e posterior determinação de zinco por GFAAS apresentou excelente precisão, exatidão, baixos limites de detecção e quantificação, e velocidade analítica superior quando comparada com o processo de mineralização ácida em bloco digestor.

As concentrações de zinco no tecido muscular dos animais não apresentaram diferença entre os tratamentos orgânico e inorgânico dos grupos 1 e 2, porém no grupo 3, a concentração foi superior para o tratamento orgânico.

Acknowledgments

Os autores agradecem à FAPESP (Processos 2010/51332-5 e 201/51562-0) e ao CNPq (Processo 472487/2009).

5. Referências

1. F. Meurer, C. Hayashi, W. R. Boscolo, C. M. Soares, R. Bras. Zootec., 31, n.2, 566, (2002).
2. W.R. Wilson Rogério Boscolo, C. Hayashi, F. Fábio Meurer, R. Bras. Zootec., 31, n.2, 539, (2002).
3. M.V.C. Sá, L.E. Pezzato, M.M. Barros, P.M. Padilha, Aquaculture 238, 385, (2004).
4. M.V.C. Sá, L.E. Pezzato, M.M. Barros, P.M. Padilha, J. World Aquacult. Soc. 36, 380, (2005).
5. M.V.C. Sá, L.E. Pezzato, M.M. Barros, P.M. Padilha, Aquacult. Nutr. 11, 273, (2005).
6. J. S. Garcia, C.S. Magalhães, M.A.Z. Arruda, Talanta 69, 1, (2006).
7. J. SZPUNAR, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 378, 54, (2004).
8. H. Haraguchi, Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 19, 5,(2004).
9. J. W. Hilton, Aquaculture 79, 223, (1987).
10. T. Watanabe, V. Kiron, S. Satoh, Aquaculture, 151, 185, (1997).
11. L.R. McDowell, 1992. Minerals in Animal and Human Nutrition, Academic Press, New York.
12. N. I. Millerihli, Fres. J. Anal. Chem., 345, 482, (1993).
13. N. I. Millerihli, Fresenius J. Anal. Chem., 345 (1993) 482-489.
14. C. Bendicho, M. T. C. Loos-Vollebregt, J. Anal. At. Spectrom. 6, 353, (1991).
15. Y.Z. Liang, M. Li, Z. Rao, Anal. Sci., 12, 629, (1996).
16. I. G. GUIMARÃES, L.E. PEZZATO, M.M. BARROS, Aquaculture Nutrition, Bethesda , 14, n. 1, 396, (2008).
17. L. E. PEZZATO, E. C. MIRANDA, M. M. BARROS, L. G. QUINTERO PINTO, W. M. FURUYA and A. C. PEZZATO, Revista Brasileira de Zootecnia, Viçosa, 31, n. 4, 1595, (2002).

18. NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. Nutrient requirements of fish and shrimp. Washington, D.C.: National Academies Press, 376, (2011) .
19. SAS Institute Inc., SAS OnlineDoc_, Version 8, Cary, 1999, NC: SAS Institute Inc.
20. R. C. F. Neves, P.M. Moraes, M.A.D. Saleh, V.R. Loureiro, F.A. Silva, M.M. Barros, C. C. F. Padilha, S. M.A. Jorge, P.M. Padilha, Food Chemistry, 113, 679, (2009).
21. P. M. Moraes, R. B. Milantonio, G. S. Cagnani, F. A. Santos, C. C. F. Padilha, P. M. Lima, P. M. Padilha, European Food Research and Technology, 229, 409, (2009).
22. F. A. Silva, R. C. F. Neves, L. G. Quintero-Pinto, C. C. F. Padilha, S. O. M. A. Jorge, M. M. Barros, L. E. Pezzato, P. M. Padilha, Chemosphere 68, 1542, (2007).
23. V. R. Loureiro, M. A. D. Saleh, P. M. Moraes, R. C. F. Neves, C. C. F. Padilha, P. M. Padilha, Journal of the Brazilian Chemical Society 18, 1235, (2007).
24. F. A. Silva, C. C. F. Padilha, L. E. Pezzato, M. M. Barros, P. M. Padilha, Talanta 69, 1025, (2006).
25. A. Francony, C. Pétrier, C. Sonochemical, Sonochem., 3, 77, (1996).
26. A. V. Filgueiras, J. L. Capelo, I. Lavilla, C. Bendicho, Talanta 53, 433, (2000).
27. C. C. Nascentes, M. Korn, A. A. Z. Arruda, Microchem. J. 69, 37, (2001).
28. J. Ruiz- Jiménez, J. L. Luque-Garcia, M. D. Luque de Castro, Anal. Chim. Acta 480, 231, (2003).
29. A. Elik, Talanta 66, 882, (2005).
30. A. Elik, Talanta 71, 790, (2007).

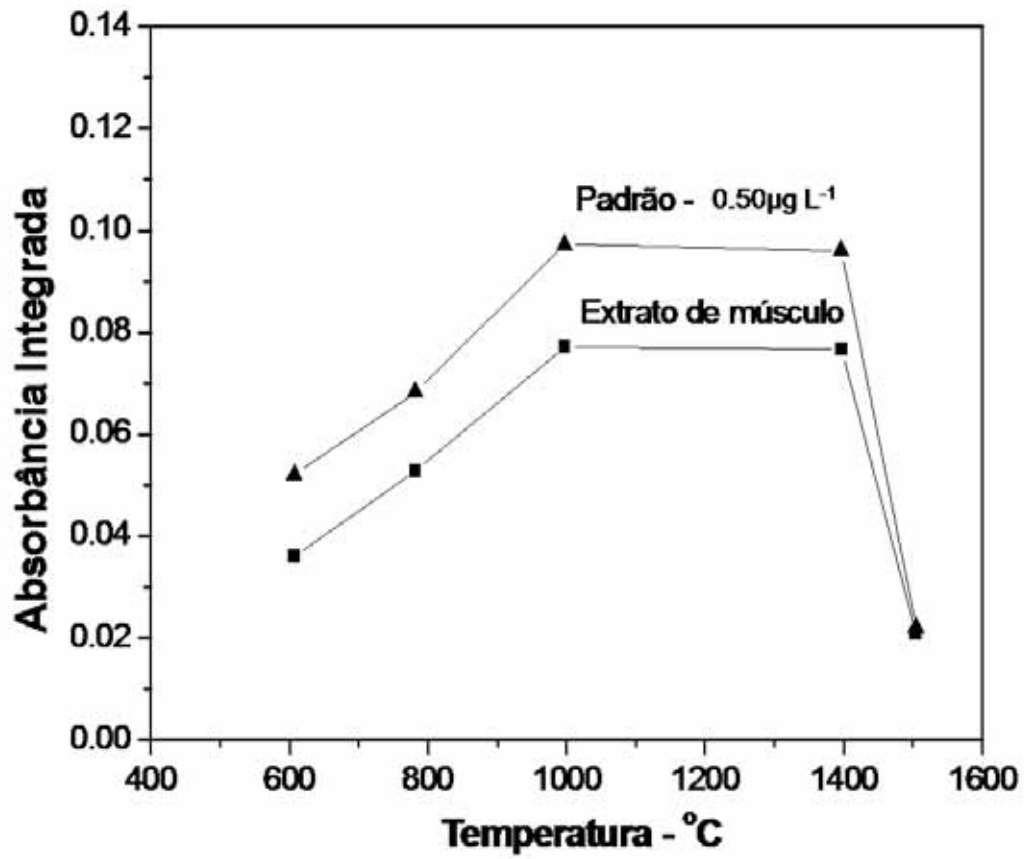


Figura 1. Curvas de temperatura de pirólise dos extratos ácidos das amostras de tecido muscular de tilápia do Nilo e de padrão contendo 0,50 µg L⁻¹ de zinco.

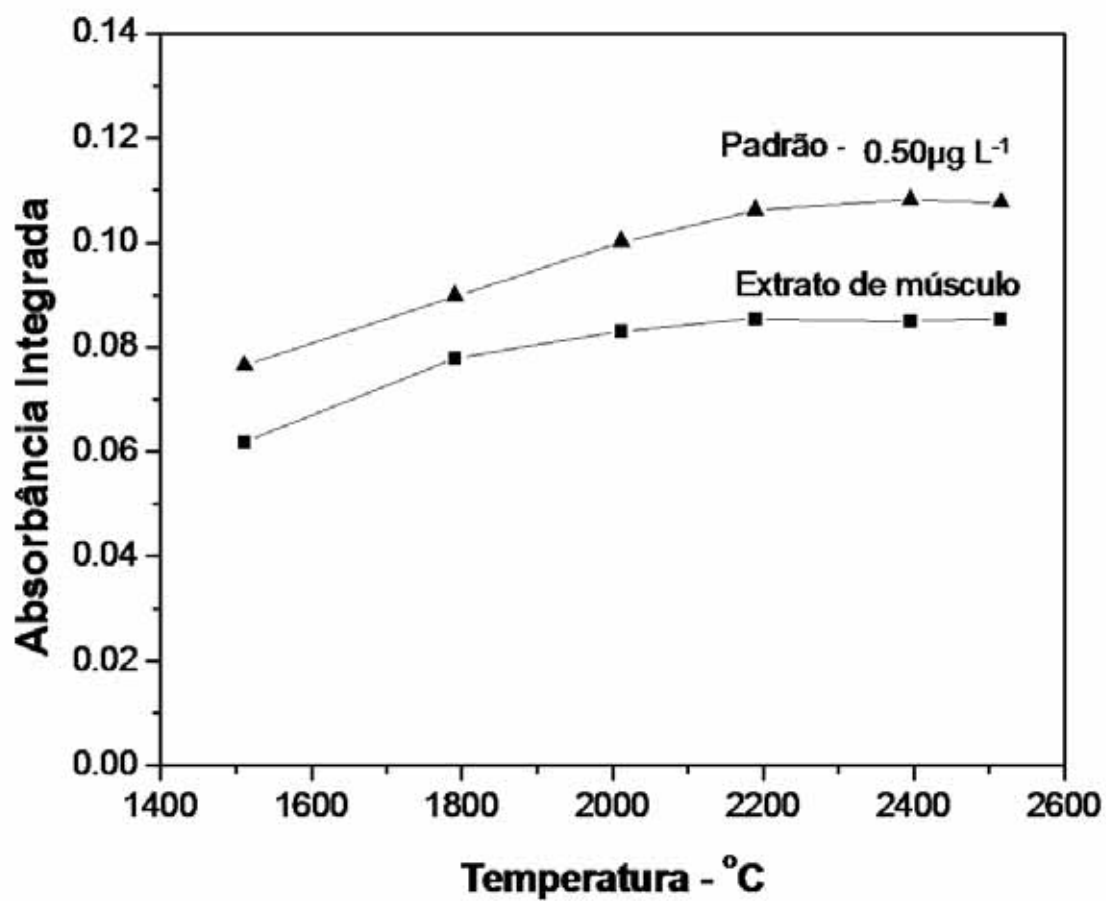


Figura 2. Curvas de temperatura de atomização dos extratos ácidos das amostras de tecido muscular de tilápia do Nilo e do padrão contendo 0,50 µg L⁻¹ de zinco.

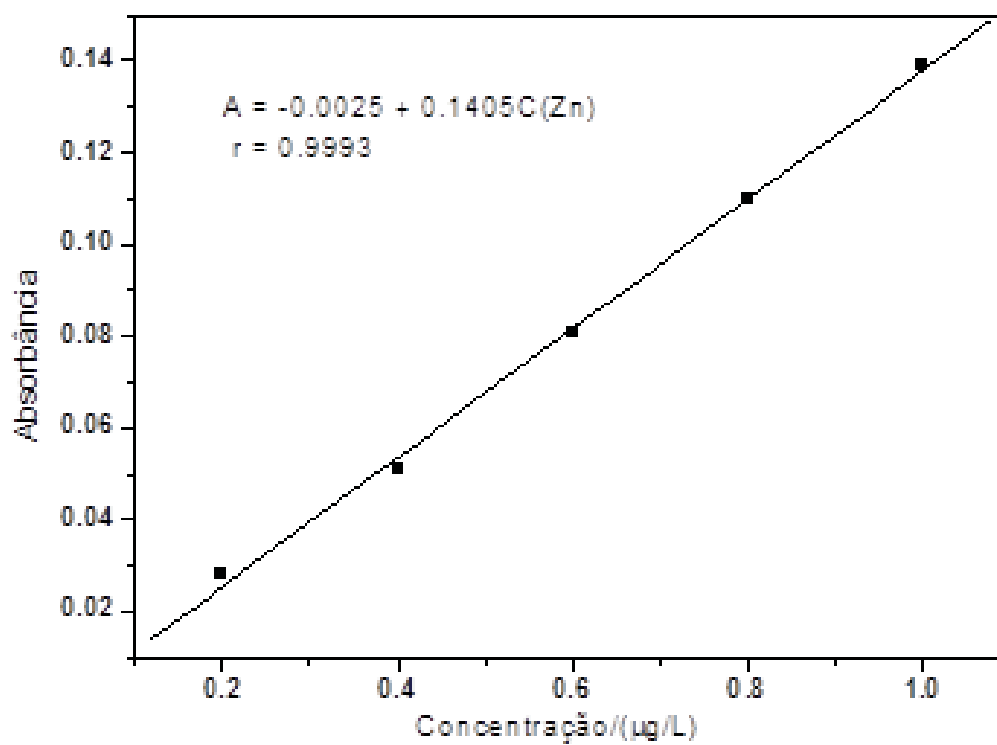


Figura 3. Curva analítica obtida a partir de soluções padrão aquosas contendo 0,20, 0,40, 0,60, 0,80 e 1,00 $\mu\text{g L}^{-1}$ de zinco
Coeficiente de correlação: 0,9993

Tabela 1. Composição das dietas experimentais.

Ingrediente	Dieta (%)		
	Controle	Orgânica	Inorgânica
Soja, farelo	37,62	37,66	37,64
Milho, glúten-60	10,00	10,00	10,00
Milho, grão	44,21	43,92	44,07
Trigo, farelo	4,16	4,18	4,17
Soja, óleo	0,87	0,96	0,92
Fosfato bicálcico	2,06	2,06	2,06
Cloreto de sódio	0,10	0,10	0,10
DL-Metionina	0,26	0,26	0,26
L-Lisina HCL 99%	0,42	0,42	0,42
L-Treonina 98,5%	0,18	0,18	0,18
Antioxidante (BHT)**	0,02	0,02	0,02
Vitamina C	0,05	0,05	0,05
Premix min e vit*	0,05	0,05	0,05
Bioplex	0,00	0,14	0,00
Sulfato de Zinco Monoidratado	0,00	0,00	0,06
TOTAL	100,00	100,00	100,00

Composição química calculada			
	Controle	Orgânica	Inorgânica
Qtdd (%)	100,00	100,00	100,00
ED (kcal kg ⁻¹)	3400,00	3400,00	3400,00
PD (%)	29,00	29,00	29,00
FB (%)	4,00	4,00	4,00
EE (%)	2,41	2,49	2,46
Ca (%)	0,66	0,66	0,66
Pdisp (%)	0,59	0,59	0,59
Lys (%)	1,60	1,60	1,60
Met (%)	0,70	0,70	0,70
Met+Cys (%)	1,07	1,07	1,07
Thr (%)	1,10	1,10	1,10
Trp (%)	0,30	0,30	0,30
Zn quantificado (mg kg ⁻¹)	23,0	154,32	139,25

*Suplemento vitamínico mineral (isento de Zn), níveis de garantia por kg da dieta: vitamina A, 16060 UI; vitamina D3, 4510 UI; vitamina E, 250 UI; vitamina K, 30 mg; vitamina B₁, 32 mg; vitamina B₂, 32 mg; vitamina B₆, 48 mg; pantotenato de cálcio, 80 mg; niacina, 170 mg; biotina, 10 mg; ácido fólico, 10 mg; vitamina B₁₂, 32 µg; Na₂SeO₃, 0,7 mg; MnO, 50 mg; FeSO₄, 150 mg; CuSO₄, 20 mg; CoSO₄, 0,5 mg; I₂Ca, 1 mg. **antioxidante Butil hidroxitolueno.

Tabela 2. Concentração de zinco total no tecido muscular de tilápia considerando os tratamentos utilizados com diferentes concentrações de zinco e no padrão certificado.

Tratamento	Concentração de Zn (mg kg ⁻¹)
T1C	3,65 ± 0,02
T1O	4,93 ± 0,04
T1I	6,25 ± 0,05
T2C	4,30 ± 0,04
T2O	16,80 ± 0,18
T2I	15,80 ± 0,16
T3C	4,80 ± 0,04
T3O	18,93 ± 0,20
T3I	12,35 ± 0,14
DORM-4	52,05 ± 0,80; 52,20 ± 3,20*

T1C – Peixes de 24 g alimentados com zinco controle (isento de zinco); T1O – Peixes de 24 g alimentados com zinco orgânico (bioplex); T1I – Peixes de 24 g alimentados com zinco inorgânico (sulfato de zinco); T2C – Peixes de 74 g alimentados com zinco controle (isento de zinco); T2O – Peixes de 74 g alimentados com zinco orgânico (bioplex); T2I – Peixes de 74 g alimentados com zinco inorgânico (sulfato de zinco); T3C – Peixes de 85 g alimentados com zinco controle (isento de zinco); T3O – Peixes de 85 g alimentados com zinco orgânico (bioplex); T3I – Peixes de 85 g alimentados com zinco inorgânico (sulfato de zinco);

*DORM-4 – Padrão certificado de proteína de peixe contendo valor certificado de Zn.

Resultados expressos com valor médio ± desvio padrão ($n = 4$; $P < 0,05$)

CAPÍTULO III

**UTILIZAÇÃO DE ESTRATÉGIAS BIOANALÍTICAS PARA
FRACIONAMENTO DE ZINCO EM AMOSTRAS DE TECIDO MUSCULAR
DE TILÁPIA DO NILO ALIMENTADAS COM DIETAS DE FONTES DE
ZINCO ORGÂNICA E INORGÂNICA.**

Utilização de estratégias bioanalíticas para fracionamento de zinco em amostras de tecido muscular de Tilápia do Nilo alimentadas com dietas de fontes de zinco orgânica e inorgânica.

Paula M. Lima^a, Mariana R. L. Viera^a, Bruna Cavecci^a, João V. Queiroz^b, Luiz E. Pezzato^a, Pedro M. Padilha^{b,c*}

^a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/UNESP – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, C. Postal 31, 15385-000 Botucatu, SP, Brasil.

^b Instituto de Biociências/UNESP-Departamento de Química e Bioquímica, C. Postal 510, 18618-970 Botucatu, SP, Brasil.

^c Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Bioanalítica/UNICAMP, C. Postal 6154, 13084-971 Campinas, SP, Brasil.

*Autor correspondente: e-mail: padilha@ibb.unesp.br

Resumo

No últimos anos, novos estudos com proteômica em peixes tem sido desenvolvidos para atender a nutrição animal de acordo com o aumento da produção. Na nutrição, os minerais são importantes no metabolismo pelo fato de muitos destes serem cofatores de proteínas como no caso do zinco em algumas proteínas como lactato desidrogenase, anidrase carbônica, fosfatase alcalina, carboxipeptidase, superóxido dismutase.. Em estudos metaloprotômicos a eletroforese bidimensional se destaca como uma importante ferramenta na separação proteica com ótima definição para posterior identificação do mineral por espectrometria de absorção atômica (GFAAS). Assim sendo, no presente estudo a eletroforese 2D-PAGE de gel de poliacrilamida foi utilizado para obter o proteoma de amostras de tecido muscular de tilápia do Nilo alimentadas com fontes orgânica e inorgânica de zinco para três grupos 1 com 24g, 2 com 74g e 3 com 85g. Para os animais alimentados com zinco orgânico, as maiores concentrações de zinco foram para o grupo 3; para aqueles alimentados com zinco inorgânico, foram para o grupo 1. E quando as fontes de zinco foram analisadas dentro de cada grupo, as maiores concentrações de zinco foram para o zinco inorgânico nos grupos 1 e 2 e orgânico no grupo 3. Observou-se que a fontes de zinco podem influenciar o metaloproteoma do tecido muscular de peixes, onde o zinco foi identificado em diferentes spots e conseqüentemente com diferentes pontos isoelétricos e massa molar, alterando suas concentrações de acordo com a fonte do mineral presente na dieta. E através deste estudo foi possível identificar duas proteínas como possíveis biomarcadoras de zinco.

Palavras chave: Proteômica, metalômica, 2D-PAGE, GFAAS.

Abstract

In last years, new studies with proteomic in fish have been developed to assist animal nutrition according to increase in production of these animals. In nutrition, minerals are important in animal metabolism because many of them are cofactors of proteins as in the case of zinc with some proteins as lactate desidrogenase, carbonic anhydrase, alkaline phosphatase, carboxypeptidase, superoxide dismutase, in the case of zinc. In the metalloproteomic studies, the two-dimensional electrophoresis appears as an important tool in proteins separation with great definition and then the mineral is identify by graphite furnace atomic absorption spectrometry (GFAAS). Considering the above, in the present study, the polyacrylamide gel electrophoresis 2D-PAGE was used for obtain the proteome of muscle tissue samples of Nile Tilapia fed with organic and inorganic zinc sources in diet in three groups 1, 2 and 3 with 24g, 74g and 85g, respectively. For the animals fed with organic zinc, the highest concentrations were to group with 85g; for those fed inorganic zinc were group with 24g. And when the sources were analyzed to each group, the highest concentrations of zinc were to inorganic zinc in group 1 and 2, and organic zinc in group 3. Thus it is observed that the sources of zinc can influence in metalloproteome of muscle tissue of fishes, whereas zinc was identified in different spots and consequently with different isoelectric points and molar mass, changing their concentrations according to the source of the mineral present in diet. And through this study it was possible to identify two proteins as biomarkers of zinc.

Keywords: Proteomic, metalomic, 2D-PAGE, GFAAS

1. Introdução

Nas últimas décadas, novas áreas científicas têm surgido para ajudar a nutrição animal utilizando metodologias da biologia molecular como a expressão gênica, proteoma, metaboloma, e bioinformática. A fusão da expressão gênica (genoma) com a nutrição foi inicialmente chamada de “nutrigenoma” [1], e rapidamente evoluiu para sistemas biológicos [2] que incluem a integração dessas novas áreas científicas para compreender o sistema biológico como um todo, incluindo a resposta do animal, mas sempre dependendo de cada um de seus principais órgãos [3].

As proteínas são moléculas complexas, constituídas de aminoácidos [4] e na sua maioria requerem um cofator de metal, onde os íons metálicos podem controlar a expressão da proteína em células [5]. Como no caso das metaloproteínas, enfatizando o papel crucial de íons metálicos na estabilização da estrutura da proteína, sendo alvo dos esforços de investigação extensiva [4]. Metaloproteínas podem ser chamadas de metaloenzimas quando funcionam como catalisadores biológicos para regular as reações e funções fisiológicas em células e órgãos. Desta forma, as metaloenzimas contém um número específico de íons metálicos para os sítios ativos específicos na proteína [6].

Os elementos traços considerados essenciais para os animais terrestres são também exigidos pelos peixes; entretanto, apenas sete elementos (Ca, P, Mg, Fe, Zn, I e Se) têm sido mais estudados. Diferentemente dos demais animais, os peixes apresentam a importante particularidade de ter fonte de suprimento dos minerais, tanto na dieta como no meio em que vive [7]. Nesse contexto, o zinco é amplamente distribuído em tecidos vegetais e animais e ocorre em todas as células vivas. Esse mineral funciona como um cofator e é um constituinte de muitas enzimas, como lactato desidrogenase, álcool desidrogenase, desidrogenase glutâmico, fosfatase alcalina, anidrase carbônica, carboxipeptidase, superóxido dismutase, retinene redutase, DNA e RNA polimerase. Enzimas Zn dependentes estão envolvidas no metabolismo de macronutrientes e replicação celular [8-13]. A interação do zinco com as proteínas exige a utilização de técnicas para separação dessas macromoléculas e posterior mapeamento do mineral [14].

Para os estudos metaloproteômicos, a eletroforese em segunda dimensão vem se destacando como uma importante ferramenta na separação das proteínas devido à sua

alta resolução, além de favorecer que as mesmas sejam submetidas a outras técnicas, como a Microfluorescência de Raios X Síncrotron (μ SXRF) e Espectrometria de Absorção Atômica, para identificação e/ou quantificação dos metais ligados às proteínas de interesse [12, 13].

De acordo com o exposto, buscou-se no presente estudo mapear e quantificar zinco por GFAAS em spots proteicos obtidos após separação das proteínas por 2D-PAGE de amostras do tecido muscular de tilápia do Nilo alimentadas com dietas à base de fonte orgânica e inorgânica desse mineral.

2. Material e Métodos

Os estudos foram conduzidos inicialmente no Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos – AquaNutri, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, para alimentação dos animais e, posteriormente, nos Laboratórios de Eletroforese e de Química Analítica Aplicada, do Departamento de Química e Bioquímica, do Instituto de Biociências, Campus de Botucatu.

2.1. Dietas Experimentais

Foram utilizadas dietas práticas balanceadas (Tabela 1) de acordo com a literatura [15-18], com fontes orgânica, Bioplex da Altech, (zinco-metionina), inorgânica (sulfato de zinco monohidratado – $ZnSO_4 \cdot H_2O$) e controle (isento de suplementação de zinco), fornecidas para três grupos de animais com diferentes pesos iniciais, constituindo os seguintes tratamentos:

- Grupo 1- Peixes com peso inicial médio de 24g
 - T1C: alimentados zinco controle;
 - T1O: alimentados com zinco orgânico;
 - T1I: alimentados com zinco inorgânico;
- Grupo 2 – Peixes com peso inicial médio de 74g
 - T2C: alimentados com zinco controle;
 - T2O: alimentados com zinco orgânico;
 - T2I: alimentados com zinco inorgânico

- Grupo 3 – Peixes com peso inicial médio de 85g
 - T3C: alimentados com zinco controle;
 - T3O: alimentados com zinco orgânico;
 - T3I: alimentados com zinco inorgânico.

Tabela 1. Composição das dietas experimentais.

Ingrediente	Dieta (%)		
	Controle	Orgânica	Inorgânica
Soja, farelo	37,62	37,66	37,64
Milho, glúten-60	10,00	10,00	10,00
Milho, grão	44,21	43,92	44,07
Trigo, farelo	4,16	4,18	4,17
Soja, óleo	0,87	0,96	0,92
Fosfato bicálcico	2,06	2,06	2,06
Cloreto de sódio	0,10	0,10	0,10
DL-Metionina	0,26	0,26	0,26
L-Lisina HCL 99%	0,42	0,42	0,42
L-Treonina 98,5%	0,18	0,18	0,18
Antioxidante (BHT)**	0,02	0,02	0,02
Vitamina C	0,05	0,05	0,05
Premix min e vit*	0,05	0,05	0,05
Bioplex	0,00	0,14	0,00
Sulfato de Zinco Monoidratado	0,00	0,00	0,06
TOTAL	100,00	100,00	100,00
Composição química calculada			
	Controle	Orgânica	Inorgânica
Qtdd (%)	100,00	100,00	100,00
ED (kcal kg ⁻¹)	3400,00	3400,00	3400,00
PD (%)	29,00	29,00	29,00
FB (%)	4,00	4,00	4,00
EE (%)	2,41	2,49	2,46
Ca (%)	0,66	0,66	0,66
Pdisp (%)	0,59	0,59	0,59
Lys (%)	1,60	1,60	1,60
Met (%)	0,70	0,70	0,70
Met+Cys (%)	1,07	1,07	1,07
Thr (%)	1,10	1,10	1,10
Trp (%)	0,30	0,30	0,30
Zn quantificado (mg kg ⁻¹)	23,0	154,32	139,25

*Suplemento vitamínico mineral (isento de Zn), níveis de garantia por kg da dieta: vitamina A, 16060 UI; vitamina D3, 4510 UI; vitamina E, 250 UI; vitamina K, 30 mg; vitamina B1, 32 mg; vitamina B2, 32 mg; vitamina B6, 48 mg; pantotenato de cálcio, 80 mg; niacina, 170 mg; biotina, 10 mg; ácido fólico, 10 mg; vitamina B12, 32 µg; Na2SeO3, 0,7 mg; MnO, 50 mg; FeSo4, 150 mg; CuSO4, 20 mg; CoSo4, 0,5 mg; I2Ca, 1 mg. **antioxidante Butil hidroxitolueno.

2.2. Coleta das amostras

Após 80 dias de experimento, os peixes foram eutanasiados com benzocaína para a retirada do tecido muscular. Em seguida, para a obtenção do pool de amostras para cada tratamento, fez-se a maceração das amostras com turrax para armazenamento em frascos de polipropileno a -20°C em freezer.

Inicialmente, para os métodos de extração, precipitação, ressolubilização proteica, focalização isoeétrica e 2D-PAGE utilizou-se o protocolo já otimizado com amostras de tecido muscular de tilápia do Nilo, onde as amostras foram maceradas em água ultrapura com auxílio de almofariz e pistilo, centrifugadas à 13224.3 G , a 4°C durante 5 minutos, em centrífuga refrigerada, e os extratos proteicos obtidos dessas amostras foram transferidos para tubos do tipo Eppendorf[®] e utilizados posteriormente para quantificação dos teores proteicos e corridas eletroforéticas [19, 20].

Os extratos proteicos foram submetidos à solução gelada de acetona 80% (v/v) na proporção 1:4 (amostra:acetona) e armazenados por 2 horas a -20°C , para a precipitação das proteínas.

Em seguida, o precipitado proteico obtido foi centrifugado a 7825 G em centrífuga refrigerada (BioAgency) por 10 minutos para retirada do sobrenadante e obtenção da massa proteica (*pellet*) que foi ressolubilizada em hidróxido de sódio para quantificação de proteína.

2.3. Determinação de proteína total

A concentração de proteínas totais nos extratos proteicos de músculo foi determinada de acordo com o método do Biureto, empregando albumina de soro bovino como padrão [21]. Foi construída uma curva analítica com concentrações de 10 a 80 g L^{-1} a partir de solução padrão estoque de albumina bovina 100 g L^{-1} . Para leitura das amostras, os precipitados proteicos foram ressolubilizados em $100\text{ }\mu\text{L}$ de NaOH $0,50\text{ mol L}^{-1}$. Em cubetas de plástico foram adicionados $50\text{ }\mu\text{L}$ de padrão/amostra e $2,5\text{ mL}$ do reagente do Biureto. A mistura padrão ou amostra com o reagente foi mantida a 32°C em banho maria (Marconi) durante 10 min. Após o tempo de reação, as leituras de absorbância foram medidas a 540 nm , usando espectrofotômetro UV/Visível.

2.4. Separações eletroforéticas

Para as separações eletroforéticas, a massa proteica (*pellet*) foi ressolubilizada em tampão Tris-HCl a 1 mol L^{-1} (pH 6,8), contendo ureia a 7 mol L^{-1} , tiourea a 2 mol L^{-1} , 3-[(3- cloroamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato (CHAPS) a 2% (m/v), anfólitos de pH 3 a 10 a 0,5% (v/v) e azul de bromofenol a 0,002%, além disso, 2,8 mg de 1,4-ditiotreitol (DTT) foram adicionados a este tampão, esta mistura foi utilizada nas separações eletroforéticas [22].

Para iniciar os processos das separações eletroforéticas aplicou-se $375 \mu\text{g}$ da massa proteica ressolubilizada em fitas de 13 cm que contém gel pré-fabricado com anfólitos imobilizados de pH de 3 a 10 e colocadas em um aparato com óleo mineral em temperatura ambiente, para serem hidratadas com o extrato proteico e após 12 horas foram levadas ao sistema de isofocalização elétrica (IOF), para a separação das proteínas em função do pH. A programação de tensão utilizada no processo de separação por IOF foi o seguinte: Estágio 1 = 500 V, com acúmulo de 500 Vh; Estágio 2 = 1000 V, com acúmulo de 800 Vh; Estágio 3 = 10000 V, com acúmulo de 11300 Vh; Estágio 4 = 10000 V, com acúmulo de 3000 Vh [22].

Antes de iniciar a corrida eletroforética em segunda dimensão, as fitas foram submetidas a soluções de equilíbrio em duas etapas utilizando-se mesa agitadora:

➤ na primeira etapa, de redução, foram utilizados 10 mL de solução contendo ureia 6 mol L^{-1} , Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) 2 % (m/v), glicerol 30% (v/v), Tris-HCl 50 mmol L^{-1} , azul de bromofenol 0,002% (m/v) e DTT 1% (m/v);

➤ na segunda etapa, de alquilação dos grupos tióis, foi utilizada uma solução de composição similar, porém, substituindo-se o DTT por iodoacetamida 2,5% (m/v).

Na segunda dimensão do processo eletroforético (2D-PAGE), as fitas foram colocadas sob os géis de poliacrilamida a 12,5%, preparados previamente em placas de vidro de $180 \times 160 \times 1,5 \text{ mm}$, a partir das seguintes soluções: Acrilamida, N,N'-metilenobisacrilamida, Tris-hidroximetil amino metano, Dodecil Sulfato de Sódio (SDS), N,N',N,N'-tetrametilenodiamina (TEMED) e Persulfato de Amônio. Juntamente com as fitas, aplicou-se em papel filtro $10 \mu\text{L}$ de padrão de massa molar contendo as proteínas β -fosforilase (97,0 kDa), albumina (66,0 kDa), ovoalbumina (45,0 kDa), anidrase carbônica (30,0 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactoalbumina (14,4

kDa). Depois de vedado esse sistema com solução de agarose 0,5% (m/v), em tampão adequado, iniciou-se a corrida eletroforética em segunda dimensão com a seguinte programação: Tensão – 90 V por 30 min; e em seguida, Tensão – 250 V por 2h30 [23].

Após 3 horas de corrida, os géis foram submetidos à solução fixadora contendo ácido acético 10% (v/v) e etanol 40% (v/v) por uma hora e finalmente corados durante 72 horas com corante Coomassie coloidal, que consiste em solução de sulfato de amônio 8% (m/v), ácido fosfórico 1,6% (v/v), azul de coomassie G-250 0,08% (m/v) e metanol 25% (v/v).

2.5. Mineralização dos spots

Os spots proteicos obtidos nas corridas eletroforéticas foram recortados dos géis de poliacrilamida e mineralizados utilizando-se o procedimento já descrito na literatura [24-29], com modificações descritas a seguir: cinco spots proteicos (obtidos das réplicas de três corridas – em cada corrida obteve-se 4 géis) foram transferidos para balões de Kjeldahl de 25 mL (para efeito de simplificação denominaremos de balões de digestão). Para cada balão de digestão foram transferidas alíquotas de 3 mL de ácido sulfúrico concentrado e 1 mL de peróxido de hidrogênio 30% (m/m). O conjunto de balões de digestão foi colocado em banho de ultrassom da UNIQUE à temperatura de 40°C e 135 Watts de potência, até completa mineralização das amostras (extrato transparente). Em seguida, os extratos ácidos obtidos foram transferidos para balões volumétricos de 10 mL, completando-se os volumes com água ultrapura.

2.6. Mapeamento/Quantificação de Zn nos spots proteicos por espectrometria de absorção atômica

No mapeamento de Zn por Espectrometria de Absorção Atômica em forno de grafite (GFAAS) utilizou-se solução padrão Titrisol MERCK no preparo da curva de calibração. As condições operacionais e utilizadas foram as descritas no manual do fabricante do equipamento (COOKBOOK, SHIMADZU AA – 6800, 2000) e otimizadas em trabalhos anteriores [30].

2.7. *Análise Estatística*

Os dados de concentração de proteína no extrato e concentração de zinco no tecido muscular foram analisados no delineamento inteiramente casualizado, utilizando-se análise de variância e teste de Tukey, adotando $\alpha = 0,05$ como nível de significância. A homogeneidade das variâncias foi verificada pelo teste de Levene

2.8. *Caracterização das proteínas por ESI MS/MS*

As alíquotas das soluções contendo os peptídeos foram analisadas para obtenção dos espectros de massas utilizando Plataforma UPLC em espectrômetro de massa com fonte ionização por ESI e analisador de massas híbrido Xevo G2 Q-TOF (Waters, Milford, MA, EUA), acoplado com sistema nanoAcquity Ultra Performance LC (Waters, Milford, MA, EUA). A identificação das proteínas foi feita por meio de busca em banco de dados *Uniprot* (www.uniprot.org).

3. Resultados e Discussão

3.1. Determinação da concentração de Zn total nas dietas e nas amostras de tecido muscular de tilápia do Nilo

A determinação da concentração de zinco total nas amostras de tecido muscular de cada tratamento está apresentada na Tabela 2, onde fez-se por espectrometria de absorção atômica em chama (FAAS), por meio da digestão com ácido nítrico e peróxido de hidrogênio em forno de microondas, utilizando a metodologia descrita na literatura [27].

Tabela 2. Concentração de zinco total no tecido muscular de tilápia considerando os tratamentos utilizados no experimento.

GRUPO/ FONTE	Concentração de Zn (mg kg^{-1})		
	ZnC	ZnO	ZnI
G1 (24g)	3,70 ^{cC} $\pm 0,04$	5,03 ^{bC} $\pm 0,06$	6,33 ^{aC} $\pm 0,08$
G2 (74g)	4,33 ^{cB} $\pm 0,05$	16,90 ^{aB} $\pm 0,21$	15,90 ^{bA} $\pm 0,17$
G3 (85g)	4,82 ^{cA} $\pm 0,06$	19,00 ^{aA} $\pm 0,21$	12,40 ^{bB} $\pm 0,15$

Letras minúsculas distintas na linha diferem entre si pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$)

Letras maiúsculas distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$)

Coefficiente de variação: 1,34%

Comparando as fontes da Tabela 2 dentro de cada grupo observa-se que há diferença significativa para os três grupos, ou seja, no G1 tem-se a maior média para a fonte inorgânica ($6,33 \text{ mg kg}^{-1}$) e a menor para o zinco controle ($3,70 \text{ mg kg}^{-1}$); no G2 e G3, as maiores médias encontram-se na fonte orgânica, $16,90 \text{ mg kg}^{-1}$ e $19,00 \text{ mg kg}^{-1}$ e as menores para o zinco controle, $4,33 \text{ mg kg}^{-1}$ e $4,82 \text{ mg kg}^{-1}$, respectivamente. As menores concentrações encontradas para ZnC se deve pela fração presente ter sido proveniente dos ingredientes que compunham a dieta, dificultando a absorção intestinal, uma vez que o zinco provavelmente se encontra complexado ao ácido fítico [31]. E as maiores para ZnO podendo ser indicativo de que houve maior incorporação de zinco no tecido muscular nos peixes alimentados com fonte orgânica, diferentemente dos alimentados com zinco inorgânico. Trabalhos desenvolvidos utilizando diferentes fontes de zinco também para Tilápia do Nilo, demonstraram que a fonte inorgânica permitiu uma maior digestibilidade do zinco. No entanto, esses trabalhos não fizeram a determinação da concentração de zinco incorporado ao tecido muscular [32]. Os tecidos muscular e ósseo são as principais reservas de zinco, liberando possíveis excedentes em condições de deficiência [33].

Porém ao analisar os grupos dentro de cada fonte, tem-se que para o ZnC e ZnO as maiores médias foram para o grupo G3 com $4,82 \text{ mg kg}^{-1}$ e $19,0 \text{ mg kg}^{-1}$, e as menores para o G1 com $3,70 \text{ mg kg}^{-1}$ e $5,03 \text{ mg kg}^{-1}$, respectivamente. Diferentemente do ZnI que obteve a maior média para o G2 ($15,90 \text{ mg kg}^{-1}$) e a menor também para o G1 ($6,33 \text{ mg kg}^{-1}$).

Portanto quando avaliados peixes com os mesmos grupos, verificaram-se maiores concentrações de zinco no tecido para aqueles alimentados com fonte orgânica.

E ao avaliar os grupos dentro de cada fonte, observa-se que as maiores concentrações foram para animais de 85g alimentados com ZnC e ZnO e 74g quando alimentados com ZI. Contudo a ação positiva do zinco está relacionado ao aproveitamento do zinco dietético pela microflora bacteriana simbiótica intestinal [34, 35], logo, com o aumento do zinco disponível na microflora intestinal, essa se multiplica, promovendo a ação positiva sobre a morfologia e o funcionamento do epitélio absorptivo duodenal, aumentando a espessura da mucosa intestinal e conseqüentemente a área absorptiva [36]. Portanto como a fonte orgânica proporcionou maior concentração de zinco no tecido, significa que de fato houve maior absorção do zinco pela dieta no intestino.

3.2. Determinação da concentração de proteínas totais nos extratos dos pellets proteicos

Para determinar a melhor massa proteica a ser aplicada nas fitas isoeletricas garantindo assim uma boa resolução e separação dos spots nos géis, avaliou-se o teor proteico total nos extratos dos pellets de tecido muscular de tilápia do Nilo de todos os tratamentos, utilizando-se o método de Biureto, que se baseia na reação cobre(II) complexado com íons tartarato e os grupos peptídicos das proteínas em meio alcalino, formando um complexo quadrado planar que absorve com poucas interferências em 540 nm [37-38]. A curva analítica, com valores de 10 a 80 g L⁻¹, obtida a partir de solução padrão estoque de albumina bovina e utilizada para as determinações de proteína total nas amostras de tecido muscular é apresentada na Figura 1 e os resultados obtidos na Tabela 3.

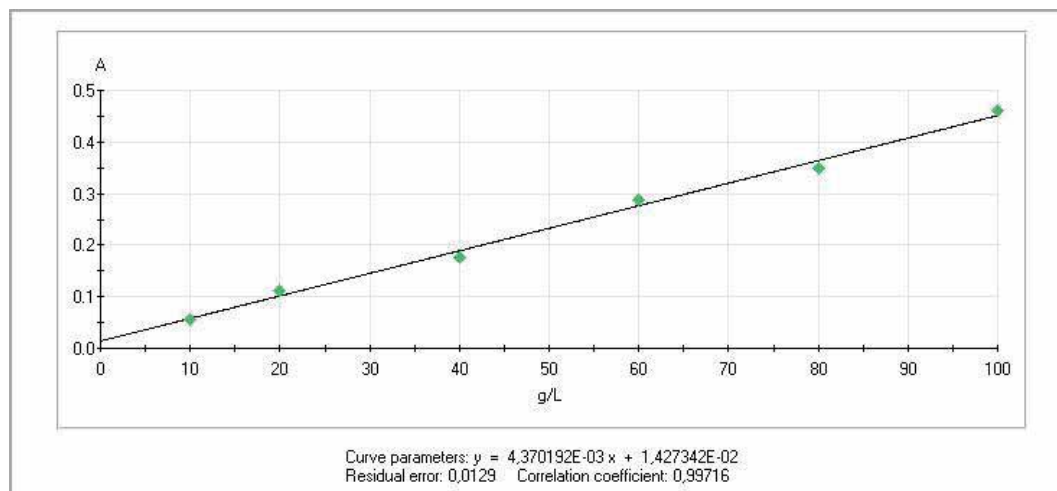


Figura 1. Curva analítica utilizada na determinação de proteína total nos extratos dos *pellets* proteicos.

Tabela 3. Concentração de proteína total obtida nos *pellets* de cada tratamento.

GRUPO/ FONTE	Concentração de Proteína (g L ⁻¹)		
	ZnC	ZnO	ZnI
G1 (24g)	31,867 ^{aB} ± 0,95	30,533 ^{aC} ± 0,80	28,833 ^{aC} ± 2,79
G2 (74g)	35,633 ^{bAB} ± 1,25	54,633 ^{aA} ± 2,55	51,133 ^{aA} ± 2,05
G3 (85g)	37,867 ^{aA} ± 1,19	39,567 ^{aB} ± 1,62	39,733 ^{aB} ± 1,87

Letras minúsculas distintas na linha diferem entre si pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$)

Letras maiúsculas distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$)

Coefficiente de variação: 4,64%

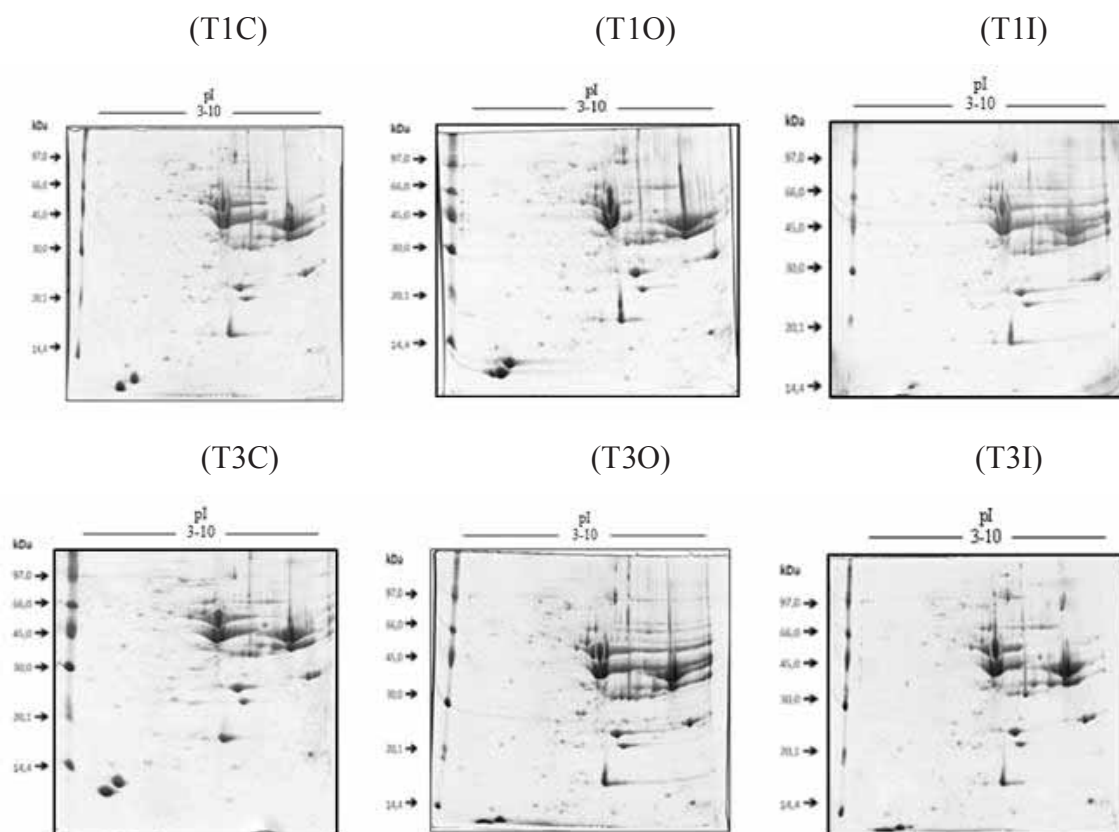
Na tabela 3 pode-se observar que ao analisar as fontes dentro de cada grupo, tem-se que para os grupos G1 e G3 não houve diferença significativa; houve apenas para G2 onde as maiores concentrações de proteínas foram para os peixes alimentados com ZnO e ZnI (54,633 g L⁻¹, 51,133 g L⁻¹) e a menor para ZnC (35,633 g L⁻¹).

E ao comparar os grupos dentro de cada fonte, observa-se que houve diferença significativa para as três fontes, sendo que as maiores concentrações foram 37,867 g L⁻¹, 54,633 g L⁻¹ e 51,133 g L⁻¹, para ZnC, ZnO e ZnI, respectivamente. As concentrações 54,6 g L⁻¹ e 51,1 g L⁻¹ do grupo 2, foram superiores aos demais, porém similares entre si, uma vez que ambos correspondem aos animais do mesmo grupo.

Com base nos resultados das concentrações de proteínas totais presentes nos extratos dos *pellets* proteicos das amostras dos nove tratamentos, conseguiu-se calcular o volume de amostra a ser aplicado nas fitas para uma massa de 375 μg de proteína em se tratando de fita de 13 cm [39].

3.3. Otimização das separações eletroforéticas

As corridas eletroforéticas de cada tratamento foram feitas com seis repetições considerando os nove tratamentos das amostras, onde se fez a correlação entre as mesmas, bem como a contagem dos spots proteicos. A Figura 2 apresenta um exemplo de gel obtido na corrida 2D-PAGE para cada tratamento. Os resultados das análises de correlação entre as repetições dos géis e a contagem dos spots são apresentados na Tabela 4.



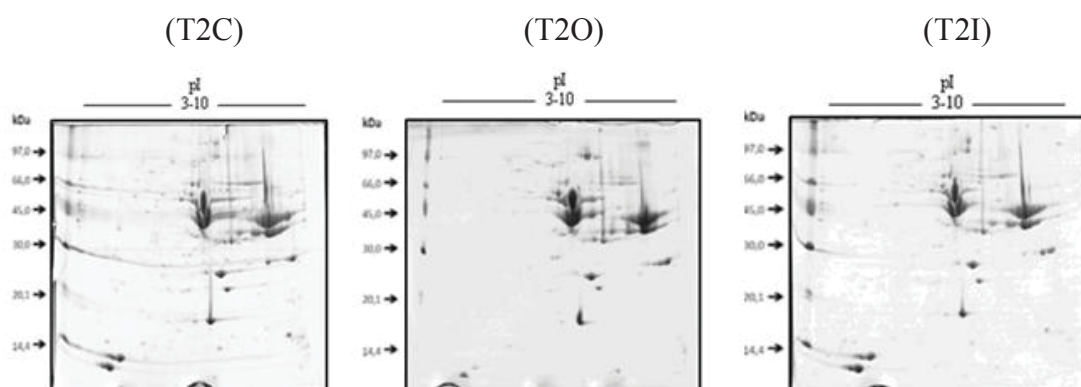


Figura 2. Exemplos dos géis de poliacrilamida a 12,5% do músculo de tilápia do Nilo obtidos nos tratamentos.

Tabela 4. Análise de correlação entre as repetições dos géis de poliacrilamida a 12,5% do músculo de tilápia do Nilo obtidos nos tratamentos.

Gel	Nº médio de spots	Correlação média entre os géis
T1C	331±26	78±6%
T1O	373±28	63±4%
T1I	305±24	67±5%
T3C	232±18	62±4%
T3O	346±27	74±6%
T3I	318±25	73±5%
T2C	287±21	75±6%
T2O	292±22	77±6%
T2I	204±15	72±5%

Conforme mostra a Figura 2 (T1C-T3I), os géis de tecido muscular de tilápia do Nilo dos tratamentos apresentaram uma grande diversidade de spots proteicos e boa resolução na região com pI entre 3 e 6 com massa molar de 14-45 kDa e de 66-97 kDa, demonstrando que a separação das proteínas foi eficiente, exceto na região com pI entre 6 e 10 e massa molar de 45-66 kDa onde se verificou grande concentração de spots, os quais não tiveram uma boa separação. Contudo, na região onde ocorreu um bom fracionamento das proteínas (pI entre 3 e 6), observou-se que a maioria dos spots

aparecem em todos os tratamentos, exceto na região entre 20-30 kDa, onde nos tratamentos inorgânicos não apareceram.

As análises de correlação entre os géis obtidos demonstraram que, em média, 78 a 62% dos spots proteicos estão presentes entre as repetições dos géis das amostras de tecido muscular. Além disso, o número médio de spots encontrados nos géis apresentaram desvio padrão relativamente menor que 10%, o que é considerado muito bom no fracionamento de proteínas por 2D-PAGE [39, 40].

3.4. Detecção e seleção dos spots

Os parâmetros utilizados para a obtenção das imagens influenciam diretamente na qualidade da mesma. Resoluções inferiores à utilizada levam a perda de informações neste estudo (definição de imagem) e não são recomendadas. Ampliação (zoom) menor que o utilizado leva à inabilidade de se resolver a imagem, e quando superior ao utilizado apenas aumenta o tamanho do arquivo e não traz informações relevantes. O parâmetro *depth*, deve ser pelo menos 12 bits, porque pode-se obter imagens com mais detalhes do gel [23].

Embora o ajuste feito melhore a visualização da imagem para o analista, não afeta a latente dos dados. O que mais influencia a qualidade dos dados é a adequada edição manual. O *smooth*, que fixa o número de vezes que o programa irá homogeneizar a região selecionada antes de seguir a detecção, deve ser otimizado de forma a detectar spots reais. A *saliency*, que é uma medida baseada na curvatura do spot e que serve como um filtro para o algoritmo do programa selecionar os spots reais, deve ser ajustada para que os spots reais apresentem saliência maior que a do fundo. A *min area* (minimização da área), que é utilizado para eliminar regiões menores que a indicada, possibilita também, que partículas do gel com pixels muito escuros sejam eliminadas.

Portanto, o ajuste adequado destes parâmetros resulta em um processo de detecção eficiente. Por esse motivo, a edição manual dos spots do gel é indispensável para se fazer a seleção dos mesmos. A edição manual visa eliminar spots falso positivos, inserir spots falso negativos e efetuar correções quanto à delimitação das regiões dos spots, as quais devem ser aproximadamente circulares ou elípticas [40]. Pode-se compreender melhor este processo ao observar a Figura 3, gerada a partir do

tratamento da imagem com spots selecionados a ferramenta para visualização em 3D de pequenas regiões do gel.

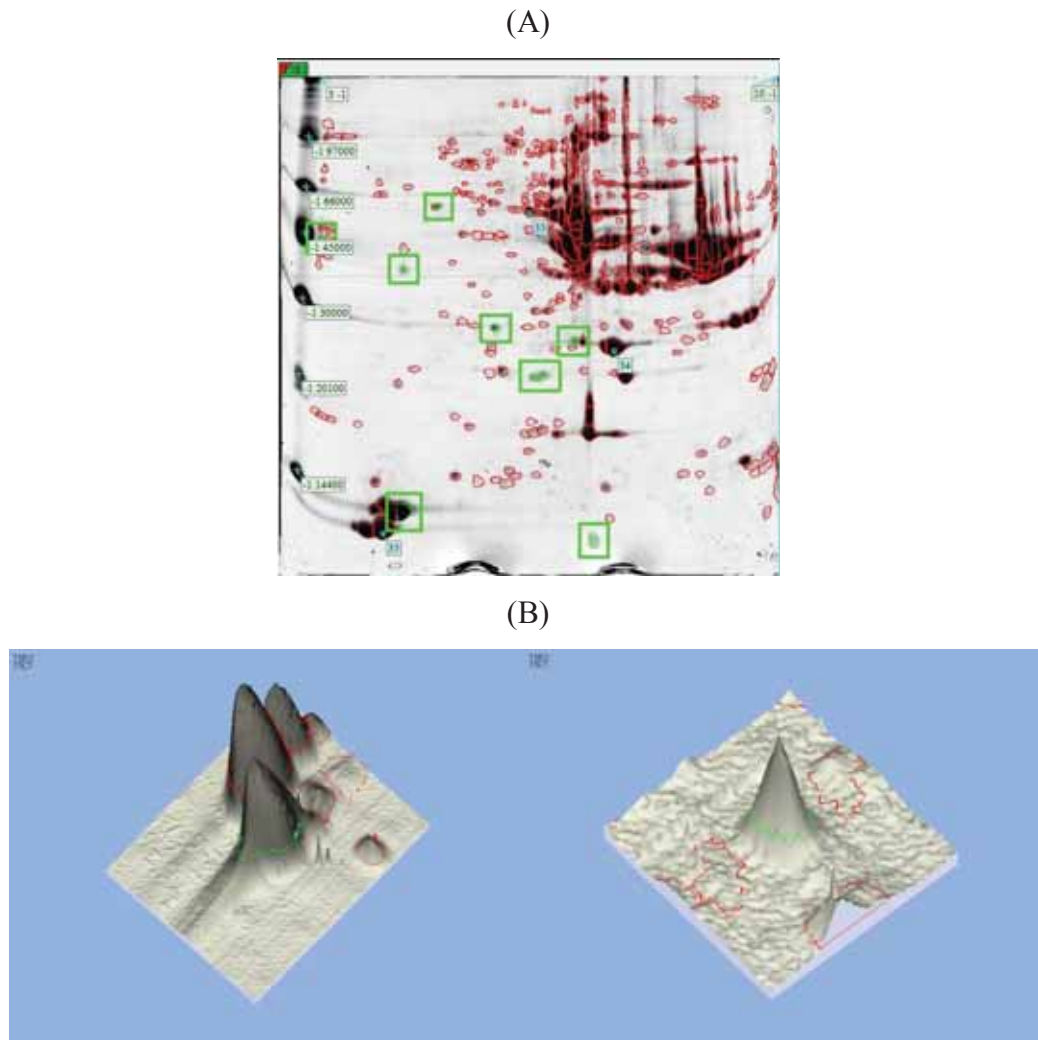


Figura 3. (A) Tratamento da imagem do gel de poliacrilamida; (B) Visualização de dois spots selecionados em 3D.

3.5. Concentração de zinco nos spots proteicos

As concentrações de zinco nos spots obtidos nas corridas por 2D-PAGE dos extratos dos pellets proteicos foram determinadas utilizando-se o método por GFAAS [41]. Essas determinações indicaram a presença de zinco em vários spots proteicos. A Tabela 5 apresenta os resultados obtidos nessas determinações e a figura 4 ilustra os spots identificados no gel.

Tabela 5. Concentração do zinco nos spots para os tratamentos

Spot	T1C (ppb)	T1O (ppb)	T1I (ppb)	T3C (ppb)	T3O (ppb)	T3I (ppb)	T2C (ppb)	T2O (ppb)	T2I (ppb)
1	6,10	--	--	4,20	497,60	23,90	92,60	22,60	--
1B	--	0,48	52,90	--	228,30	--	--	11,90	--
3	20,80	--	87,00	--	161,40	--	8,30	10,50	--
4A	--	--	--	--	417,50	--	--	--	--
5	--	--	--	13,60	337,20	164,20	--	17,80	--
6	8,70	--	129,00	--	185,60	--	67,95	11,35	--
6C	41,25	14,75	50,30	--	182,30	19,90	10,20	17,30	--
7	--	61,65	0*	14,80	--	2,15	--	29,75	--
8A	--	30,50	50,40	--	--	9,20	26,00	--	--
9A	--	46,25	69,95	--	--	42,40	--	3,40	--
10	--	9,80	--	--	346,00	--	--	54,60	--
11	--	1,00	--	--	274,30	--	--	24,00	116,20
11A	--	45,40	51,80	--	185,75	1,65	26,75	22,00	77,95
12	--	37,60	--	--	--	--	--	144,90	--
12A	--	15,00	62,00	--	164,80	19,40	--	91,20	--
13	--	20,70	--	--	355,95	--	--	--	--
13A	--	152,20	--	--	--	--	--	--	--
15	--	29,00	--	--	177,30	--	--	34,70	--
17	--	6,45	--	--	--	--	--	41,20	--
18	--	20,60	--	--	191,20	--	--	76,90	--
20	--	55,90	55,50	--	126,10	5,30	--	9,00	--
21	--	56,50	112,40	--	--	--	--	10,50	50,30
22	--	37,20	--	--	--	--	--	44,50	--
23	95,00	10,85	--	--	84,70	--	--	16,20	--
24A	--	53,60	--	--	--	--	--	31,50	--
25	--	39,40	80,80	16,70	--	--	--	30,00	3,30
26	5,10	--	170,80	--	--	--	--	38,90	343,50
26A	--	26,80	--	--	--	--	--	22,20	--
27	--	--	--	--	--	--	--	79,80	--
28	32,15	10,10	--	--	--	--	--	76,80	--
30	12,40	22,40	73,75	--	--	14,10	--	113,75	--
31	12,29	28,30	66,60	--	--	15,00	--	41,35	47,00
32	--	--	118,55	--	--	30,10	--	93,35	77,80
33	74,75	--	107,05	--	11,00	--	--	64,30	31,70
39	--	--	70,60	--	--	--	--	92,60	43,50
40	2,50	--	51,55	--	--	--	--	--	47,80
40A	--	1,15	--	--	--	--	--	29,70	--
41	--	--	67,50	--	--	--	--	46,60	4,40
43	--	--	--	--	--	--	--	--	--

(--)- menor que o limite de quantificação (<lq)

T1C – Peixes de 24 g alimentados com zinco controle (isento de zinco); T1O – Peixes de 24 g alimentados com zinco orgânico (bioplex); T1I – Peixes de 24 g alimentados com zinco inorgânico (sulfato de zinco); T43C – Peixes de 85 g alimentados com zinco controle (isento de zinco); T3O – Peixes de 85 g alimentados com zinco orgânico (bioplex); T3I – Peixes de 85 g alimentados com zinco inorgânico (sulfato de zinco); T2C – Peixes de 74 g alimentados com zinco controle (isento de zinco); T2O – Peixes de 74 g alimentados com zinco orgânico (bioplex); T2I – Peixes de 74 g alimentados com zinco inorgânico (sulfato de zinco).

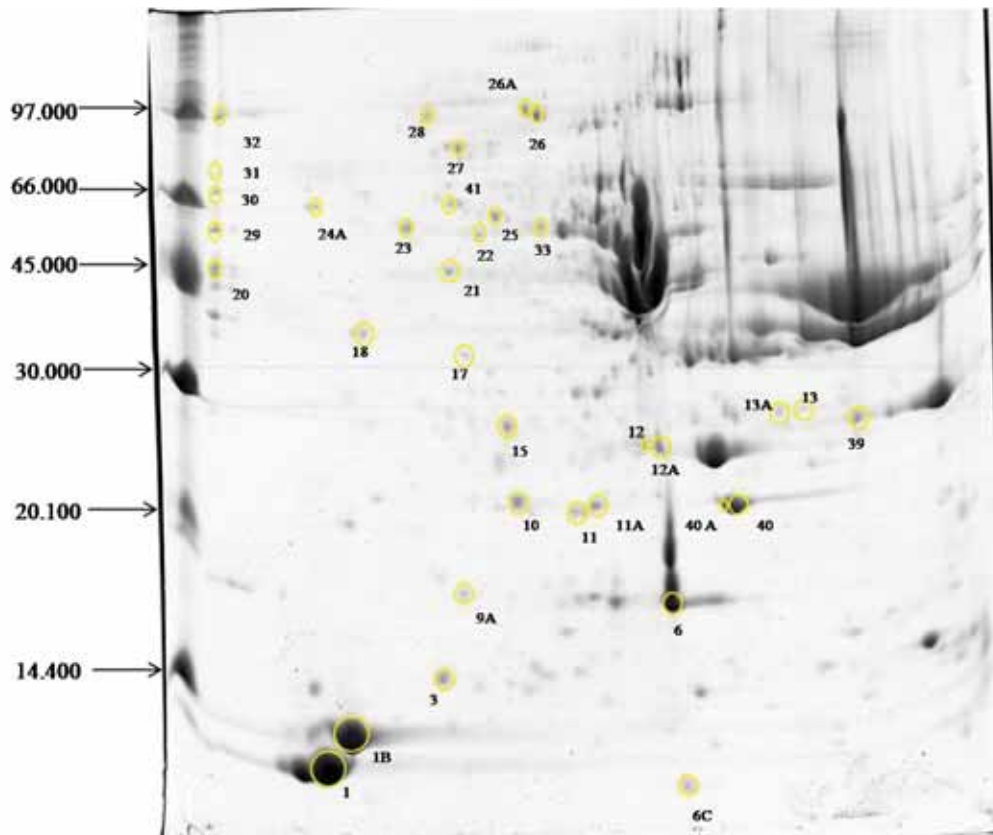


Figura 4. Spots proteicos do tecido muscular de tilápia do Nilo onde o zinco foi identificado.

As concentrações de zinco foram de 0,48 a 152,20 ppb (T1O); 50,30 a 170,80 ppb (T1I); 11,01 a 497,60 ppb (T3O); 2,15 a 164,20 ppb (T3I); 3,40 a 144,90 ppb (T2O) e 3,30 a 343,50 ppb (T2I). E o número de spots que apresentaram Zn foram 26, 19, 17, 13, 33 e 11, para os tratamentos 1O, 1I, 3O, 3I, 2O e 2I, respectivamente.

Observa-se que são poucos os spots que coincidem a presença do Zn em todos os tratamentos, exceto para o spot 11A onde a maior concentração foi para o T3O com 185,80 ppb e a menor para o T3I com 1,60 ppb, independente do grupo. Porém, para os peixes de 24 g e 75 g, as maiores concentrações foram para aqueles alimentados com zinco inorgânico, exceto em cinco spots (25, 32, 33, 39 e 41), o que pode sugerir que o zinco da fonte inorgânica, que está na forma de Zn^{2+} , pode ter mais afinidade pelos sítios de coordenação das proteínas presentes nos spots proteicos.

Entre os spots com Zn tanto para T1O quanto T1I (1B; 6C; 8A; 9A; 11A; 12A; 21; 25; 30 e 31), verificou-se as maiores concentrações para o T1I, ou seja, peixes de 24 g alimentados com fonte inorgânica obtiveram maiores concentrações de Zn nos spots

proteicos. Comparando os spots 5; 6C; 11A; 12A e 20 entre os tratamentos T3O e T3I verificou-se maiores concentrações nos spots proteicos para o T3O, que corresponde aos peixes de 85 g alimentados com zinco orgânico. Diferentemente desses resultados, quando os spots em comum de T2O e T2I foram analisados (11; 11A; 21; 25; 26; 31; 32; 33; 39 e 41), observou-se que cinco das maiores concentrações determinadas foram para T2O, nos spots 25; 32; 33; 39 e 41 e as outras cinco para T2I, nos spots 11; 11A; 21; 26 e 31. Portanto, para os peixes com 74 g, as maiores determinações de zinco foram obtidas tanto para os alimentados com fonte orgânica, quanto para fonte inorgânica.

Confrontando os três grupos para cada fonte de zinco oferecida, resumiu-se os dados nas tabelas 6 e 7, onde estão ilustrados nas Figuras 5, e 6 para melhor visualização das diferentes concentrações.

Tabela 6. Concentração de zinco nos spots proteicos separados de acordo com as fontes.

Spot	T1C (mg kg ⁻¹)	T2C (mg kg ⁻¹)	T3C (mg kg ⁻¹)
1	0,003	0,0542	0,0016
	T1O (mg kg ⁻¹)	T2O (mg kg ⁻¹)	T3O (mg kg ⁻¹)
1B	0,0003	0,0085	0,219
6C	0,157	0,178	4,259
11	0,017	0,221	5,315
11A	1,253	0,266	4,360
12A	0,214	0,81	2,710
15	0,427	0,464	3,358
18	0,786	0,698	9,755
20	0,514	0,168	3,408
23	0,184	0,219	1,206
	T1I (mg kg ⁻¹)	T2I (mg kg ⁻¹)	T3I (mg kg ⁻¹)
11A	1,087	1,422	0,054
31	3,331	1,373	1,100
32	2,370	0,518	0,529

Analisando a concentração de zinco para cada fonte fornecida, verifica-se que para a fonte de zinco orgânica (T1O, T3O e T2O), as concentrações nos spots do T3O

foram bem superiores, variando de 0,219 a 9,755 mg kg⁻¹. Já para os T1O e T2O, as concentrações variaram de 0,0003 a 1,253 mg kg⁻¹ e 0,0085 a 0,698 mg kg⁻¹, respectivamente. Portanto, tem-se que T3O > T2O > T1O na concentração de zinco dos spots, o que confere com a concentração de zinco total no músculo, conforme discutido no item 3.1, exceto para os spots 11A, 18 e 20. Pode-se dizer que a concentração do zinco, tanto nos spots quanto no tecido, é diretamente proporcional à fase de crescimento em que o animal se encontra, em se tratando daqueles alimentados com fonte de Zn orgânica. Diferentemente para a fonte inorgânica (T1I, T2I e T3I), onde as maiores concentrações foram para G1 nos spots 31 e 32 com 3,331, e 2,370 mg kg⁻¹ exceto para o spot 11A e as menores para G3 com 0,054 mg kg⁻¹, 0,529 mg kg⁻¹ e 1,10 mg kg⁻¹. Tem-se portanto que T1I > T2I > T3I na concentração de zinco dos spots, o que confere parcialmente com a concentração de zinco no músculo, discutido na tabela 2 .

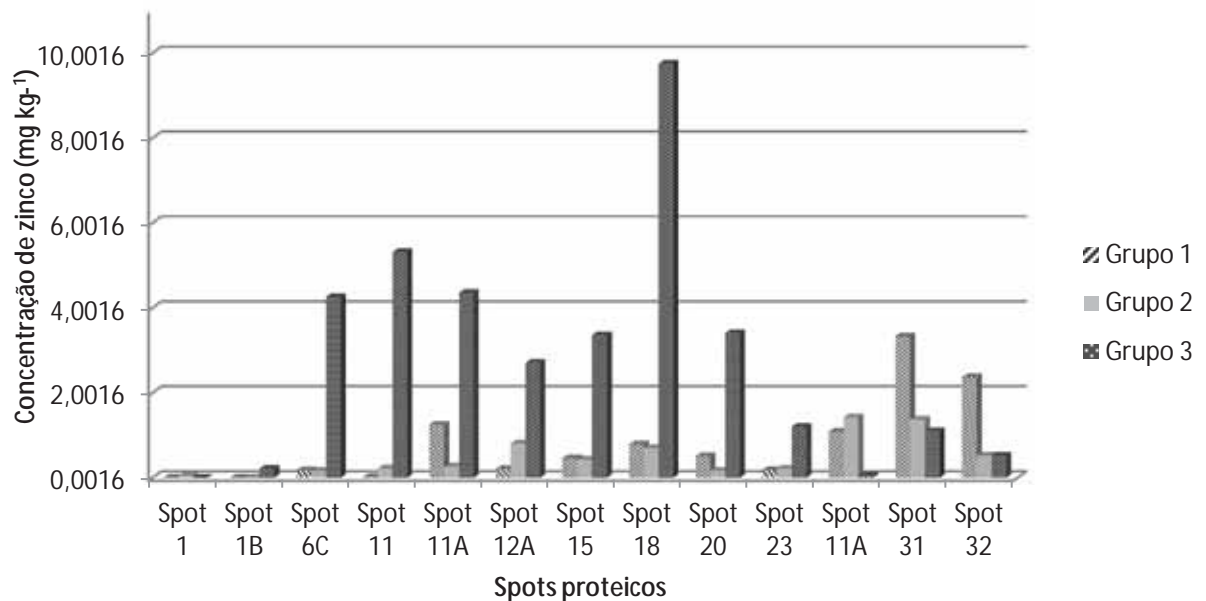


Figura 5. Concentração de Zn dos spots destacados dos peixes dos grupos 1, 2 e 3

Tabela 7. Concentração de zinco nos spots proteicos separados de acordo com os grupos.

Spot	T1C (mg kg ⁻¹)	T1O (mg kg ⁻¹)	T1I (mg kg ⁻¹)
6C	0,528	0,085	0,661
30	0,213	0,362	2,290
31	0,357	0,975	2,775
	T2C (mg kg ⁻¹)	T2O (mg kg ⁻¹)	T2I (mg kg ⁻¹)
11A	0,514	0,314	1,343
	T3C (mg kg ⁻¹)	T3O (mg kg ⁻¹)	T3I (mg kg ⁻¹)
1	0,0016	0,210	0,04
5	0,272	11,24	5,401

Na tabela 7 observa-se que para os grupos 1 e 2, as maiores concentrações de zinco nos spots proteicos foram para os animais alimentados com ZnI: 0,661 mg kg⁻¹, 2,290 mg kg⁻¹ e 2,775 mg kg⁻¹ nos spots 6C, 30 e 31, respectivamente para o G1 e 1,343 mg kg⁻¹ no spot 11A para o G2. E para o G3, as maiores concentrações foram para os alimentados com ZnO, sendo 0,210 mg kg⁻¹ e 11,24 mg kg⁻¹ nos spots 1 e 5. Ou seja, animais de 24 e 74g alimentados com ZnI possuem maiores concentrações de zinco nos spots proteicos, diferentemente dos com 85g que as maiores concentrações estão naqueles alimentados com ZnO. Concordando com os resultados das concentrações de zinco no tecido muscular discutido na tabela 2, exceto para o grupo 2.

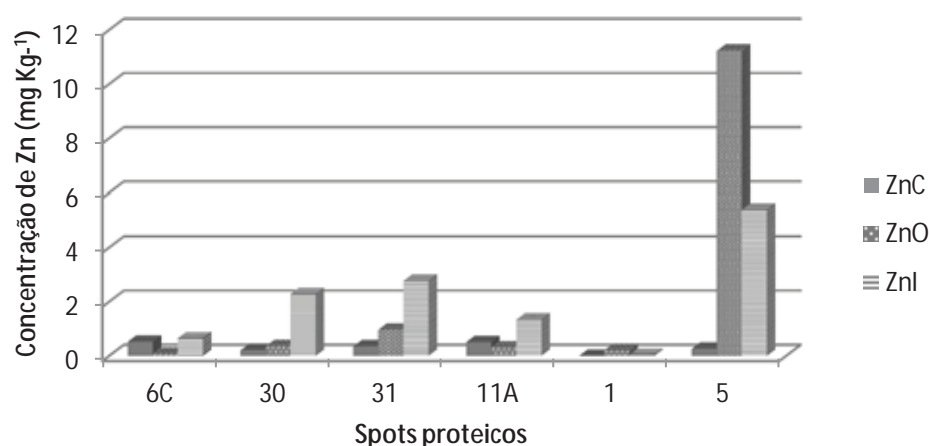


Figura 6. Concentração de Zn nos spots proteicos destacados dos animais alimentados com ZnC, ZnO e ZnI.

3.6. Caracterização das proteínas

Após as etapas de fracionamento das proteínas por 2D-PAGE, análise das imagens dos géis e avaliação quantitativa do zinco nos tecidos musculares dos tratamentos e nos spots proteicos, estes foram caracterizados através da espectrometria de massa. Assim, a partir das condições experimentais descritas no item 2.8, os spots caracterizados apresentados na tabela 8 são aqueles referentes aos spots das tabelas 6 e 7. Desses 15 spots nos quais foi identificada a presença de zinco, apenas 3 não puderam ser caracterizados. Alguns dos spots referentes a tabela 5 estão apresentados em anexo.

Na análise de caracterização de spots proteicos, foi encontrada mais de uma proteína na busca no banco de dados, o que pode ocorrer com base em trabalhos da literatura [37]. No entanto, foi considerando o maior *score* e/ou cobertura e, principalmente os dados de massa molar e pI obtidos por 2D-PAGE (experimental) em relação à massa molar teórica obtidas no banco de dados *Uniprot* (www.uniprot.org). A Tabela 8 apresenta os dados de caracterização obtidos na análise por ESI MS/MS como a provável proteína identificada com base nas condições descritas acima. Em relação às proteínas não identificadas em 2 spots proteicos, no caso, se deveu ao fato de se encontrar mais de uma possibilidade possível para a sequência de peptídeos.

Tabela 8. Proteínas identificadas por ESI MS/MS em amostras de tecido muscular dos três grupos de peixes

Spot	Proteína	Acesso	Score	pI/MM experimental	MM massas	MM teórica	Cobertura (%)	Pepídeos Sequenciados
1	Parvalbumin beta	P02618	281.426	3.86/ 11817.2	12109.9331	11.436	32.41	AFAIIDQDK AFAGVLNDADIAAALEACK SADDVKK
1B	60S ribosomal protein L34	Q7ZW17	138.0635	4.22/ 8269.4	14474.2055	13.369	11.11	AFLIEEQK TPGNR
3	Não identificado							
5	Não identificado							
6C	Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a	P68200	1659.622	7.33/ 11484.6	19764.3451	17.999	11.54	ESTLHLVLR EGIPDQQR ESTLHLVLR ESTLHLVLR ESTLHLVLR ESTLHLVLR
11	Adenylate kinase isoenzyme 1	P12115	271.9184	6.29/ 21645.06	22550.0651	21.489	14.95	YGYTHLSSGDLR GYLIDGYPR AETMVQR
11A	Adenylate kinase isoenzyme 1	P12115	5180.128	6.48/ 22035.6	22550.0651	21.489	29.38	YGYTHLSSGDLR GYLIDGYPR GELVPLDITVLDMIK QLQAIMQK AEVASSGER IVEKYGYTHLSSGDLR
12A	Triosephosphate isomerase	Q589R5	516.0374	6.9/ 25033.2	28160.8114	27.113	29.03	GAFTGEISPAMIK HVGENDELIGQK VAHALESDSLVIACIGEK VVLAYEPVWAJGTGK VVLAYEPVWAJGTGKTATPEAQAEVHEK
15	Guanidinoacetate N-methyltransferase	Q71N41	295.5476	5.71/ 26399.4	28019.8889	26.743	26.92	WETPYMHSLATVAASK VLEIGFGMAIAATK MFQETQVPHLLEAGFK EKISTLLMDISPSECK
18	Tropomyosin alpha-1 chain	P84335	941.5957	4.32/ 35793.06	34521.9563	32.730	34.15	LVIEGDLER IQLVEEELDR AFAER ATDAEGDVASLNRRL QLEDDLVALQK HIAEEADR ENALDR IQLVEEELDRAQER AISEELDHALNDMTSI MELQEIQLKEAK
20	Hemoglobin subunit alpha-B	Q9PVM3	119.746	3.09/ 44698.6	16549.7568	15.948	5.56	VALALAEER
23	ATP synthase subunit beta. mitochondrial	Q9PTY0	10180.07	4.85/ 57379.8	56423.6529		61.39	LVLEVAQHLGENTVTR FTQAGSEVSALLGR VALTGLTVAEYFR AHGGYSVFAVGGER IPVGPETLGR VLDTGAPIR VALVYGMNPPGAR TIAMDGTGLEGLR IMNVIGEPIDER GSITSVQAIYVPADDLTDPAPATTF AHLDAITVLSR IMDPNIVGSEHYDVAR TVLIMELINNVAK EGNDLYHEMIESGVINLK TREGNDLYHEMIESGVINLK IPSAVGYQPTLATDMGTMQER DQEGQDVLFLFDNIFR LTVAR AIAELGIYPVAVDPLDSTSI QTAPIHAEAPEFTDMSVEQEILVTGIK LAEHS VLDTGAPIRIPVGPETLGR IMNVIGEPIDERGPITTK SLQDIILGMDELSEEDKLTVAR DQEGQDVLFLFDNIFRFTQAGSEVSALLGR

TIAMDGTEGLVR VALVYQMNPPGAR IMNVIGEPIDEI
 IPSAVGYQPTLATDMGTMQER IMDPNVIGSEHYDVAR
 IMNVIGEPIDERGPITTK
 AHGGYSVFAGVGER

30 Hemoglobin subunit alpha-B Q9PVM3 259.9112 3.04/
56179 16549.7568 15.948 15.28 VALALAER MLVAYPQTK SLSAK

31 Alpha-endosulfine Q1L8X2 43.8794 3.05/
70637.2 14831.8836 13.756 13.71 YPSLGHKPGGSDFLMKR

32 Não identificada

Hemoglobin subunit alpha-B

Envolvida no transporte de oxigênio a partir das brânquias para os vários tecidos periféricos no caso de peixes [38], porém como o oxigênio é pouco solúvel em soluções aquosas e não conseguiria ser transportado aos tecidos em quantidades suficientes se fosse simplesmente dissolvido no sangue. Para isso, os organismos exploram as propriedades dos metais, principalmente o ferro, incorporado em um grupo prostético ligado a proteína, chamado de heme. Este consiste em uma estrutura orgânica complexa em anel, a protoporfirina, (precursor da parte da hemoglobina) a qual se liga um único átomo de ferro no seu estado ferroso (Fe^{2+}). Este íon pode fazer seis ligações coordenadas, no caso do complexo heme, quatro átomos de nitrogênio, que são parte do sistema achatado do anel da porfirina e duas ligações perpendiculares são feitas com um átomo de oxigênio e com uma globina fora do grupo heme. Os átomos de nitrogênio coordenados (que possuem um caráter doador de elétrons) ajudam a impedir a conversão do ferro do grupo heme ao estado férrico (Fe^{3+}) [39].

O Heme é formado no eritrócito em maturação pela incorporação de um íon ferroso à protoporfirina IX por meio de uma reação catalizada pela ferroquelatase. Normalmente a Zn-PP é formada em pequenas quantidades durante a síntese do Heme. Ela se liga à globina no local do Heme circulando na célula madura na qualidade de metaloporfirina não-funcionante. Se houver suficiente Ferro disponível no substrato, o íon Zinco é substituído na reação com protoporfirina IX. O Zn-PP formado nesse processo de quelação é estável e permanece no eritrócito circulante. O nível de Zn-PP intracelular é, pois, um indicador funcional da disponibilidade de Ferro durante a maturação eritrocítica [40].

Além do zinco se ligar à globina no lugar do ferro, embora não funcionante, mas como qualquer outra metaloproteína, as hemoglobinas apresentam em suas sequências peptídicas cadeias terminais com átomos de nitrogênio que podem formar ligações não específicas com outros íons metálicos divalentes, como o zinco, e caracterizando nesse caso, uma proteína do tipo *metal-binding* [38,41].

Os spots 20 e 30 foram caracterizados como sendo uma *Hemoglobin subunit beta-A/B*, proteína relacionada ao transporte com zinco identificado em sua estrutura, possivelmente pela baixa concentração de Fe presente no meio, favorecendo a ligação do zinco. Em estudos observaram que as concentrações de ferro corporal de tilápia do

Nilo apresentaram correlação negativa com a suplementação de zinco [42]. Possivelmente essa proteína pode ser uma candidata a biomarcador de zinco

Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a

As ubiquitinas são polipeptídeos envolvidos no controle do ciclo celular, na replicação do DNA e na resposta ao estresse através da rota proteolítica dependente da ubiquitina [43]. A proteína ribossomal S27a é componente da subunidade 40S do ribossomo e tem como função molecular se ligar à íons metálicos como zinco, além de ser parte constituinte do ribossomo, pois apresenta domínios com grupos específicos para ligação de zinco (*zinc-finger metal binding domains*) [44].

Essa proteína relacionada com a estrutura e organização estrutural foi caracterizada no spot 6C onde o zinco foi identificado a incorporação do mesmo em sua estrutura, podendo ser considerado um possível biomarcador de zinco.

Alpha-endosulfine

Alfa Endosulfine (Ensa) pertence à família endosulfine. É uma fosfoproteína regulada por cAMP altamente conservada (ARPP) família, sendo amplamente expresso em níveis elevados no músculo esquelético e no cérebro e os níveis mais baixos no pâncreas. Como um inibidor de proteína fosfatase, Ensa inibe especificamente a proteína fosfatase 2A (PP2A), durante a mitose. Quando fosforilada em Ser-67 durante a mitose, interage especificamente com PPP2R2D (PR55-delta) e inibe a sua atividade, levando a inativação de PP2A, condição essencial para manter-B1-CDK1 ciclina com alta atividade durante a fase M por similaridade. Ensa também atua como um estimulador da secreção de insulina por interagir com o receptor de sulfonilureia (ABCC8), impedindo assim a sulfonilureia de se ligar ao seu receptor e reduzindo K (ATP) as correntes de canal [45].

Propuseram que endosulfine é um regulador endógeno do canal de K (ATP) , que tem um papel chave no controle da libertação de insulina [46-47].

Essa proteína caracterizada no spot 31 não apresenta o zinco como parte de sua estrutura ou função, no entanto foi identificado o íon como parte da estrutura dessa proteína. Apesar dessa proteína não apresentar sítios de coordenação específicos para o zinco (no caso, grupos tióis e/ou sulfidrilas, bases moles), pode-se inferir que o zinco

pode estar ligado a algum nitrogênio terminal, que por se tratar de uma base intermediária, pode ter afinidade por íons Zn^{2+} caracterizando proteína do tipo *metal binding* [48,49]

Parvalbumin beta

Apresenta as isoformas *parvalbumin-2*, *parvalbumin alfa* e *parvalbumin beta*, todas as três isoformas normalmente se ligam a íons cálcio. Essa proteína está diretamente envolvida em processos de relaxamento muscular após ocorrência de contração. Essa proteína é basicamente formada por sequências peptídicas que contém serina e alanina – aminoácidos que apresentam estruturas com grupos carboxílicos, amino e hidroxila, suscetíveis à complexação de íons metálicos divalentes, principalmente cálcio e magnésio [50].

Essa proteína foi caracterizada nos spot 1, onde o zinco foi identificado, porém a literatura até o momento não apresenta nenhum trabalho que discute a possibilidade da ligação de zinco na *parvalbumin* ou em suas isoformas. No entanto, por essa proteína apresentar sítios de ligações de metais divalentes disponíveis, podem formar ligações com íons Zn^{2+} [49,50]. Dessa forma, pode-se inferir que o zinco pode ter se incorporado às isoformas da *parvalbumin* por ligações não específicas formando uma proteína *metal-binding*, não sendo configurado como um cofator metálico [49].

Adenylate kinase isoenzyme 1

Relacionada à homeostasia energética, a adenilatoquinase (AK) catalisa a transferência reversível de fosfatos entre ATP e AMP, conforme a reação: $2ADP \leftrightarrow ATP + AMP$ [51].

As moléculas envolvidas na reação da AK também influenciam na sinalização metabólica celular, principalmente o AMP que sinaliza produção de ATP pela via glicolítica [52]. No tecido muscular a AK é responsável pela rede de fosforiltransferência, ou seja, ela atua na transferência de grupamento fosforil do ATP da mitocôndria para o citosol, garantindo um fluxo de energia para os locais de demanda energética, uma vez que o ATP parece ser pouco difundido pela célula após sua produção, necessitando de um translocador macroaniônico [53].

Cada isoforma possui distribuição tecido-específica e localização subcelular [52,54], sendo seis isoenzimas para a adenilatoquinase (AK 1 a AK6), atuando na manutenção das concentrações de ATP, ADP e AMP, sendo no caso a AK 1, encontrada no citosol.

Em resumo, AK assim distribuída nos microambientes celulares auxilia na manutenção das concentrações de ATP, ADP e AMP.

Essa proteína está diretamente relacionada com o tecido muscular dependendo da regeneração dos níveis de ATP a partir de moléculas de ADP e da oxidação metabólica dos principais nutrientes celulares

Essa proteína foi caracterizada nos spots 10, 11 e 11A, onde o zinco foi identificado na sua estrutura, apesar dessa proteína não apresentar sítios de coordenação específicos para o zinco (no caso, grupos tióis e/ou sulfidrilas, bases moles), pode-se inferir que o zinco possa estar ligado a algum nitrogênio terminal, que por se tratar de uma base intermediária, pode ter afinidade por ions Zn^{2+} caracterizando proteína do tipo *metal binding* [49, 55].

Triosephosphate isomerase

Triose Fosfato Isomerase (EC 5.3.1.1) é uma enzima, pertencente à classe das isomerases e sub-classe das oxidoreduases intramoleculares [56]. A TPI apresenta-se em sua forma ativa como homodímero, sendo responsável pela conversão reversível de diidroxiacetona fosfato em gliceraldeído 3-fosfato. Esta reação está relacionada com importantes vias metabólicas, como glicólise, gliconeogênese e síntese de ácidos graxos, responsáveis principalmente pela produção de energia [56-57].

A presença de alguns resíduos de aminoácidos altamente conservados na seqüência de TPI tem sido útil na caracterização de novas seqüências depositadas em bancos de dados. Três principais resíduos, Lys13, His95 e Glu167, são responsáveis pela formação da região catalítica da molécula [58];[59]. Os resíduos conservados Arg191 e Asp227, são descritos como essenciais na formação e estabilização da estrutura dimérica [60].

O spot 12A foi caracterizado como sendo essa proteína, onde o zinco foi identificado em sua estrutura, possivelmente por formar compostos de coordenação com

as cadeias laterais dos aminoácidos, como a histidina ou glutamato, atuando como cofactor co-catalítico atuando diretamente no mecanismo de catálise [61].

Tropomyosin alpha 1 chain

A tropomiosina é uma molécula longa e fina, formada por duas cadeias polipeptídicas com arranjo em dupla hélice, em orientação paralela, localizada ao longo do sulco entre os filamentos de actina F. Duas isoformas são encontradas, a tropomiosina α com variação rápida e lenta, e a tropomiosina β . A troponina é um complexo protéico formado por três subunidades no músculo esquelético (TnC, TnI e TnT), com funções específicas, sendo que a troponina C (TnC), é a subunidade em que o cálcio se liga, sendo essencial para a ligação com a miosina, possui duas isoformas TnC rápida, com quatro ligações para o cálcio, a TnC lenta, com uma ligação para o cálcio. A troponina I (TnI) que inibe a ação da actina e a atividade da ATPase, no músculo esquelético temos duas isoformas a TnI rápida e a lenta. A troponina T (TnT) faz a ligação com a tropomiosina, também tendo duas isoformas presentes no músculo esquelético, a TnT rápida e lenta. Temos ainda a tropomodulina, proteína que mantém os filamentos de actina em seu comprimento, não havendo evidências de isoformas. O filamento grosso representado pela miosina, e pelas proteínas (proteína C, proteína H, proteína M e miomesina) que se encontram ligadas a essas, servindo de apoio e contribuindo para a integridade do sarcômero.

Essa proteína relacionada à estrutura ou organização de filamentos de actina no citoesqueleto caracterizada no spot 18. A literatura não relata a presença do zinco como grupo prostético dessa proteína, porém o íon foi identificado na sua estrutura possivelmente porque minerais com similaridades químicas podem competir pelo transporte protéico, facilitando ou impedindo a absorção destes [62], ou seja, o zinco pode ter se ligado a troponina mesmo sendo um sítio ativo para cálcio.

ATP synthase subunit beta mitochondrial

A *ATP synthase mitochondrial* (EC 3.6.3.14) é uma ATPase composta por dois domínios estruturais do tipo F (Fo e F1). Fo é um complexo integral localizado na membrana interna da mitocôndria, responsável pela translocação de prótons. Já F1 é extramembranar, formados por 9 subunidades, sendo que cada subunidade apresenta 3

domínios (N-terminal, de ligação a nucleotídeo e C-terminal), possuindo mudanças conformacionais extremamente necessárias para a síntese de ATP, uma vez que as unidades α e β giram, catalisando assim a formação de ATP. Portanto, uma unidade β inicia com a conformação β -ADP que tem afinidade pelo ADP+Pi que ao se ligarem muda a conformação para β -ATP, o qual estabiliza o ATP promovendo o equilíbrio do ADP+Pi com o ATP na superfície da enzima. Posteriormente, muda para a conformação β -vazia que possui baixa afinidade ao ATP, deixando a superfície da mesma.

Essa proteína relacionada ao metabolismo energético foi caracterizada no spot 23, onde embora na literatura não conste a presença ou participação do zinco na sua estrutura, esse elemento foi identificado, apesar dessa proteína não apresentar sítios de coordenação específicos para o zinco (no caso, grupos tióis e/ou sulfidrilas, bases moles), pode-se inferir que o zinco pode estar ligado a algum nitrogênio terminal, que por se tratar de uma base intermediária, pode ter afinidade por ions Zn^{2+} caracterizando proteína do tipo *metal binding*.

Guanidinoacetate N-methyltransferase

Os compostos guanidínicos (CG) são substâncias que apresentam um grupo guanidino em sua estrutura, exercendo importante papel biológico, incluindo a participação da arginina na síntese de uréia e da creatina na contração muscular. O ácido guanidino acético ou guanidino acetato é um CG sintetizado a partir de arginina e glicina através da enzima arginina-glicina amidino transferase (AGAT). Esta catalisa a primeira reação que transfere o grupo amidino para a glicina, formando guanidino acetato [63]. A guanidino acetato metiltransferase (GAMT) catalisa o segundo passo da biossíntese de creatina, transformando o guanidino acetato em creatina, principalmente no fígado e pâncreas. Porém esses órgãos contêm baixos níveis de creatina quinase, sendo estas substâncias transportadas para tecidos com alta demanda de energia e que apresentam níveis de creatina quinase significativos, como o músculo esquelético [64].

O zinco foi identificado no spot 15 caracterizado como sendo esta proteína onde a literatura não cita a participação do mesmo em sua função ou estrutura, no entanto o elemento foi identificado nas determinações por GFAAS. Apesar dessa proteína não possuir sítios de coordenação específicos para o zinco (no caso, grupos tióis e/ou sulfidrilas, bases moles), pode-se inferir que o zinco possa estar ligado a algum

nitrogênio terminal, que por se tratar de uma base intermediária, pode ter afinidade por ions Zn^{2+} caracterizando proteína do tipo *metal binding* [41;48].

Ubiquitin 60S ribosomal protein L34

Subunidade da ubiquitina, assim como a 40S ribosomal discutido anteriormente, onde também necessita da participação do zinco para exercer sua função.

No spot 1B assim caracterizado foi identificado o zinco como elemento em sua estrutura, podendo assim considerar essa proteína como um possível biomarcador de zinco.

4. Conclusão

A boa correlação obtida entre as repetições dos géis de amostras de músculo (média de 70%), permitiu a utilização da metodologia de separação por 2D-PAGE, obtendo eletroferogramas com boas resoluções dos spots, identificando 300 spots em média nos tratamentos.

Comparando as fontes para cada grupo observou-se que a concentração de zinco no tecido muscular dos peixes alimentados com fonte orgânica foi superior para os animais de 85 g (T5), bem como nos spots proteicos. Nos peixes de 24 g, as maiores concentrações do elemento nos spots foram para os alimentados com fonte inorgânica. Já para os de 74 g, as maiores concentrações nos spots encontraram-se tanto nos alimentados com zinco orgânico como inorgânico.

Analisando os grupos entre as fontes, observou-se que para os alimentados com fonte inorgânica as concentrações de zinco nos spots proteicos se encontraram inversamente proporcionais ao peso, exceto um spot. E diretamente proporcionais para os alimentados com zinco orgânico, exceto em três spots.

Através dos estudos metaloproteômicos e as ferramentas da espectrometria de massa juntamente com a bioinformática conseguiu-se identificar duas proteínas como sendo possíveis biomarcadores de zinco.

5. Referências

1. Y. GAO, C. CHEN, P. ZHANG, Z. CHAI, W. HE, Y. HUANG, **Anal. Chim. Acta**, v.485, p.131, 2003.
2. F. ARNESANO, L. BANCI, I. BERTINI, F. CAPOZZI, S. CIOFI-BAFFONI, S. CIURLI, C. LUCHINAT, S. MANGANI, A. ROSATO, P. TURANO, M.S. VIEZZOLI, **Coord. Chem. Rev.**, v.250, p.1419, 2006.
3. MULLER M.; KERSTEN S. Nutrigenomics: goals and strategies. **Nat. Rev. Genet.**, v.4, p.315-322, 2003.
4. WESTERHOFF, H.V.; HOFMEYR, J.H. **What is systems biology? From genes to function and back**. In: ALBERGHINA, L., WESTERHOFF, H.V. (Eds.) *Systemsbiology*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2005. p.119-141.
5. IGOR A. KALTASHOV . MINGXUAN ZHANG .STEPHEN J. EYLES . RINAT R. ABZALIMOV. **Anal BioanalChem**, v.386, p.472–481, 2006.
6. S. J. LIPPARD AND J. M. BERG, **Principles of Bioinorganic Chemistry**, Princeton, NJ. USA, University Science Book, 1994.
7. EICHHORN, G. L. **Inorganic Biochemistry**, ed., Elsevier Scientific, Amsterdam, , vol. 1, 2, 1973.
8. A. M. FAIBANE AND D. R. WILLIAMS, **The Principle of Bio-inorganic Chemistry**, Chemical Society Monographs for Teachers, No. 31, London, UK, The Chemical Society, 1981.
9. HAYS VW, SWENSON MJ (1985). Minerals and Bones. In: **Dukes'Physiology of Domestic Animals**, Tenth Edition, 1985. p. 449-466.
10. MALHOTRA VK (1998). **Biochemistry for Students**, Tenth Edition, New Delhi, India: Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd, 1998.
11. MURRAY RK, GRANNER DK, MAYES PA, RODWELL VW. **Harper's Biochemistry**, 25th Edition, USA, McGraw-Hill, Health Profession Division, 2000.
12. HARAGUCHI H, Metallomics as integrated biometal science. **J Anal At Spectrom**, v.19, p.5–14, 2004.

13. LÓPEZ-BAREA J, GÓMEZ-ARIZA JL, Environmental proteomics and metallomics. **Proteomics**, v.6, p.S51–S62, 2006.
14. Y. GAO, C. CHEN, P. ZHANG, Z. CHAI, W. HE, Y. HUANG, **Anal. Chim. Acta**. v.485, p.131, 2003.
15. GONÇALVES, G. S. et al. **Energia e nutrientes digestíveis de alimentos para a tilápia do Nilo**, São Paulo: Boletim do Instituto de Pesca, 2009.
16. GUIMARÃES, I. G.; PEZZATO, L. E.; BARROS, M. M. Amino acid availability and protein digestibility of several protein sources for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture Nutrition**, Bethesda, v.14, n. 1, p. 396-405, 2008.
17. PEZZATO, L. E. et al. Digestibilidade aparente de ingredientes pela tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 31, n. 4, p. 1595-1604, 2002.
18. NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient requirements of fish and shrimp**. Washington, D.C.: National Academies Press, 2011. 376 p.
19. GAO, Y.; CHEN, C.; ZHANG, P.; CHAI, Z.; HE, W.; HUANG, Y. Detection of metalloproteins in human liver cytosol by synchrotron radiation X-ray fluorescence after sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. **Analytica Chimica Acta**, v.485, p.131-137, 2003.
20. ARNESANO F.; BANCI, L.; BERTINI, I.; CAPOZZI, F.; CIOFI-BAFFONI, S.; CIURLI, S.; LUCHINAT, C.; MANGANI, S.; ROSATO, A.; TURANO, P.; VIEZZOLI, M.S. An Italian contribution to structural genomics: Understanding metalloproteins. **Coordination Chemistry Reviews**. v.250, p.1419-1450, 2006.
21. SYKES E., GRZYCH C., EPSTEIN E., KIECHLE F. L. Dextran interference in biuret-based assays for serum proteins. **Clin. Chem.**, v.33, p.1073, 1987.
22. CANDIANO, G.; BRUSCHI, M.; MUSANTE, L.; SANTUCCI, L.; GHIGGERI, G.M.; CARNEMOLLA, B.; ORECCHIA, P.; ZARDI, L.; RIGHETTI, P.G. Blue silver: a very sensitive colloidal coomassie G-259 staining for proteome analysis. **Electrophoresis**, v.25, p.1327-1333, 2004.

23. GÓMEZ-ARIZA, J.L.; GARCIA-BARRERA, T.; LORENZO, F.; BERNAL, V.; VILLEGAS, M.J.; OLIVEIRA, V. Use of mass spectrometry techniques for the characterization of metal bound to proteins (metallomics) in biological systems, **Anal. Chim.Acta.**, n.524, p.15-22, 2004.
24. SILVA, F. A., PADILHA, C. C. F., PEZZATO, L. E., BARROS, M. M., PADILHA P. M. Determination of chromium by GFAAS in slurries of fish feces to estimate the apparent digestibility of nutrients in feed used in pisciculture. **Talanta**, v.69, p.1025-1030, 2006.
25. LOUREIRO, V. R., SALEH, M. A. D., MORAES, P. M., NEVES, R. C. F., SILVA ; A. F., PADILHA, C. C. F., PADILHA P. M. Manganese determination by GFAAS in feces and fish feed slurries. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.18, p.1235-1241, 2007.
26. SILVA, F. A., NEVES, R. C. F., QUINTERO-PINTO, L. G., PADILHA, C. C. F., JORGE, S. O. M. A., BARROS, M. M., PEZZATO, L. E., PADILHA P. M. Determination of selenium by GFAAS in slurries of fish feces to estimate the bioavailability of this micronutrient in feed used in pisciculture. **Chemosphere**, v.68, p.1542-1547, 2007.
27. NEVES, R. C. F., MORAES, P. M., SALEH, M. A. D., LOUREIRO, V. R., SILVA, F. A., BARROS, M. M., PADILHA, C. C. F., JORGE, S. M., PADILHA P. M. FAAS determination of metal nutrients in fish feed after ultrasound extraction. **Food Chemistry**, v.113, p.679-683, 2009.
28. PADILHA, C. C. F., MORAES, P. M., GARCIA, L. A., POZZI, C. M., PEREIRA, G. P., VALENTE, J. P. S., JORGE, S. M., PADILHA, P. M. Evaluation of Cu, Mn and Se in vegetables using ultrasonic extraction and GFAAS. **Food Analytical Methods**, v.4, p.319-325, 2011.
29. SILVA, F. A., PADILHA, C. C. F., CASTRO, G. R., ROLDAN, P. S., NOGUEIRA, A. R. A., MORAES, P. M., PADILHA P. M. Selenium determination in tissue samples of Nile tilapia using ultrasound-assisted extraction. **Central European Journal of Chemistry**, v.9, p.119-125, 2011.

30. COOKBOOK SHIMADZU – **Operation manual**: Atomic Absorption Spectrophotometer, AA-6800, SHIMADZU, 2000.
31. O'DELL B.L., YOSHE J.M. & SAVAGE, J.E. Zinc availability in the chicken as affected by phytate, calcium and ethylenediaminetetraacetate. **Poultry Science**, v. 43, p.45-119, 1964.
32. SÁ M.V.C., PEZZATO L.E., BARROS M.M., PADILHA P.M. Relative bioavailability of zinc in supplemental inorganic and organic sources for Nile tilapia *Oreochromis niloticus* fingerlings. **Aquaculture Nutrition**, v.11, p.273-281, 2005.
33. UNDERWOOD E.J. **The mineral nutrition of livestock**. 3 ed. Wallingford: CABI, 1999. 614p.
34. SUSSULINI, A., GARCIA, J. S., MESKO, M. F., MORAES, D. P., FLORES, E. M., PÉREZ, C. A., ARRUDA, M. A. Z. Evaluation of soybean seed protein extraction focusing on metalloprotein analysis. **Microchimica Acta**, v.158, p.173-180, 2007.
35. NELSON, D.L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 5th ed. New York: W.H. Freeman, 2008. 110 p.
36. LI, B.T.; VAN KESSEL, A.G.; CAINE, W.R. et al. Small intestinal morphology and bacterial populations in ileal digesta and feces of newly weaned pigs receiving a high dietary level of zinc oxide. **Can. J. of Anim. Sci.**, v.81, p.511-516, 2001.
37. GUERRERA, I.C; KLEINER, O. Application of mass spectrometry in proteomics. **Bioscience Reports**, v.25, n.1-2, p. 71-93, 2005.
38. EDENBER, H. J.; DICK, A. M.; XUEI, X.; TIAN, H.; ALMASY, L.; BAUER, L. O.; CROWE, R. R.; ALISON GOATE, A. Variations in *GABRA2*, Encoding the $\alpha 2$ Subunit of the GABAA Receptor, are associated with Alcohol Dependence and with Brain Oscillations. **Am. J. Hum. Genet.**, v.74, p.705-714, 2004.
39. LIMA, P. M., NEVES, R. C. F., SANTOS, F. A., PEREZ, C. A., DA SILVA, M. A. O., ARRUDA, M. A. Z., CASTRO, G. R., PADILHA P. M. Analytical approach to the metalloproteomic of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) liver tissue by SR XRF and FAAS after 2D PAGE separation: **Preliminary results**. **Talanta**, v.82, p.052-1056, 2010.

40. MURRAY, R. K.; GRANNER, D. K.; MAYES, P. A.; RODWELL, V. W. **Harper's Illustrated Biochemistry**. 27th ed., New York: McGraw-Hill Medical, 2006.
- 41 GARCIA, J. S.; MAGALHÃES, C. S.; ARRUDA, M. A. Z. Trends in metal-binding and metalloprotein analysis. **Talanta**, v.69, p.1-15, 2006.
- 42 EID, A. GHONIM, S.I. Dietary zinc requirement of fingerling *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture**, v.119, p.259-264, 1994.
- 43 FINLEY, D., BARTEL, B. & VARSHAVSKY, A. The tails of ubiquitin precursors are ribosomal proteins whose fusion to ubiquitin facilitates ribosome biogenesis. **Nature** v.338, p.394-401, 1989
- 44 CHEVALIER, C.; QUERREC, F. L.; CHEVALIER, P. R. C.; QUERREC, F. L.; RAYMON, P. Sugar levels regulate encoding protein S28 the expression of ribosomal protein genes and ubiquitin-fused protein S27a in maize primary root tips. **Plant Science**, v.117, p.95-105, 1996.
- 45 Ye M, *et al.* Cloning and Functional Analysis of cDNAs with Open Reading Frames for 300 Previously Undefined Genes Expressed in CD34+ Hematopoietic Stem/Progenitor Cells. **Genome Res.**, v.10, n.10, p.1546-1560, 2001.
- 46 HERON, L., VIRSOLVY, A., PEYROLLIER, K., GRIBBLE, F. M., LE CAM, A., ASHCROFT, F. M., BATAILLE, D. Human alpha-endosulfine, a possible regulator of sulfonylurea-sensitive K(ATP) channel: molecular cloning, expression and biological properties. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, v.95, p.8387-8391, 1998.
- 47 GHARBI-AYACHI, A., LABBE, J.-C., BURGESS, A., VIGNERON, S., STRUB, J.-M., BRIOUDES, E., VAN-DORSSELAER, A., CASTRO, A., LORCA, T. The substrate of Greatwall kinase, Arpp19, controls mitosis by inhibiting protein phosphatase 2A. **Science**, v.330, p.1673-1677, 2010.
- 48 PEARSON, R. G. Hard and soft acids and bases. **J. Am. Chem. Society**, v.85, p. 3533-3539, 1963.
49. GARCIA, J. S.; MAGALHÃES, C. S.; ARRUDA, M. A. Z. Trends in metal-binding and metalloprotein analysis. **Talanta**, v.69, p.1-15, 2006.

50. BERBEL, P.; MARCO, P.; CERESO, J. R.; FELIPE, J. Distribution of parvalbumin immunoreactivity in the neocortex of hypothyroid adult rats. **Neuroscience Letters**, v.204, p.65-68, 1996.
- 51 PRICE, N.C.; COHN, M. SCHIRMER, R.H. Fluorescent and spin label probes of the environments of the sulfhydryl groups of porcine muscle adenylate kinase. **J. Biol. Chem.**, v.250, p.644-652.
52. JANSSEN, E.; DZEJA, P.P.; OERLEMANS, F.; SIMONETTI, A.; HEERSCHAP, A.; HAAN, A.; RUSH, P.S.; TERJUNG, R.R.; WIERINGA, B.; TERZIC, A. Adenylate kinase 1 gene deletion disrupts muscle energetic economy despite metabolic rearrangement. **European Molecular Biology Organization**, v.19, n.23, p.6371-6381, 2000.
- 53 AMES, A. 3rd CNS energy metabolism as related to function. **Brain Res Brain Res Rev.** v.34, p.42-68, 2000.
54. DEZEJA,P.P.; TERZIC, A. Phosphotransfer reactions in the regulation of ATP-sensitive K⁺ channels. **FASEB J.**, v.12, p.523-529, 1998.
- 55BERBEL, P.; MARCO, P.; CERESO, J. R.; FELIPE, J. Distribution of parvalbumin immunoreactivity in the neocortex of hypothyroid adult rats. **Neuroscience Letters**, v.204, p.65-68, 1996.
56. KNOWLES JR 1991. Enzyme catalysis: not different, just better. **Nature**, v.350, p.121-124, 1991.
57. MEYERHOF O, BECK LV. Triosephosphate isomerase. **JBiolChem**, v.156, p.109-120, 1944.
58. LOLIS E , ALBER T , DAVENPORT RC, ROSE D, HARTMAN FC, PETSKO GA. Structure of Biochemistry yeast triosephosphate isomerase at 1.9-A resolution. v.29, p.6609-6618, 1990.
59. SCHLIEBS W, THANKI N, ERITJA R, WIERENGA R. Active site properties of monomeric triosephosphate isomerase (monoTIM) as deduced from mutational and structural Protein Science studies, v.5, p.229-239, 1996.

60. KURSULA I, PARTANEN S, LAMBEIR AM, WIERENGA RK. The importance of the conserved Arg-191-Asp227 salt bridge of triosephosphate isomerase for folding, FEBS Lett stability, and catalysis. *v.518, p.39-42, 2002.*
61. Mccall, K.A.; Huang, C.; Fierke, C.A. Function and Mechanism of zinc metalloenzymes. **J. Nutr.**, v.130, p.5147S-1446S, 2000.
- 62 GLOVER, C.N.; BURY, N.R.; HOGSTRAND, C. Zinc uptake across the apical membrane of freshwater rainbow trout intestine is mediated by high affinity, low affinity, and histidine-facilitated pathways. **BiochemicetBiophysicaActa**, v.1614, p.211-219, 2003.
63. ENSENAUER, R.; THIEL, T.; SCHWAB, K.O.; TACKE, U.; STÖCKLER-IPSIROGLU, S.; SCHULZE, A.; HENNING, J. LEHNERT, W. Guanidinoacetate methyltransferase deficiency: differences of creatine uptake in human brain and muscle. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 82, p. 208-213, 2004.
- 64 SCHULZE, A.; BACHERT, P.; SCHLEMMER, H.; HARTING, I.; POLSTER, I.; SALOMONS, G.S. Lack of creatine in muscle and brain in an adult with GAMT deficiency. **Ann. Neurol.**, v.53, p.248-51, 2003.

CAPÍTULO IV

**EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE PROTEÍNAS DO TECIDO MUSCULAR DE
TILÁPIA DO NILO ALIMENTADAS COM FONTES ORGÂNICA E
INORGÂNICA DE ZINCO**

**Expressão diferencial de proteínas do tecido muscular de tilápia do Nilo
alimentadas com fontes orgânica e inorgânica de zinco**

**Paula M. Lima^a, Mariana R. L. Viera^a, Bruna Cavecci^a, João V. Queiroz^b, Camila
Braga, José Cavalcante, Luiz E. Pezzato^a, Luciana F. Fleury^b, Pedro M. Padilha^{b,c*}**

^a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/UNESP – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, C. Postal 31, 15385-000 Botucatu, SP, Brasil.

^b Instituto de Biociências/UNESP-Departamento de Química e Bioquímica, C. Postal 510, 18618-970 Botucatu, SP, Brasil.

^c Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Bioanalítica/UNICAMP, C. Postal 6154, 13084-971 Campinas, SP, Brasil.

Resumo

O desenvolvimento de técnicas proteômicas permite a análise do perfil proteico completo dos sistemas biológicos, permitindo um melhor entendimento da fisiologia normal do organismo, bem como dos mecanismos de respostas às mais diferenciadas ações, suas relações com as espécies metálicas, no caso da metaloproteômica e descoberta de biomarcadores. No presente trabalho, a análise proteômica foi usada para auxiliar no entendimento dos mecanismos proteicos e moleculares envolvidos no tecido muscular de tilápia alimentadas com fontes orgânica e inorgânica de zinco, sendo que os animais foram separados em grupos de 24g, 74g e 85g, obtendo nove tratamentos, sendo que cada grupo foi alimentado com zinco controle, orgânico e inorgânico. As análises comparativas portanto se deram entre os grupos e entre as fontes, o que permitiu uma maior exploração da fisiologia do animal e seus processos bioquímicos envolvidos. Para isso comparou-se os perfis proteicos dos spots onde o zinco foi identificado entre os tratamentos, a fim de se obter proteínas que fossem diferencialmente expressas. Através desta análise foi possível identificar quinze proteínas, que posteriormente foram caracterizadas por ESI MS/MS, sendo três possíveis candidatas a biomarcadores de zinco.

Palavras-chave: Proteômica, metaloproteômica, biomarcador, expressão proteica, tilápia do Nilo

Abstract

The development of Proteomics techniques allows the full protein profile analysis of biological systems, allowing a better understanding of the normal physiology of the organism, as well as the mechanisms of answers to more differentiated actions, its relations with the metallic species, in the case of metalloproteômica and discovery of biomarkers. In the present work, the Proteomics analysis was used to assist in the understanding of protein and molecular mechanisms involved in muscle tissue of Tilapia fed with organic and inorganic source of zinc, and the animals were separated into groups of 24 g, 74 g and 85 g, getting nine treatments, each group was fed with zinc control, organic and inorganic. The comparative analysis therefore were among the groups and between the sources, which allowed further exploration of animal physiology and their biochemical process involved. Compared to the protein profiles of spots where zinc was identified among the treatments, in order to obtain proteins that were differentially expressed. Through this analysis it was possible to identify 15 proteins, which were later characterized by ESI MS/MS, with three potential biomarkers of zinc.

Keywords: Proteomic, metalloproteomic, biomarker, protein expression, Nile tilapia

1. Introdução

Na tentativa de atender a demanda de produção de tilápia do Brasil, pesquisas são voltadas para crescimento e desempenho animal saudável, porém de maneira mais acelerada, o que necessita de pesquisas na área da fisiologia e nutrição, sendo que os estudos com fontes de minerais tem sido bastante explorados, uma vez que a forma química da fonte mineral influencia a biodisponibilidade do elemento para o organismo, em se tratando de inorgânica ou orgânica [1].

Contudo, são inúmeros os trabalhos que atuam nesse enfoque, porém os resultados encontram-se divergentes, como estudos conduzidos com fontes de óxido de zinco (ZnO) e complexo zinco-aminoácido (Zn-AA) com tilápia do Nilo a fonte orgânica acarretou pior desempenho produtivo nos peixes estudados [2]; não observaram diferença no ganho de peso e eficiência alimentar de truta arco-íris, alimentadas com fontes suplementares orgânica (zinco metionina) e inorgânica (sulfato de zinco), porém a atividade da fosfatase alcalina foi maior para os alimentados com fonte orgânica [1], assim como estudos conduzidos com truta arco íris, os autores não observaram diferença entre ganho de peso e eficiência alimentar quando comparam sulfato de zinco e zinco-metionina, porém a atividade da fosfatase alcalina foi significativamente maior, para os alimentados com fonte orgânica [1].

Portanto, o campo da proteômica pode fornecer informações sobre as causas das variações das proteínas e, possivelmente, suas consequências, resultando em diferentes expressões protéicas ou na redistribuição de proteínas específicas dentro de células ou fluidos biológicos [3].

As técnicas proteômicas têm se tornado cada vez mais importantes no estudo da fisiologia de peixes: primeiramente como um método comparativo para analisar a evolução gênica, depois como um modo de realizar análises globais de rotas de sinalização celular envolvidas em mecanismos fisiológicos ligados ao crescimento, reprodução, patologias e estresse (inclusive estresse ligado à contaminações ambientais) e, finalmente, como uma maneira de rapidamente identificar novas proteínas e homólogos de proteínas conhecidas que desempenham papel importante em outros grupos animais [3,4].

Assim sendo, com o avanço de técnicas analíticas, abordagens bioquímicas complementares e biologia molecular a análise proteômica tem se tornado uma nova

ferramenta no estudo dos padrões de expressão de proteínas dos órgãos, células ou compartimentos subcelulares. Desta maneira, novos caminhos estão se abrindo para fornecer uma compreensão da resposta celular aos vários fatores externos [3-5].

Com base no exposto, o objetivo do presente trabalho foi investigar e caracterizar o perfil diferencial de proteínas expressas dos tecidos musculares de peixes alimentados com fontes orgânica e inorgânica.

2. Material e Métodos

Os estudos foram conduzidos inicialmente no Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos – Aquanutri, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, para alimentação dos animais e, posteriormente, nos Laboratórios de Eletroforese e de Química Analítica Aplicada, do Departamento de Química e Bioquímica, do Instituto de Biociências, Campus de Botucatu.

2.1. Dietas experimentais

Na criação dos peixes foram utilizadas dietas práticas balanceadas (Tabela 1) de acordo com a literatura [6-9], com fontes orgânica, como Bioplex da Altech, (zinco-metionina), inorgânica de zinco (sulfato de zinco monoidratado – $ZnSO_4 \cdot H_2O$) e controle, isenta de suplementação de zinco. Sendo estas fornecidas para três grupos de animais com diferentes pesos iniciais, constituindo os seguintes tratamentos:

- Grupo 1- Peixes com peso médio inicial de 24g
 - T1C: alimentados com zinco controle;
 - T1O: alimentados com zinco orgânico;
 - T1I: alimentados com zinco inorgânico;
- Grupo 2 – Peixes com peso médio inicial de 74g
 - T2C: alimentados com zinco controle;
 - T2O: alimentados com zinco orgânico;
 - T2I: alimentados com zinco inorgânico;
- Grupo 3 – Peixes com peso médio inicial de 85g
 - T3C: alimentados com zinco controle;
 - T3O: alimentados com zinco orgânico;
 - T3I: alimentados com zinco inorgânico.

Tabela 1. Composição das dietas experimentais.

Ingrediente	Dieta (%)		
	Controle	Orgânica	Inorgânica
Soja, farelo	37,62	37,66	37,64
Milho, glúten-60	10,00	10,00	10,00
Milho, grão	44,21	43,92	44,07
Trigo, farelo	4,16	4,18	4,17
Soja, óleo	0,87	0,96	0,92
Fosfato bicálcico	2,06	2,06	2,06
Cloreto de sódio	0,10	0,10	0,10
DL-Metionina	0,26	0,26	0,26
L-Lisina HCL 99%	0,42	0,42	0,42
L-Treonina 98,5%	0,18	0,18	0,18
Antioxidante (BHT)**	0,02	0,02	0,02
Vitamina C	0,05	0,05	0,05
Premix min e vit*	0,05	0,05	0,05
Bioplex	0,00	0,14	0,00
Sulfato de Zinco Monoidratado	0,00	0,00	0,06
TOTAL	100,00	100,00	100,00

Composição química calculada			
	Controle	Orgânica	Inorgânica
Qtdd (%)	100,00	100,00	100,00
ED (kcal kg ⁻¹)	3400,00	3400,00	3400,00
PD (%)	29,00	29,00	29,00
FB (%)	4,00	4,00	4,00
EE (%)	2,41	2,49	2,46
Ca (%)	0,66	0,66	0,66
Pdisp (%)	0,59	0,59	0,59
Lys (%)	1,60	1,60	1,60
Met (%)	0,70	0,70	0,70
Met+Cys (%)	1,07	1,07	1,07
Thr (%)	1,10	1,10	1,10
Trp (%)	0,30	0,30	0,30
Zn quantificado (mg kg ⁻¹)	23,0	154,32	139,25

*Suplemento vitamínico mineral (isento de Zn), níveis de garantia por kg da dieta: vitamina A, 16060 UI; vitamina D3, 4510 UI; vitamina E, 250 UI; vitamina K, 30 mg; vitamina B1, 32 mg; vitamina B2, 32 mg; vitamina B6, 48 mg; pantotenato de cálcio, 80 mg; niacina, 170 mg; biotina, 10 mg; ácido fólico, 10 mg; vitamina B12, 32 µg; Na2SeO3, 0,7 mg; MnO, 50 mg; FeSO4, 150 mg; CuSO4, 20 mg; CoSo4, 0,5 mg; I2Ca, 1 mg. **antioxidante Butil hidroxitolueno.

2.2. Coleta das amostras

Após 80 dias de experimento, os peixes foram eutanasiados com benzocanina para a retirada do tecido muscular. Em seguida, para a obtenção do pool de amostras

para cada tratamento, fez-se a maceração das amostras com turrax para armazenamento em frascos de polipropileno a -20°C em freezer.

Inicialmente, para os métodos de extração, precipitação, ressolubilização proteica, focalização isoeletrica e 2D-PAGE utilizou-se o protocolo já otimizado com amostras de tecido muscular de tilápia do Nilo, onde as amostras foram maceradas em água ultrapura com auxílio de almofariz e pistilo, centrifugadas à 13000 rpm e a 4°C durante 5 minutos, em centrífuga refrigerada, e os extratos proteicos obtidos dessas amostras foram transferidos para tubos do tipo Eppendorf[®] e utilizados posteriormente para quantificação dos teores proteicos e corridas eletroforéticas [10,11].

Os extratos proteicos foram submetidos à solução gelada de acetona 80% (v/v) na proporção 1:4 (amostra:acetona) e armazenados por 2 horas a -20°C , para a precipitação das proteínas.

Em seguida, o precipitado proteico obtido foi centrifugado a 10000 rpm em centrífuga refrigerada (BioAgency) por 10 minutos para retirada do sobrenadante e obtenção da massa proteica (*pellet*) que foi ressolubilizada em hidróxido de sódio para quantificação de proteína.

2.3.Determinação de proteína total

A concentração de proteínas totais nos extratos proteicos de músculo foi determinada de acordo com o método do Biureto, empregando albumina de soro bovino como padrão [12]. Foi construída uma curva analítica com concentrações de 10 a 80 g L^{-1} a partir de solução padrão estoque de albumina bovina 100 g L^{-1} . Para leitura das amostras, os precipitados proteicos foram ressolubilizados em 100 μL de NaOH 0,50 mol L^{-1} . Em cubetas de plástico foram adicionados 50 μL de padrão/amostra e 2,5 mL do reagente do Biureto. A mistura padrão ou amostra com o reagente foi mantida a 32°C em banho maria (Marconi) durante 10 min. Após o tempo de reação, as leituras de absorbância foram medidas a 540 nm, usando espectrofotômetro UV/Visível.

2.4. Separações eletroforéticas

Para as separações eletroforéticas, a massa proteica (*pellet*) foi ressolubilizada em tampão Tris-HCl a 1 mol L^{-1} (pH 6,8), contendo ureia a 7 mol L^{-1} , tiourea a 2 mol L^{-1} , 3-[(3- cloroamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato (CHAPS) a 2% (m/v), anfólitos de pH 3 a 10 a 0,5% (v/v) e azul de bromofenol a 0,002%, além disso 2,8 mg de 1,4-ditiotreitol (DTT) foram adicionados a este tampão, esta mistura foi utilizada nas separações eletroforéticas [13].

Para iniciar os processos das separações eletroforéticas aplicou-se $375 \mu\text{g}$ da massa proteica ressolubilizada em fitas de 13 cm que contém gel pré-fabricado com anfólitos imobilizados de pH de 3 a 10 e colocadas em um aparato com óleo mineral em temperatura ambiente, para serem hidratadas com o extrato proteico e após 12 horas foram levadas ao sistema de isofocalização elétrica (IOF), para a separação das proteínas em função do pH. A programação de tensão utilizada no processo de separação por IOF foi o seguinte: Estágio 1 = 500 V, com acúmulo de 500 Vh; Estágio 2 = 1000 V, com acúmulo de 800 Vh; Estágio 3 = 10000 V, com acúmulo de 11300 Vh; Estágio 4 = 10000 V, com acúmulo de 3000 Vh [13].

Antes de iniciar a corrida eletroforética em segunda dimensão, as fitas foram submetidas a soluções de equilíbrio em duas etapas utilizando-se mesa agitadora:

➤ na primeira etapa, de redução, foram utilizados 10 mL de solução contendo ureia 6 mol L^{-1} , SDS 2 % (m/v), glicerol 30% (v/v), Tris-HCl 50 mmol L^{-1} , azul de bromofenol 0,002% (m/v) e DTT 1% (m/v);

➤ na segunda etapa, de alquilação dos grupos tióis, foi utilizada uma solução de composição similar, porém, substituindo-se o DTT por iodoacetamida 2,5% (m/v).

Na segunda dimensão do processo eletroforético (2D-PAGE), as fitas foram colocadas sob os géis de poliacrilamida a 12,5%, preparados previamente em placas de vidro de $180 \times 160 \times 1,5 \text{ mm}$, a partir das seguintes soluções: Acrilamida, N,N'-metilenobisacrilamida, Tris-hidroximetil amino metano, Dodecil Sulfato de Sódio (SDS), N,N',N,N'-tetrametilenodiamina (TEMED) e Persulfato de Amônio. Juntamente com as fitas, aplicou-se em papel filtro $10 \mu\text{L}$ de padrão de massa molar contendo as proteínas β -fosforilase (97,0 kDa), albumina (66,0 kDa), ovoalbumina (45,0 kDa), anidrase carbônica (30,0 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactoalbumina (14,4

kDa). Depois de vedado esse sistema com solução de agarose 0,5% (m/v), em tampão adequado, iniciou-se a corrida eletroforética em segunda dimensão com a seguinte programação: Tensão – 90 V por 30 min; e em seguida, Tensão – 250 V por 2h30 [23].

Após 3 horas de corrida, os géis foram submetidos à solução fixadora contendo ácido acético 10% (v/v) e etanol 40% (v/v) por uma hora e finalmente corados durante 72 horas com corante Coomassie coloidal, que consiste em solução de sulfato de amônio 8% (m/v), ácido fosfórico 1,6% (v/v), azul de coomassie G-250 0,08% (m/v) e metanol 25% (v/v).

2.5. Tratamento de Imagem e Análise de expressão nos spots proteicos

A detecção dos spots e a determinação do seu volume foram realizadas de modo automático adotando-se os seguintes parâmetros: smooth = 2, área mínima = 6 e saliência = 300. Dentro de cada grupo, o gel com o maior número de spots foi escolhido como gel de referência e em seguida foi efetuado o “match gels”, uma comparação entre os spots das réplicas de cada grupo.

Em seguida realizou-se correções com a adição e remoção manual dos spots, para efetuar devidamente a análise das classes, fornecendo a diferença estatística entre as fontes de zinco dentro de cada grupo experimental e os tamanhos dentro de cada fonte, levando em consideração as alterações no valor de % de volume. O uso da % de volume implica na normalização do spot, pois para calcular a % de volume, considera-se o volume total de todos os spots no gel. Assim, minimizam-se as variações decorrentes da quantidade de proteína aplicada e do procedimento de coloração.

O programa também permitiu que pontos isoelétricos e as massas moleculares de cada spot fossem estimados.

2.6. Preparo das amostras para espectrometria de massa

Após o tratamento de imagem e análise dos spots pelo programa, os spots de interesse, ou seja, aqueles que tiverem diferença de expressão e identificado o zinco foram excisados dos géis e preparados para espectrometria de massas [14]. Para isso, retirou-se os spots em triplicata de cada tratamento com auxílio de ponteira de 1000 µL e 200 µL, das quais as pontas foram retiradas em diferentes alturas para proporcionar

diferentes diâmetros. Posteriormente os spots foram cortados em segmentos de aproximadamente 1 mm e os pedaços transferidos para tubos de 2,0 mL contendo 200 µL ácido acético 5% e armazenadas a 4°C.

Para a remoção do corante, os segmentos de gel foram lavados no mínimo por três vezes, em uma solução contendo acetonitrila (ACN) 50% (v/v) e bicarbonato de amônio (AMBIC) 25 mM por 30 minutos, pois os geis deveriam estar totalmente transparentes. Em seguida os spots foram desidratados duas vezes em ACN 100% por 10 min. Ao final da segunda desidratação, a ACN foi removida e o resíduo remanescente deixado evaporar em temperatura ambiente.

Depois de desidratados, os spots foram submetidos a redução e alquilação. Para isso, foram inicialmente reidratados com DTT 20 mM em AMBIC 50 mM sob incubação por 40 min a 56°C. O excesso de líquido foi removido e substituído por iodoacetamida (IAA) 55 mM em AMBIC 50 mM.

Após 30 minutos munidos de luminosidade, em temperatura ambiente, o líquido foi removido, os fragmentos foram lavados em AMBIC 25 mM e em seguida desidratados em ACN 100%. A ACN foi descartada e o resíduo remanescente no gel foi deixado evaporar em temperatura ambiente.

Para a digestão das proteínas, os fragmentos de gel foram reidratados com 15 µL de solução contendo 150 ng de tripsina (Trypsin Gold Mass Spectrometry, Promega, Madison, WI, EUA) em AMBIC 25 mM por 15 min para que a tripsina pudesse penetrar no gel. Em seguida, adicionaram-se 50 µL de AMBIC 25 mM para total cobertura dos spots e incubou-se a 37 °C por 14 h. Ao fim de 14 h, a ação da tripsina foi interrompida pela adição de 15 µL de solução bloqueadora (ACN 50% v/v e ácido fórmico 5% v/v). Os peptídeos foram eluídos da acrilamida com duas lavagens de 15 minutos com solução de eluição A (ACN 50% v/v e ácido fórmico 1% v/v), uma lavagem de 15 minutos com solução de eluição B (metanol 60% v/v e ácido fórmico 1% v/v) e mais duas lavagens com ACN 100%, a 45°C sob sonicação. O aparelho de sonicação usado foi um ULTRA-SOM de banho (Branson, modelo 2510, Danbury, CT, EUA) com 40 KHz de frequência fixa e potência de 30 W. A solução contendo os peptídeos extraídos foi submetida à secagem em um concentrador a vácuo (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) à temperatura ambiente, por 2-3 h e então o tubo foi armazenado a -20 °C até a realização do sequenciamento.

3. Resultados e Discussão

3.1. Expressão Proteica

3.1.1. Análise dos spots entre os tratamentos

No estudo das imagens dos géis, foram estimadas as correlações entre os *spots* proteicos dos diferentes grupos experimentais, considerando o volume normalizado - %V (Figuras 1-18), permitindo avaliar uma possível correlação de expressão entre as proteínas para o conjunto de spots proteicos analisados. Visto que buscamos entender a influência da expressão das proteínas, onde essa estratégia de comparação pode nos oferecer informações para discutir e entendê-las.

A Figura 1, apresenta um exemplo de correlação entre dois tratamentos, onde cada ponto do gráfico representa a relação entre o volume normalizado dos spots correlacionados durante o processo de *matching*. Através dos gráficos gerados pelo programa, encontramos que as correlações dos spots proteicos foram: T1C x T1O ($R > 0,91$); T1C x T1I ($R > 0,85$); T1O x T1I ($R > 0,73$); T2C x T2O ($R > 0,94$); T2C x T2I ($R > 0,93$); T2O x T2I ($R > 0,98$); T3C x T3O ($R > 0,77$); T3C x T3I ($R > 0,66$); T3O x T3I ($R > 0,54$); T1C x T2C ($R > 0,85$); T1C x T3C ($R > 0,86$) e T2C x T3C ($R > 0,72$); T1O x T2O ($R > 0,89$); T1O x T3O ($R > 0,70$); T2O x T3O ($R > 0,80$); T1I x T2I ($R > 0,53$); T1I x T3I ($R > 0,77$); T2I x T3I ($R > 0,81$), considerando a %V.

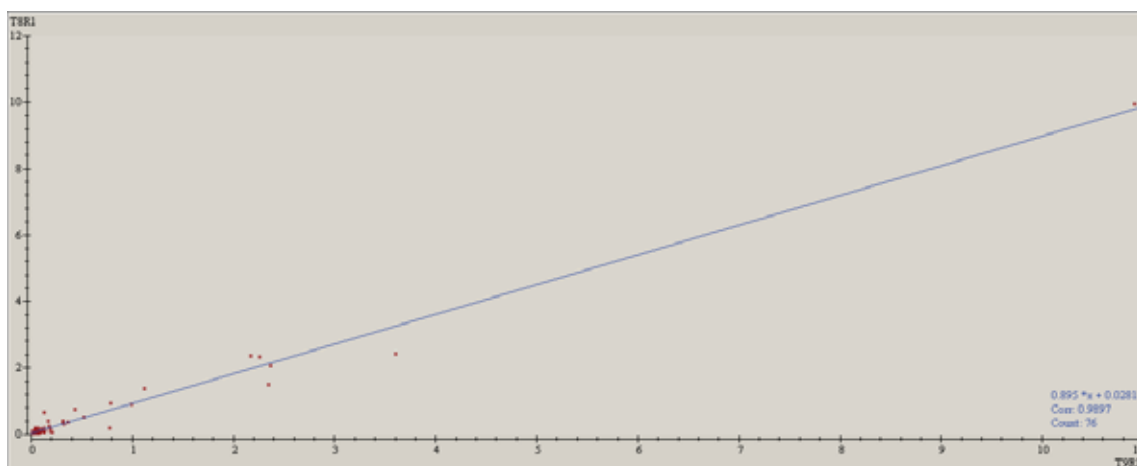


Figura 1. Correlação entre o volume normalizado (%V) dos spots presentes nos géis T2O e T2I

A análise de correlação, permite observar que o perfil proteômico analisado entre as fontes de mesmo grupo, possuem maior similaridade entre T1C e T1O no G1, T2O e T2I no G2 e T3C e T3O no G3. E entre os grupos de mesma fonte, o perfil proteômico se assemelha entre T1C e T3C no zinco controle, T1O e T2O no zinco orgânico e T2I e T3I no zinco inorgânico. Podendo-se inferir que esses tratamentos possuem semelhança na expressão das proteínas do tecido muscular.

Levando em consideração cada gráfico apresentado anteriormente, quanto mais próximo o ponto estiver da reta, menor será a diferença de %V entre os spots equivalentes. À medida que alguns spots se distanciam da reta, pode-se inferir que existem tanto spots proteicos equivalentes como spots proteicos diferentes nos respectivos géis analisados.

Realizou-se também um outro estudo, através de histogramas de avaliação da distribuição dos spots desses géis otimizados em gradiente de pH 3-10 através da análise das imagens dos géis obtidos nas corridas eletroforéticas, relacionando a frequência com que os spots aparecem nos géis (considerando cada repetição e grupo experimental) em função de seu ponto isoelétrico (pI) e massa molar (MM). Os histogramas obtidos com esses dados são mostrados nas Figuras 2 e 3, respectivamente.

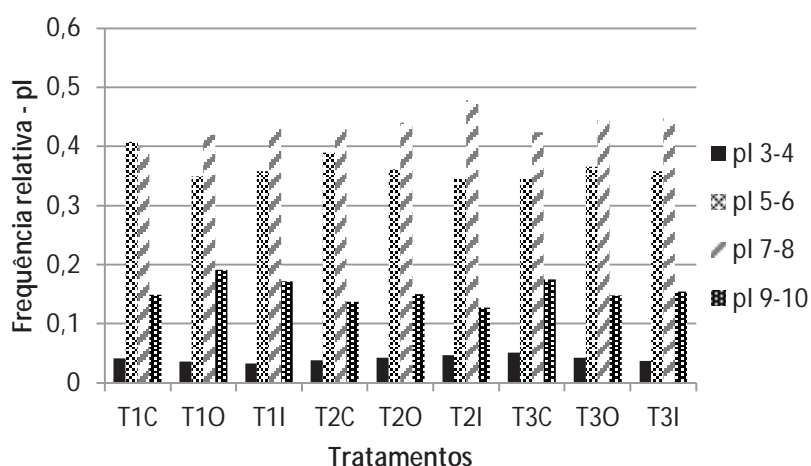


Figura 2. Histograma de distribuição dos spots proteicos por ponto isoelétrico (pI) nos géis dos diferentes tratamentos dos grupos experimentais.

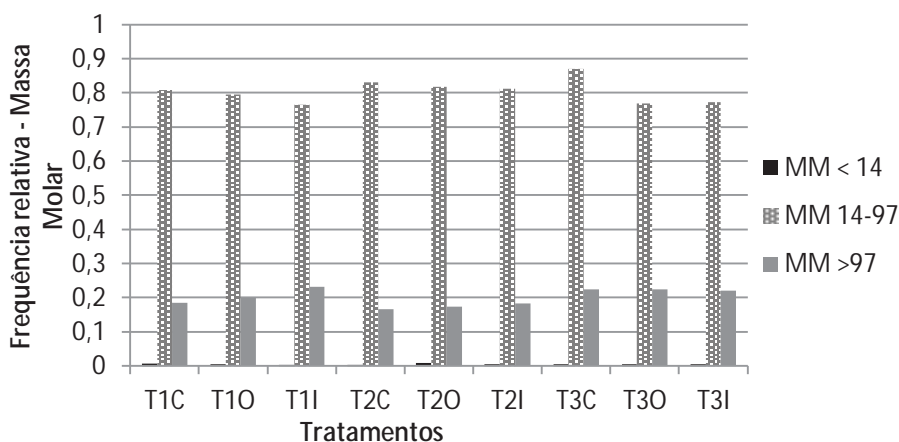


Figura 3. Histograma de distribuição dos spots proteicos por massa molar (MM) nos géis dos diferentes tratamentos dos grupos experimentais.

O estudo de avaliação da distribuição dos spots nas repetições dos géis; e nos diferentes grupos experimentais; fornece resultados apenas qualitativos. Este tipo de estudo demonstra ao analista possíveis variações quanto a homogeneidade de distribuição dos spots proteicos em diferentes faixas de pH e massa molar, o que permite identificar as regiões de alta e baixa frequência dos mesmos. Isso pode ampliar a diversidade de proteínas em estudos por comparação de análise de imagens e/ou facilitar a identificação das proteínas alvo da pesquisa em questão.

Ao analisar as Figuras 2 e 3, observa-se que os histogramas de uma forma geral apresentam uma distribuição homogênea dos spots proteicos em função de seus respectivos pIs e MMs nos diferentes tratamentos. Observa-se ainda que a maioria dos spots proteicos que compõem o mapa proteômico das amostras de tecido muscular de tilápia encontram-se distribuídos principalmente na faixa de MM de 14 a 97 kDa, com pIs mais frequentes na faixa de 7 a 8.

3.1.2. Análise Comparativa dos grupos entre as fontes

Foi possível verificar 153 spots coincidentes entre os tratamentos T1C e T1O. A Figura 4 apresenta os géis dos tratamentos 1C e 1O do grupo 1 sobrepostos, sendo o T1C em vermelho e T1O em azul. Dentre estes spots em comum, a ANOVA revelou 2 spots 3 e 27 com os seus respectivos *matching* (1210 e 1401), diferencialmente expressos ($p < 0,10$), (Figura 5).

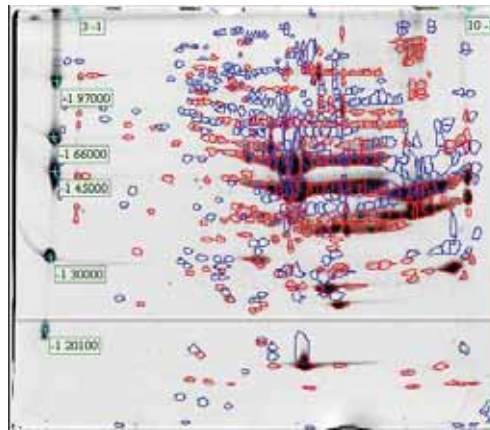


Figura 4. Gel representativo contendo spots em comum aos dois tratamentos do grupo 1 sobrepostos.

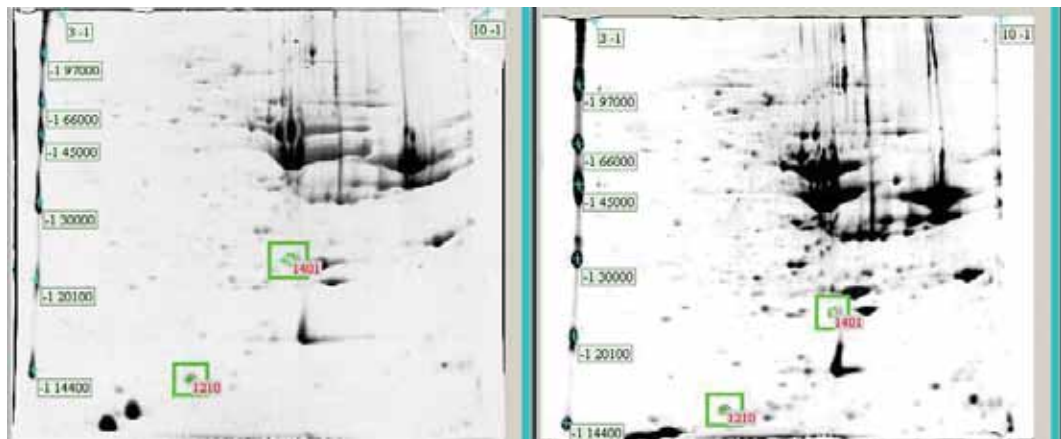


Figura 5. Os spots selecionados apresentam diferença de expressão entre os tratamentos 1C e 1O

A análise diferencial entre os tratamentos 1C e 1I do grupo 1 revelou 215 spots coincidentes, apresentados na Figura 6, sendo em vermelho o T1C e T1I em azul. Dentre estes spots em comum, a ANOVA apresentou um spot, 3 (1210) diferencialmente expresso ($p < 0,10$) (Figura 7).

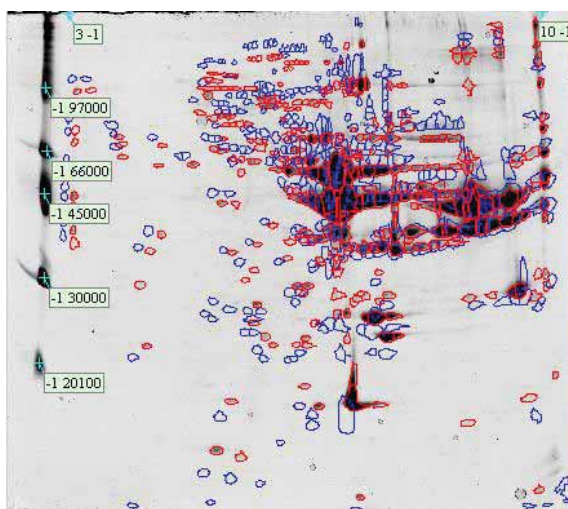


Figura 6. Gel representativo contendo spots em comum aos dois tratamentos do grupo 1 sobrepostos.

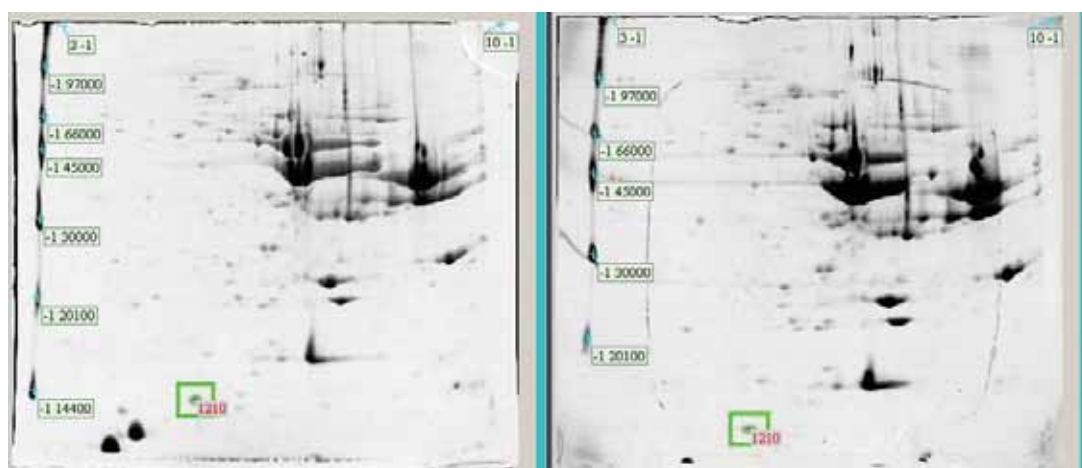


Figura 7. O spot selecionado apresenta diferença de expressão entre os tratamentos 1C e 1I

Para o grupo 2, as análises entre os tratamentos 2C e 2O, 2C e 2I e 2O e 2I apresentaram 147, 154 e 199 spots respectivamente coincidentes, ilustrados na Figura 8. Dentre estes spots em comum, a ANOVA não apresentou nenhum diferencialmente exposto para 2C e 2O, porém apresentou ($p < 0,10$) um spot diferencialmente exposto para 2C e 2I (1209) e um spot (1402) para 2O e 2I (Figuras 9 e 10).

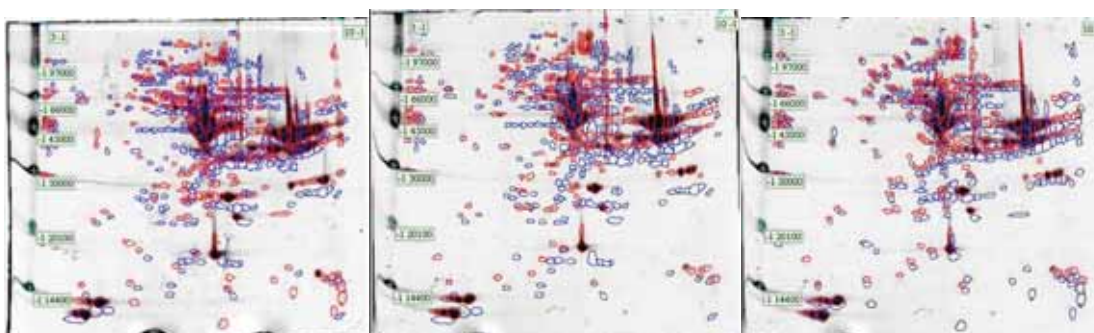


Figura 8. Gel representativo contendo spots em comum aos tratamentos do grupo 2 (2Cx20; 2Cx2I; 2Ox2I)

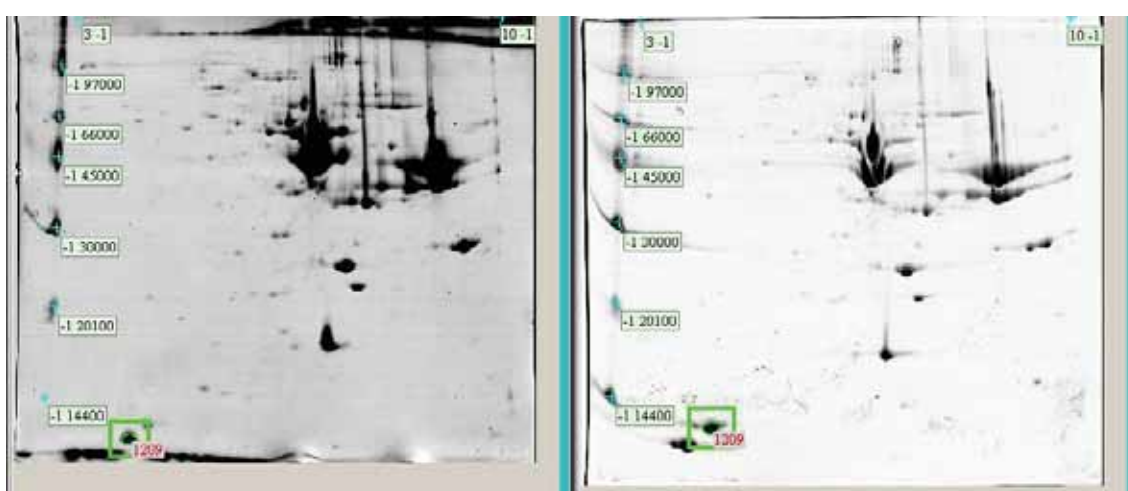


Figura 9. Spot 1209 diferencialmente expresso entre os tratamentos 2C x 2I.

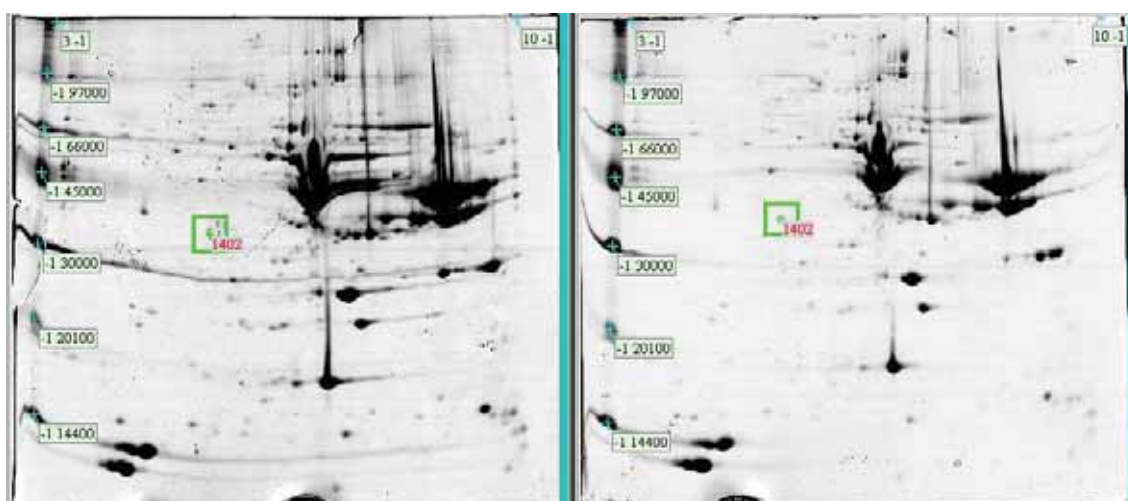


Figura 10. Spot 1402 diferencialmente expresso entre os tratamentos 2O x 2I.

Já para o grupo 3, as análises entre os tratamentos 3C e 3O, 3C e 3I, 3O e 3I revelaram 103, 124, 200 spots respectivamente coincidentes, apresentados na Figura 11.

Dentre estes spots em comum, os diferencialmente expressos pela ANOVA ($p < 0,10$) foram cinco spots (1230, 1233, 1234, 1402 e 1406) para 3C e 3O, quatro para (1216, 1233, 1398 e 1402) para 3C e 3I e nenhum para 3O e 3I (Figuras 12 e 13).

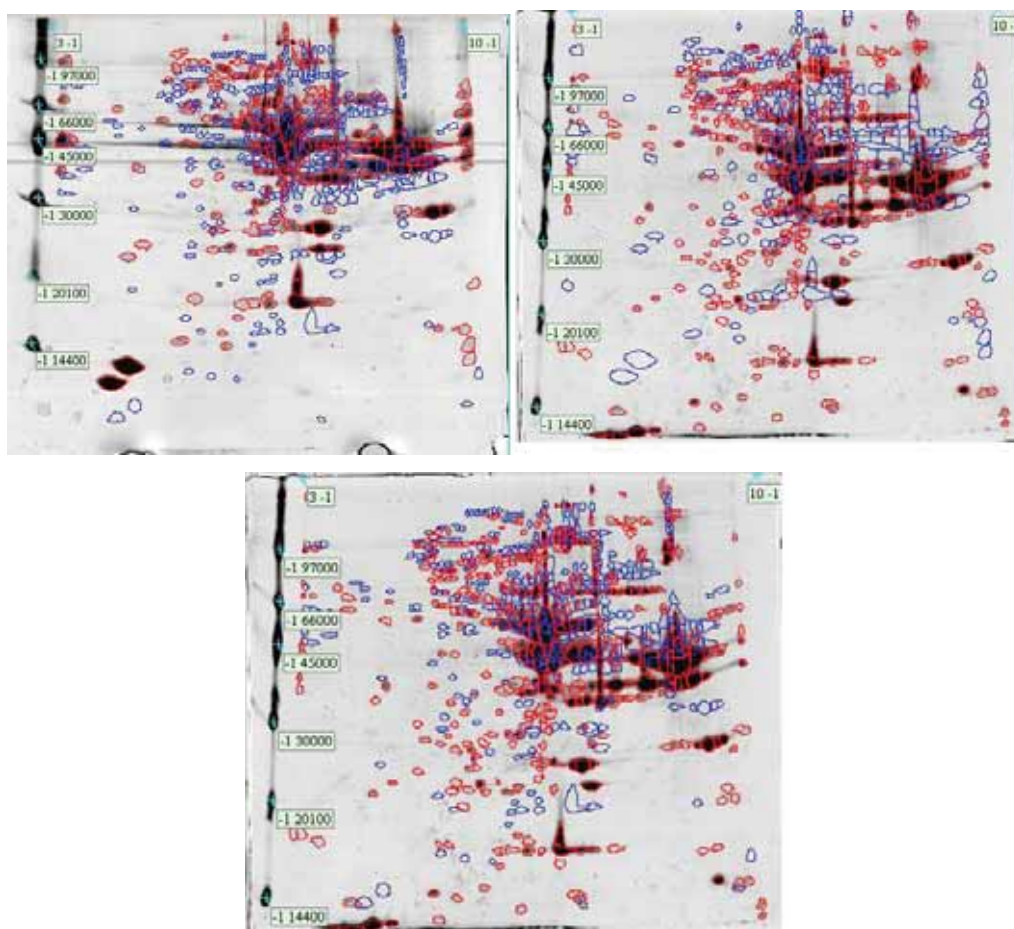


Figura 11. Gel representativo contendo spots em comum aos tratamentos do grupo 3sobrepostos (3Cx3O; 3Cx3I e 3Ox3I)

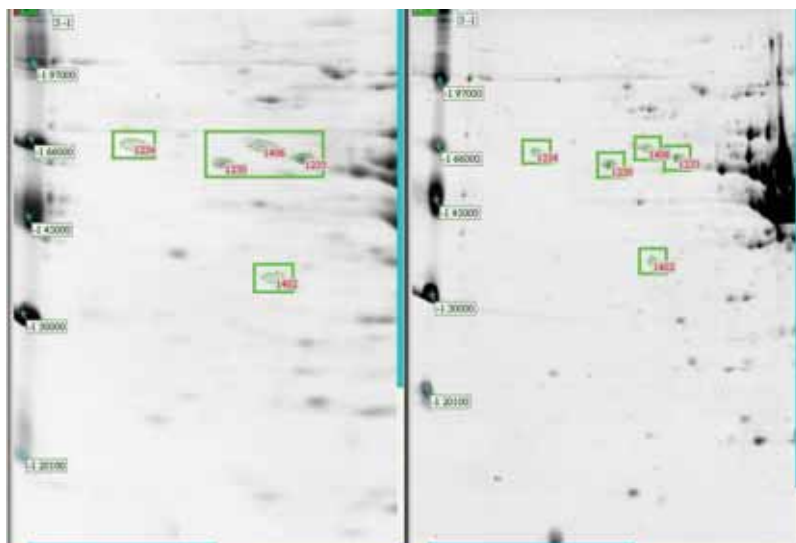


Figura 12. Spots selecionados que apresentaram diferença de expressão entre os tratamentos 3C x 3O

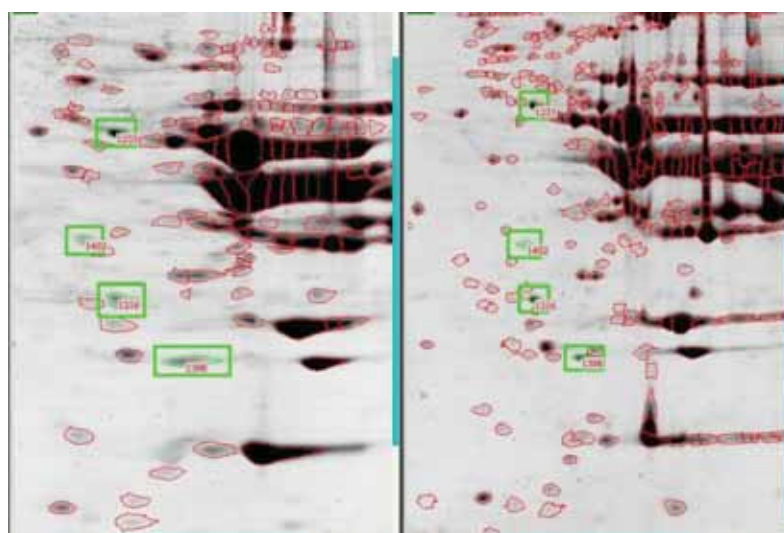


Figura 13. Spots selecionados apresentaram diferença de expressão entre os tratamentos 3C x 3I

3.1.3. Análise comparativa das fontes entre os grupos

Comparando a mesma fonte orgânica entre os grupos, tem-se que para os tratamentos 1O e 3O apenas um spot 13A (1394) foi diferencialmente expresso ($p < 0,10$) pela ANOVA, dois spots (1401 e 1405) para 1O e 2O e um (1405) entre 2O e 3O (Figuras 14, 15 e 16). Diferentemente para a fonte inorgânica entre os grupos, onde foram encontrados três spots (1213, 1283 e 1402) diferencialmente expressos pela

ANOVA ($p < 0,10$) entre os tratamentos 1I e 3I, quatro spots (1209, 1283, 1317 e 1404) entre 1I e 2I e três (1234, 1397 e 1405) para 2I e 3I (Figuras 17, 18 e 19).



Figura 14. Spot 1394 destacado por apresentar diferença de expressão entre os tratamentos 10 x 30

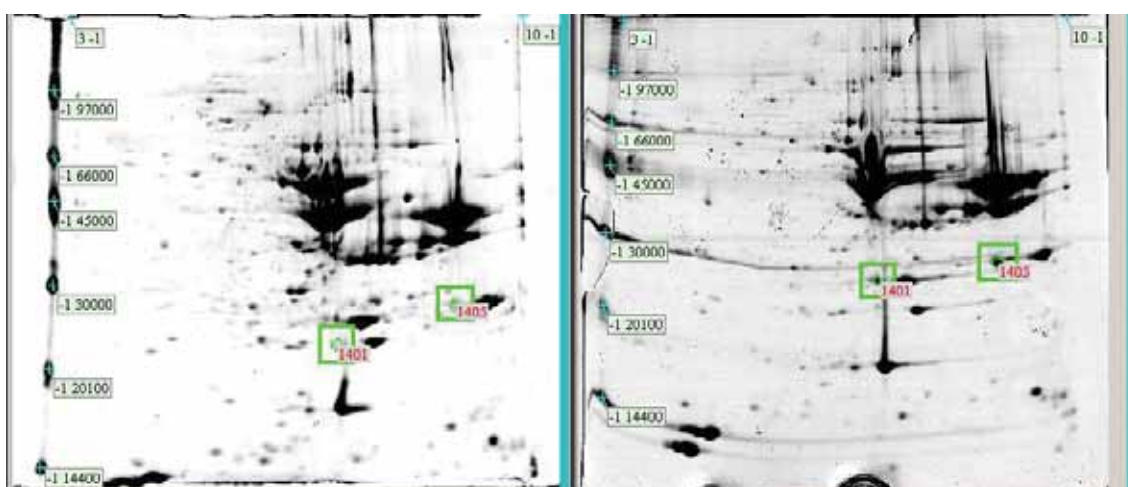


Figura 15. Spots diferencialmente expressos entre os tratamentos 10 x 20

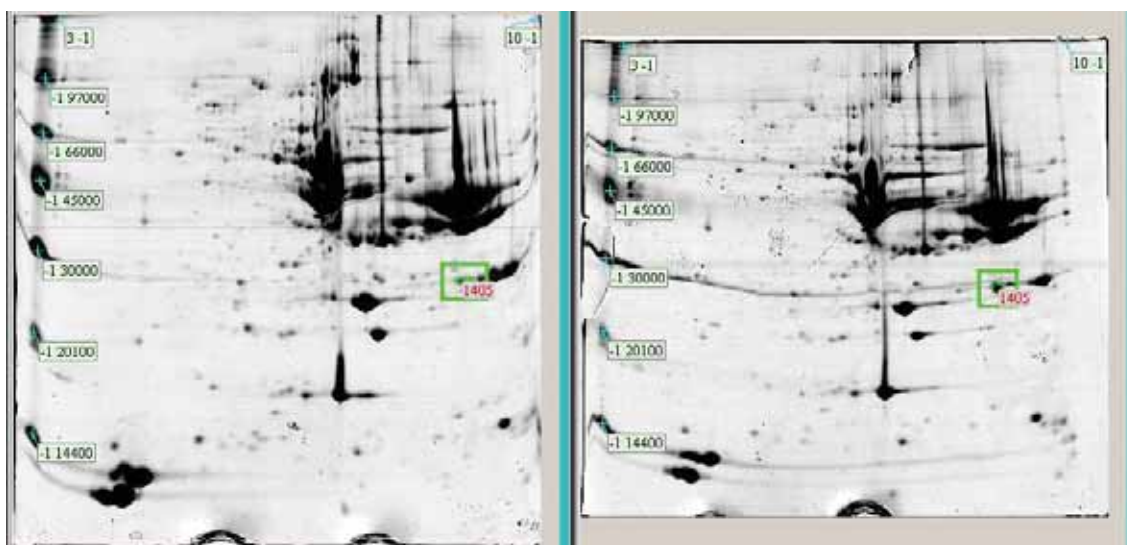


Figura 16. Spot 1405 diferencialmente expresso entre os tratamentos 3O x 2O

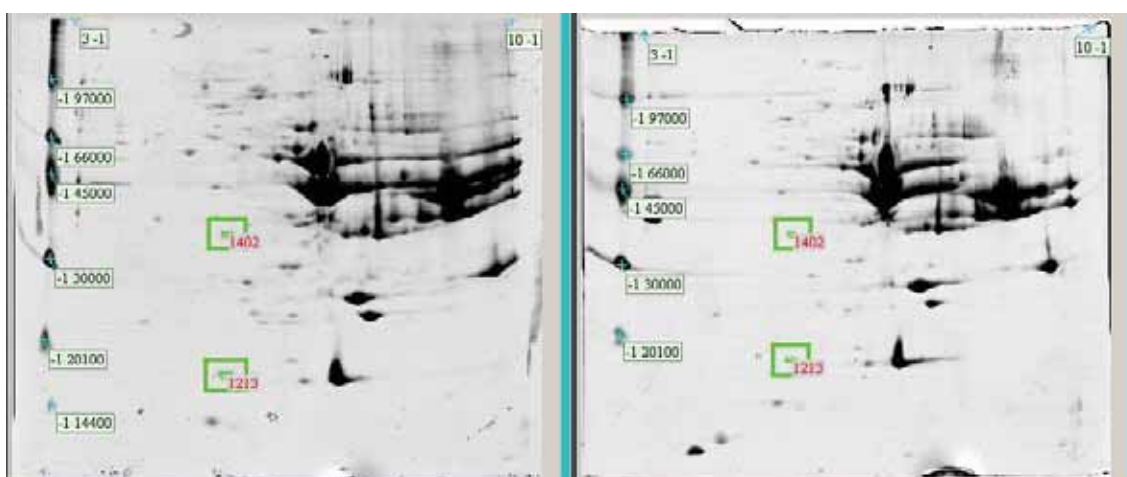


Figura 17. Spots que apresentaram diferença de expressão entre os tratamentos 1I x 3I

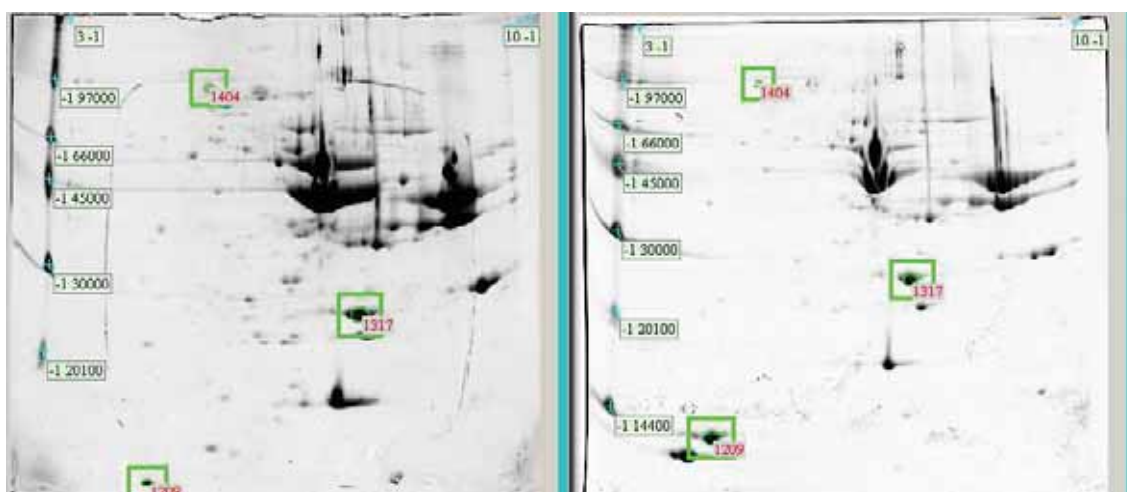


Figura 18. Spots circulosos identificados por diferença de expressão entre os tratamentos 1I x 2I

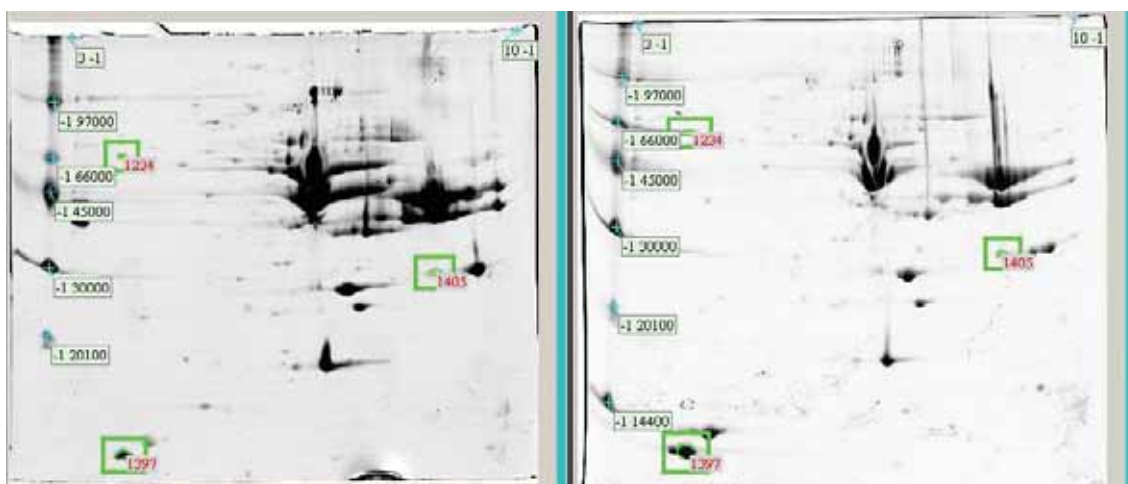


Figura 19. Spots destacados por apresentarem diferença de expressão entre os tratamentos 3I x 2I.

E para os grupos controles, os spots que apresentaram diferença de expressão pela ANOVA ($p < 0,10$) foram três spots (1210, 1214 e 1406) entre 1C e 3C; quatro (1210, 1214, 1230 e 1239) entre 1C e 2C; cinco (1214, 1230, 1233, 1239 e 1406) entre 2C e 3C (Figuras 20, 21 e 22).

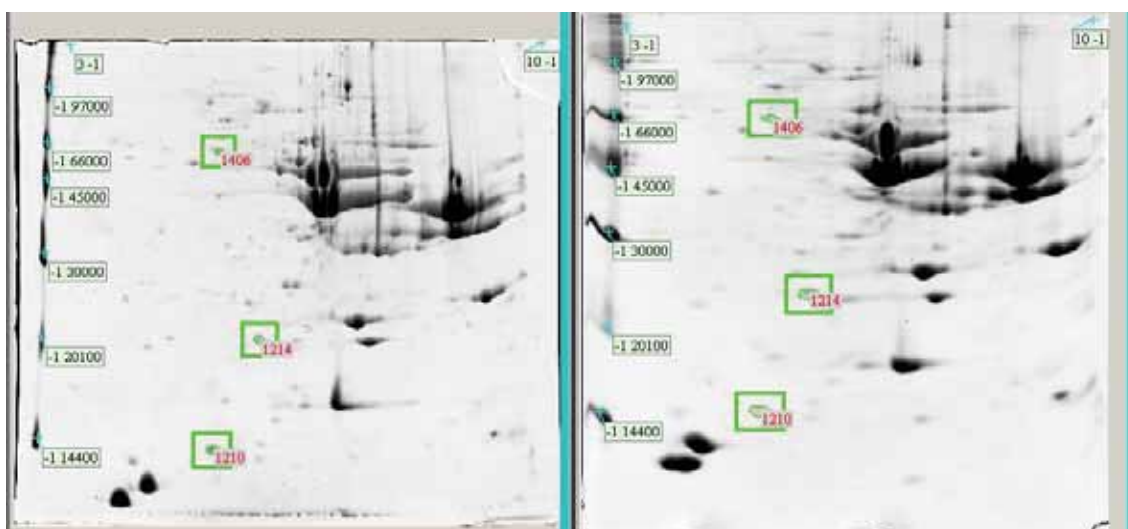


Figura 20. Spots destacados por apresentarem diferença de expressão entre os tratamentos 1C x 3C

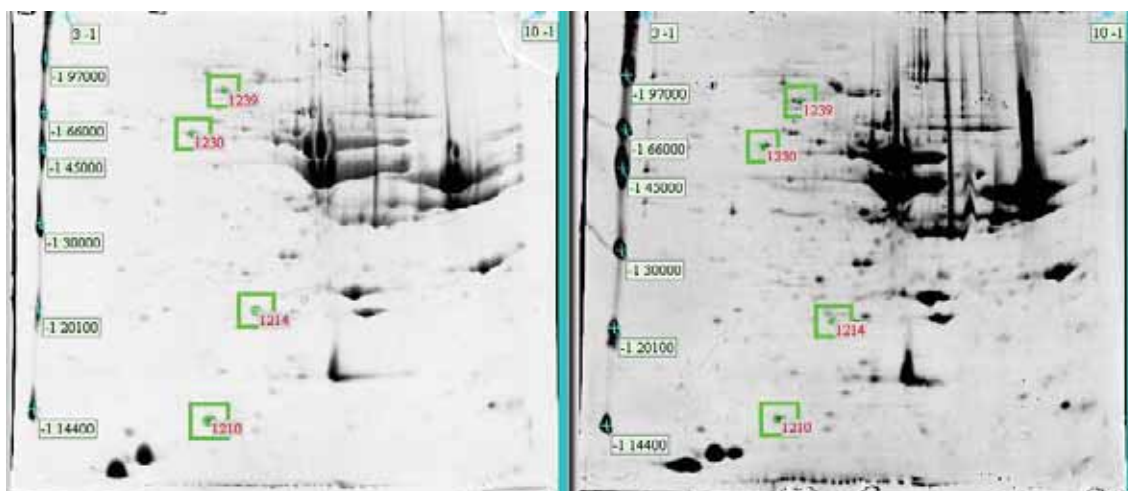


Figura 21. Spots diferencialmente expressos entre os tratamentos 1C e 2C

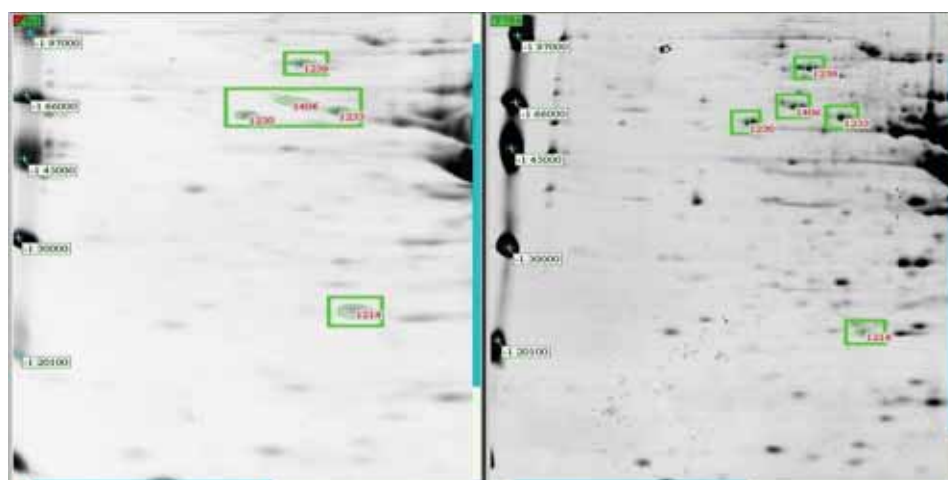


Figura 22. Diferença de expressão dos spots entre os tratamentos 3C x 2C.

A Tabela 2 apresenta a razão entre as porcentagens de alteração de volume entre os diferentes tratamentos entre os grupos.

Tabela 2. Razão dos spots proteicos com porcentagens de alterações de volume entre os diferentes grupos, onde valores positivos e negativos indicam maior ou menor expressão da proteína respectivamente. Considerando expressão diferencial apenas os valores com alterações significativas ($p < 0,10$).

Spot	T1C	T1O	Anova
3 (1210)	+ 2.13	- 2.13	0.046
12A (1401)	+2.23	-2.23	0.086
Spot	T1C	T1I	
3 (1210)	+ 1.20	- 1.20	0.089
Spot	T1O	T1I	
3 (1210)	- 1.39	+ 1.39	0.084
Spot	T2C	T2O	
--			
Spot	T2C	T2I	
1B (1209)	-2.57	+2.57	0.079
Spot	T2O	T2I	
17 (1402)	+ 1.83	- 1.83	0.08
Spot	T1O	T3O	
13A (1394)	+ 2.12	- 2.12	0.083
Spot	T2O	T3O	
39 (1405)	- 4.56	+ 4.56	0.05
Spot	T1O	T2O	
12A (1401)	-2.78	+2.78	0.085
39 (1405)	-7.31	+7.31	0.045
Spot	T1I	T3I	
9A (1213)	+ 3.30	- 3.30	0.074
17 (1402)	+1.60	-1.60	0.09
Spot	T1I	T2I	
1B (1209)	- 3.26	+ 3.26	0.069
28 (1404)	+2.57	-2.57	0.07
40 (1317)	+ 1.33	- 1.33	0.089
Spot	T2I	T3I	
39 (1405)	+1.83	- 1.83	0.08
24A (1234)	+ 1.83	- 1.83	0.09
1 (1397)	+1.84	-1.84	0.07
Spot	T1C	T3C	
3 (1210)	+1.33	-1.33	0.07
10 (12140)	-1.889	+1.89	0.065
41 (1406)	-1.20	+1.20	0.08

Spot	T1C	T2C	
3 (1210)	+2.25	-2.25	0.04
10 (1214)	+2.73	-2.73	0.07
23 (1230)	+1.38	-1.38	0.08
27 (1239)	+1.18	-1.18	0.078

Spot	T2C	T3C	
10 (1214)	-5.36	+5.36	0.05
23 (1230)	-1.65	+1.65	0.06
25 (1233)	-1.36	+1.36	0.08
27 (1239)	-1.61	+1.61	0.09
41 (1406)	-1.66	+1.66	0.06

Tabela 3. Concentração de zinco nos spots diferencialmente expressos

Spot	T1C (mg kg ⁻¹)	T1O (mg kg ⁻¹)	T1I (mg kg ⁻¹)	T2C (mg kg ⁻¹)	T2O (mg kg ⁻¹)	T2I (mg kg ⁻¹)	T3C (mg kg ⁻¹)	T3O (mg kg ⁻¹)	T3I (mg kg ⁻¹)
1	0,002	--	--	0,027	0,01	--	0,0016	0,355	0,0221
1B	--	0,00027	0,073	--	0,0088	--	--	0,116	--
3	0,113	--	0,655	0,120	0,044	--	--	1,676	--
9A	--	1,057	1,216	--	0,083	--	--	--	2,457
10	--	0,042	--	--	0,782	--	--	5,364	--
12A	--	0,304	1,240	--	0,846	--	--	2,658	0,357
13A	--	1,839	--	--	--	--	--	--	--
17	--	0,312	--	--	1,361	--	--	--	--
23	--	1,079	0,169	--	--	0,208	--	--	1,160
24A	--	1,499	--	--	0,630	--	--	--	--
25	--	0,596	0,832	--	0,322	0,052	0,141	--	--
27	--	--	--	--	1,056	--	--	--	--
28	0,325	0,145	--	--	1,312	--	--	--	--
39	--	--	1,107	--	0,193	0,426	--	--	--
40	0,0016	--	0,0201	--	--	0,028	--	--	--
41	--	--	1,323	--	0,946	0,099	--	--	--

Observa-se que ao comparar o ZnC com as demais fontes, encontram-se maiores expressões para os controles, como no caso de T1CxT1O, T1CxT1I e entre os grupos do zinco controle, os tratamentos dos grupos G1 e G3 são sempre mais expressos em relação ao G2, como no caso de T1C x T2C e T2C x T3C.

Entre as fontes de mesmo grupo, tem-se que T1C é mais expresso que T1O e T1I, independente da concentração de zinco. Já entre as fontes orgânica e inorgânica no grupo 1 o ZnI é mais expresso com maior concentração de zinco, porém, diferentemente no G2, o ZnO que é mais expresso juntamente com menor concentração do elemento.

Ao comparar as fontes entre os grupos, encontra-se na fonte orgânica que G1 e G2 são mais expressos acompanhados das maiores concentrações, diferentemente do G3 que é mais expresso com menor concentração de zinco, (T1OxT3O; T2OxT3O; T1OxT2O). Para a fonte inorgânica as maiores expressões se encontram no G1,

independente da concentração de zinco ser maior, menor ou ausente. E para o controle, observa-se que G1 e G3 são mais expressos, independentemente de suas concentrações de zinco.

Analisando cada spot, verifica-se que os mais expressos exclusivamente no tratamento ZI quando comparados aos outros grupos da mesma fonte foram os spots 1, 9A, 28 e 40 (T2IxT3I, T1IxT3I, T1IxT2I e T1IxT2I). Spot 1B é mais expresso somente para 2I, seja entre as fontes do mesmo grupo (T2CxT2I) ou entre os grupos de mesma fonte (T1IxT2I). O spot 24A também é mais expresso no 2I entre T3IxT2I.

Spot 3 analisado entre as fontes de mesmo grupo é mais expresso no grupo 1C e 1I entre T1CxT1O e T1CxT1I e T1OxT1I, respectivamente e entre os grupos de mesma fonte o 1C é mais expresso entre T1CxT3C e T1CxT2C.

O 12A se apresenta da mesma forma, sendo mais expresso no 2O entre (T1OxT2O) em relação aos grupos de mesma fonte e no 1C entre T1CxT1O entre as fontes do mesmo grupo. Os spots 10, 23, 25 e 27 também são mais expressos no 1C quando comparados com T2C. Contudo, os mesmos spots também são mais expresso no 3C entre T1CxT2C e T2CxT3C, respectivamente.

O spot 17 se destaca no tratamento 2O e 2I entre T2OxT2I e T1IxT3I. O spot 41, entre os grupos de mesma fonte no 3C (T1CxT3C e T3CxT2C). E o spot 39 é o único que se apresenta mais expresso entre os grupos de mesma fonte no grupo 2, seja orgânico ou inorgânico (T1OxT2O e T3IxT2I).

Pode-se sugerir que a maior expressão de alguns spots não necessariamente está relacionada com a maior concentração de Zn, uma vez que dos trinta spots diferencialmente expressos, treze estão em maiores concentrações, doze ausentes e apenas cinco nas menores.

3.2. Caracterização das proteínas

Todas as proteínas que na análise com o software apresentaram diferença de expressão significativa ($p < 0,10$) conforme a ANOVA ou estavam ausentes em um grupo e presentes em outro, foram submetidas à espectrometria de massa, totalizando 15 proteínas diferencialmente expressas, ilustradas na figura 23 e apresentadas na tabela 4.

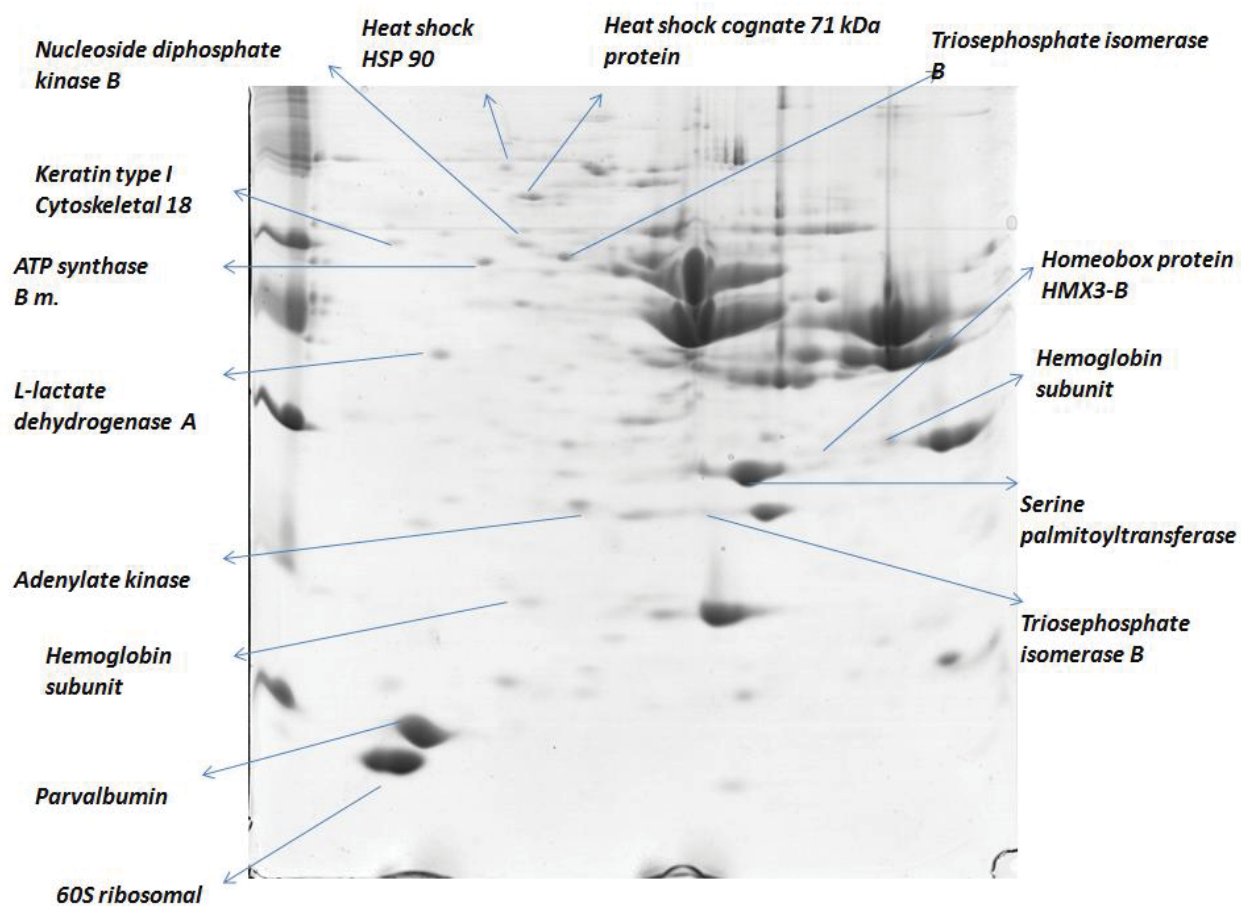


Figura 23. Proteínas diferencialmente expressas no tecido muscular de tilápia do Nilo, caracterizadas por ESI/MS

Tabela 4. Proteínas diferencialmente expressas entre os tratamentos caracterizadas por ESI MS/MS

Spot	Proteína	Acesso	Score	PI/MM experimental	MM massas	MM teórica	Cobertura (%)	Peptídeos Sequenciados
1	Parvalbumin beta	P02618	281.426	3.86/ 11817.2	12109.9331	11.436	32.41	AFAIIDQDK AFAGVLNDADIAAALEACK SADDVKK
1B	60S ribosomal protein L34	Q7ZW17	138.0635	4.22/ 8269.4	14474.2055	13.369	11.11	AFLIEEQK TPGNR
9A	Hemoglobin subunit alpha-B	Q9PVM3	168.7009	5.28/ 16561	16549.7568	15.948	5.56	VALALAER VALALAER
10	Adenylate kinase isoenzyme 1	P12115	2917.746	5.7/ 22306.5	22550.0651	21.489	29.9	GYLIDGYPR YGYTHLSSGDLR QLQAIMQK ADVSK AEVASGSR GELPLDVLDMIK GYLIDGYPR
13A	Homeobox protein HMX3-B	Q90XN9	95.0896	8.26/ 27732	33624.6249	32.606	2.76	LGDLSLPR QLAAELEAANMSHAAAQR LGDLSLPR LGDLSLPR LGDLSLPR
17	L-lactate dehydrogenase A chain	O93543	188.3847	5.34/ 33539	37578.195	36.043	21.45	VLGSGTILDSAR AIHKEVVDGAYEVIK VVVVTAGAR GEVMDLQHGSFLKTK NMHKVHPVSTLVQGMHGKVK
23	ATP synthase subunit beta. mitochondrial	Q9PTY0	10180.07	4.85/ 57379.8	56423.6529		61.39	LVLEVAOHLGENTVR FTQAGSEVSALLGR VALTGLTVAEYFR AHGGYSVFAGVGER IPVGPETLGR VLDTGAPIR VALVYQGMNEPPGAR TIAMDGTGLVLR IMNVIGEPIDER GSITSVQAIYVPADDLTDPAPATTF AHLDAITTVLSR IMDPNVGSEHYDVAR TVLIMELINNVAK EGNDLYHEMIESGVINLK TREGNDLYHEMIESGVINLK IPSAVGYQPTLATDMGTMQER DQEQDVLFLFDNIFR LTVAR AIAELGIYPVDPDLDSTSF QTAPIHAEAPEFTDMSVEQEILVTGIK LAEHS VLDTGAPIRIPVGPETLGR IMNVIGEPIDERGPITTK SLQDIILGMDLSEEDKLTIVAR DQEQDVLFLFDNIFRFTQAGSEVSALLGR TIAMDGTGLVLR VALVYQGMNEPPGAR IMNVIGEPIDEI IPSAVGYQPTLATDMGTMQER IMDPNVGSEHYDVAR IMNVIGEPIDERGPITTK AHGGYSVFAGVGER

24A	Keratin, type I cytoskeletal 18	O57607	71.4868	3.9/ 62125.5	50055.2469	48.779	10.96	MNLESEIEALKEELJFLK VVSSSTETKER LAADDFR VMTVTQTLVDGK
25	Triosephosphate isomerase B	Q90XG0	252.6277	5.64/ 59046	28391.9705	26.828	16.53	TNVSEAVANSVR ELASQKDLDDGFLVGGASLKPEFIDIINAK
26A	Hemopexin	Q6PHG2	1645.737	5.8/ 92363.5	53926.3565	51.027	11.41	VHLDAITSDDAGNIYAFR GHFLSITGDK HELHHGAQLDR GDHLFKGFHGK
27	Heat shock cognate 71 kDa protein	Q9W6Y1	1692.162	5.31/ 81277	79626.36	76.169	19.1	TTPSYVAFDTER VEIANDQQNR FEELNADLFR TVNNAVITVPAYFNSQR NQVAMNPTNTVFDAGR STAGDTHLGGEDFDR LNQFFPITIT GQIHDIVLVGGSTF MVNHFIAEFKR MVNHFIAEFK NOVAMNPTNTVFDAGR ARFEELNADLFR VQVEYKGETK ARFEELNADLFR
28	Heat shock protein HSP 90-alpha 1	Q90474	2279.747	5.04/ 92578	87564.4412	83.319	14.07	GVVDELDPLNISR DQVANSFVER ALLFVPR HFSVEGQLEFR LGIHEDSQNR EIFLR YYTSASGDEMVSLLKDYVSR YYTSASGDEMVSLLK DYVSR HSQFIGYPTILYIEK
39	Hemoglobin subunit alpha-B	Q9PVM3	255.7209	8.9/ 26860	16549.7568	15.948	15.28	VALALAEER HGAIIMGGIGKAVK
40	Serine palmitoyltransferase small subunit A	B9EN89	147.9368	7.48/ 23972	8252.7758	8.167	54.41	AIFNSILISVAGMAVYTYVYFMPQHMAILQYFEMVQ
41	Nucleoside diphosphate kinase B	P85291	973.1249	5.23/ 62690	14936.6794	14.118	30.16	TFIAKPDGVQR MMLGETNPADSKPGSIR GDFCINIGR

Os resultados apresentados na Tabela 4 apresentam que foi possível caracterizar por ESI MS/MS 15 proteínas. Observa-se em anexo as demais proteínas caracterizadas onde o zinco também foi identificado. A seguir discutiremos a função dessas proteínas caracterizadas nos spots proteicos analisados por ESI MS/MS fracionadas do tecido muscular das amostras de peixes estudadas.

Parvalbumin

É uma proteína de baixa massa molar (11-12 kDa), apresenta as isoformas *parvalbumin-2*, *parvalbumin alfa* e *parvalbumin beta*, todas as três isoformas normalmente se ligam à íons cálcio. Essa proteína no tecido muscular está diretamente envolvida em processos de relaxamento muscular após contração do mesmo. Essa proteína é basicamente formada por sequências peptídicas que contém serina e alanina – aminoácidos que apresentam estruturas com grupos carboxílicos, amino e hidroxila, suscetíveis à complexação de íons metálicos divalentes, principalmente cálcio e magnésio [22].

A *Parvalbumin* foi caracterizada no spot 1 sendo mais expressa no T2I em relação ao T3I, justamente porque maiores níveis de *parvalbumin* são encontradas em músculo branco de peixes, sendo mais expressa nos que requerem ritmos mais rápidos de contração muscular [23], o que está relacionado a mobilização dos peixes do G2 para estabelecer dominância.

Portanto, T2I possui concentrações de zinco superiores ao T3I, além de serem do Grupo G2 onde peixes menores se movimentam mais rapidamente, o que requer maiores atividades musculares.

Keratin type I cytoskeletal 18

Proteína que atua na ligação do aparelho contrátil à distrofina nos costâmeros do músculo estriado, podendo apresentar mais de uma isoforma. Essa proteína é dita sub-sarcolemal, pois se encontra nessa região das fibras musculares. São essas proteínas sub-sarcolemais que agregam mecanicamente a unidade contrátil do músculo à membrana plasmática, prevenindo danos ao sarcolema [24].

O spot 24A foi caracterizado como sendo *Keratin type I*, sendo mais expressa em T2I em relação a T3I, possivelmente pela maior atividade muscular do G2 que estavam estabelecendo a dominância.

Nucleoside diphosphate kinase B

As NDKs catalisam a transferência do fosfato de NTPs para NDPs por um mecanismo do tipo “ping-pong”: A enzima liga-se ao seu primeiro substrato (ATP) e um grupo fosforil é transferido para a cadeia lateral de um resíduo de histidina. O ADP sai e outro nucleosídeo ou desoxinucleosídeo difosfato o substitui. Este é convertido para o trifosfato correspondente pela transferência do grupo fosforila ligado ao resíduo de fosfo-histidina [25].

Na preparação para as diferentes funções biológicas, os nucleotídeos são formados e mantidos como nucleosídeo trifosfato (NTP) mediante transferência do grupo fosforila aos nucleosídeos difosfato (NDPs) e monofosfato (NMPs) correspondentes. A enzima nucleosídeo difosfato quinase catalisa a transferência de grupos fosforila do ATP em duas etapas, constituindo um mecanismo com deslocamento duplo (pingue-pongue): a transferência do grupo fosforila do ATP para um resíduo de histina e deste para um receptor de NDP para outros nucleotídeos. A enzima não é específica para a base NDP, sintetizando todos os NTPs e dNTPs desde que fornecidos os NDPs correspondentes e um suprimento suficiente de ATP [25].

O spot 41 foi caracterizado como NDP, sendo mais expresso no G3 para zinco controle em relação ao G2 e G1 controles, apresentando ter função adicional regulatória para crescimento e controle de desenvolvimento [25]. A maior demanda de ATP pelas fibras musculares destes grupos de peixes, o G3 como tem menor necessidade de ATP, mantém nucleosídeos difosfatos armazenados prontos para rapidamente serem usados entre diferentes estruturas [25]. Através da enzima nucleosídeo difosfato quinase outros nucleotídeos similares ao ATP podem ser sintetizados a partir de seus difosfatos, por exemplo, UTP (uridina trifosfato), GTP (guanosina trifosfato) e CTP (citidina trifosfato), todos os quais tomam parte nas fosforilações celulares [25].

Homeobox protein HMX3-B

Pertencente à família Ikaros, reguladores de transcrição dependente de dedo de zinco em suas estruturas, são importantes reguladores do desenvolvimento do sistema imune [26].

O spot 13A foi caracterizado como HMX3, sendo mais expressa no T1O em relação T3O, aparecendo somente nos tratamentos de zinco orgânico, possivelmente pela concentração de zinco quantificada no G1 uma vez que o íon foi identificado em suas estruturas.

Heat shock protein HSP90 – alpha 1

As chaperonas são nomeadas com a sigla Hsp, do inglês, por serem super heat shock proteins expressadas em condições de aumento de temperatura, condição que favorece o enovelamento incorreto de proteínas, sendo identificadas principalmente por seu peso molecular aproximado, dado na unidade quilodalton (kDa): HSP40, HSP70, HSP90, etc. O grupo das heat shock proteins está entre os de maior número entre as proteínas celulares. Normalmente correspondem a 1 a 2 % de todas as proteínas encontradas nas células que não são submetidas a estresse. Como o seu nome indica são proteínas que protegem as células submetidas a estresse por temperaturas elevadas. Nesta situação o seu número sobe e pode corresponder de 4 a 6% das proteínas celulares [27].

A função da maioria das HSPs está envolvida no dobramento e união de proteínas celulares nativas. Sob condições de estresse, as HSP atuam de forma a impedir a desnaturação ou agregação das proteínas citoplasmáticas [28-29], além de migrarem até o núcleo da célula reparando e protegendo as proteínas nucleares, minimizando sua agregação e prevenindo danos genéticos [30]. Embora as HSPs possuam uma meia vida relativamente curta, o aumento nos níveis celulares no momento do estresse, e a manutenção da expressão mesmo após um longo tempo que o estressor já tenha sido removido, possui finalidade de proteger os organismos frente a estresses subsequentes [31-32].

Dentre este grupo, a heat shock protein 90 (Hsp90) é uma das proteínas mais numerosa, envolvida no processo de ativação de moléculas, como kinases, fatores de transcrição, entre outras. Por outro lado, a proteína HSP90 é, possivelmente, a proteína

constitutivamente expressada mais abundante no citoplasma de eucariotos. A interação mais estudada da HSP90 é com o receptor inativo de hormônios esteróides. Esta e outras associações de HSP90 aparentam ter como principal característica a estabilização de proteínas marcadas em um estado inativo, parcialmente dobradas ou desmontadas [33].

O fato das HSPs serem induzidas por diversos tipos de estressores, como alterações na temperatura, salinidade, pH, oxigênio dissolvido e metais contaminantes [33], e de serem as proteínas de defesa mais comumente induzida em respostas a condições fisiológicas sub-ótimas, fez com que o nome —Proteínas de Choque Térmico fosse substituído por —Proteína de Estresse, como termo mais geral que abrange melhor sua amplitude de ação [34].

O spot 28 foi caracterizado como HSP90, sendo mais expresso no tratamento T1I em relação ao T2I. Os estudos indicam que a expressão das HSPs parece ser espécie-específica, não havendo um padrão definido para os peixes ou demais organismos. Porém o emprego da análise dessas proteínas é bastante relevante na compreensão dos limites de tolerância, da distribuição e das respostas ao estresse nos organismos, avaliando suas respostas a ambientes instáveis, a alterações antrópicas, ou a alterações abióticas drásticas. Porém estudos indicam que a expressão e indução de HSPs dependem de variáveis como a duração do estresse [35] e do tipo de tecido utilizado [36-37].

Heat shock cognate 71kDa protein

A proteína de choque térmico 70 (Hsp70) contém ambos os membros da família e expressa constitutivamente induzida pelo calor. Estes últimos são chamados de choque térmico cognato proteínas (HSC). A proteína de choque térmico de 70 kDa também conhecido como Hsc70 pertence ao choque térmico subgrupo cognato. Esta proteína liga-se a polipeptídeos nascentes para facilitar a dobragem correcta da proteína. Ele também funciona como uma ATPase na desmontagem de vesículas revestidas de clatrina durante o transporte de componentes da membrana, através da célula [38]. Hsc70 é um componente chave de autofagia mediada por chaperona em que ele transmite a selectividade para as proteínas serem degradados por esta via lisossomal [39].

O spot 27 foi caracterizado com Hsp71, sendo mais expresso no T1C e T3C em relação ao T2C, possivelmente por ser proteína de tecido animal alimentado com dieta isenta de suplementação de zinco, fazendo com que o metabolismo necessite se adaptar a condições adversas [37-40], mais comumente utilizada como biomarcador devido ao seu aumento rápido e significativo frente uma gama de estressores [38]. Sua resposta ao choque térmico (HSR ou Heat-Shock Response) medida através da atividade ou expressão de HSPs contribui para determinação dos limites de tolerância dos organismos [39].

60S ribosomal protein L34

As ubiquitinas são polipeptídeos envolvidos no controle do ciclo celular, na replicação do DNA e na resposta ao estresse através da rota proteolítica dependente da ubiquitina [41]. A proteína ribossomal L34 é componente da subunidade 60S do ribossomo e tem como função molecular se ligar a íons metálicos como zinco, além de ser parte constituinte do ribossomo, pois apresenta domínios com grupos específicos para ligação de zinco (*zinc-finger metal binding domains*) [42].

Essa proteína foi caracterizada no spot 1B, sendo mais expressa em T2I em relação ao T2C, justamente pela maior quantidade de zinco no TI uma vez que essa proteína necessita do zinco em sua estrutura para exercer sua função e em T2I em relação a T1I.

Triosephosphate isomerase B

Triose Fosfato Isomerase (EC 5.3.1.1) é uma enzima, pertencente à classe das isomerases e sub-classe das oxidoredutases intramoleculares [43]. A TPI apresenta-se em sua forma ativa como homodímero, sendo responsável pela conversão reversível de diidroxiacetona fosfato em gliceraldeído 3-fosfato. Esta reação está relacionada com importantes vias metabólicas, como glicólise, gliconeogênese e síntese de ácidos graxos, responsáveis principalmente pela produção de energia [43-44].

A presença de alguns resíduos de aminoácidos altamente conservados na seqüência de TPI tem sido útil na caracterização de novas seqüências ortólogas depositadas em bancos de dados. Três principais resíduos, Lys13, His95 e Glu167, são responsáveis pela formação da região catalítica da molécula [45-46]. Os resíduos

conservados Arg191 e Asp227, são descritos como essenciais na formação e estabilização da estrutura dimérica [47].

Caracterizada no spot 25, sendo mais expressa em T3C em relação a T2C, possivelmente porque quando a glicose é decomposta em duas moléculas de piruvato, este juntamente com o $\text{NADH} + \text{H}^+$ necessitam do oxigênio para entrarem na mitocôndria e serem convertidos, diferentemente do grupo 2 que apresenta ter maior atividade muscular e conseqüentemente metabólica, ou seja, como a demanda de oxigênio é grande, o organismo é atendido, porém, o grupo 3 por apresentar menor atividade, a presença do oxigênio no meio acaba sendo inferior e por isso aumenta a participação da proteína.

ATP synthase subunit beta mitochondrial

A ATP synthase mitochondrial (EC 3.6.3.14) é uma ATPase composta por dois domínios estruturais do tipo F (Fo e F1). Fo é um complexo integral localizado na membrana interna da mitocôndria, responsável pela translocação de prótons. Já F1 é extramembranar, formados por 9 subunidades, sendo que cada subunidade apresenta 3 domínios (N-terminal, de ligação a nucleotídeo e C-terminal), possuindo mudanças conformacionais extremamente necessárias para a síntese de ATP, uma vez que as unidades α e β giram, catalisando assim a formação de ATP. Portanto, uma unidade β inicia com a conformação β -ADP que tem afinidade pelo $\text{ADP} + \text{P}_i$ que ao se ligarem muda a conformação para β -ATP, o qual estabiliza o ATP promovendo o equilíbrio do $\text{ADP} + \text{P}_i$ com o ATP na superfície da enzima. E posteriormente muda para a conformação β -vazia que possui baixa afinidade ao ATP, deixando a superfície da mesma [48-49].

Essa proteína relacionada ao metabolismo energético foi caracterizada no spot 23, sendo mais expressa em T3C em relação T2C.

Hemoglobin subunit alpha-B

Envolvida no transporte de oxigênio a partir das brânquias para os vários tecidos periféricos no caso de peixes [50], porém como o oxigênio é pouco solúvel em soluções aquosas e não conseguiria ser transportado aos tecidos em quantidades suficientes se fosse simplesmente dissolvido no sangue. Para isso, os organismos exploram as

propriedades dos metais, principalmente o ferro, incorporado em um grupo prostético ligado a proteína, chamado de heme. Este consiste em uma estrutura orgânica complexa em anel, a protoporfirina, (precursor da parte da hemoglobina) a qual se liga um único átomo de ferro no seu estado ferroso (Fe^{2+}). Este, por sua vez, pode fazer até seis ligações coordenadas, no caso do complexo heme, quatro átomos de nitrogênio, que são parte do sistema achatado do anel da porfirina e duas perpendiculares com um átomo de oxigênio e com uma globina fora do grupo heme. Os átomos de nitrogênio coordenados (que possuem um caráter doador de elétrons) ajudam a impedir a conversão do ferro do heme ao estado férrico (Fe^{3+}) [25].

O Heme é formado no eritrócito em maturação pela incorporação de um íon ferroso à protoporfirina IX por meio de uma reação catalizada pela ferroquelatase. Normalmente a Zn-PP é formada em pequenas quantidades durante a síntese do Heme. Ela se liga à globina no local do Heme circulando na célula madura na qualidade de metaloporfirina não-funcionante. Se houver suficiente Ferro disponível no substrato, o íon Zinco é substituído na reação com protoporfirina IX. O Zn-PP formado nesse processo de quelação é estável e permanece no eritrócito circulante. O nível de Zn-PP intracelular é, pois, um indicador funcional da disponibilidade de Ferro durante a maturação eritrocítica [51].

O spot 9A foi caracterizado como sendo uma *Hemoglobin subunit beta-A/B*, proteína relacionada ao transporte, sendo mais expressa no T1I em relação ao T3I, justamente porque peixes menores possuem aumento no metabolismo, implicando em um maior gasto de oxigênio e o fato da hemoglobina reduzir sua afinidade pelo oxigênio significa que ela liberará maior quantidade do mesmo nos tecidos, mesmo sem uma diminuição da pressão parcial, esse processo denominado efeito Bohr. Nas brânquias, ocorre excreção de CO_2 fazendo com que o pH sanguíneo aumente, favorecendo a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio novamente [52].

L-lactate dehydrogenase A chain

Converte o piruvato em Lactato com regeneração de NAD em NADH. É uma via alternativa para suprir a falta de oxigênio para a oxidação aeróbica do piruvato e do NADH produzidos na glicólise [25].

Caracterizada no spot 17, sendo mais expressa no T2O em relação a T2I, pela presença do zinco e sua concentração no 2O, uma vez que essa proteína necessita do zinco em sua estrutura.

Serine palmitoyltransferase small subunit A (SPT)

Pertencente à família das POAS e ligada à membrana do retículo endoplasmático [53]. Enzima que catalisa a primeira reação dos esfingolípídeos, condensando serina e palmitoil CoA formando 3-ceto-dihidro-esfingosina (3KDS) ou 3-cetoesfinganina, requerindo pirodoxal 5'-fosfato para a atividade enzimática. Utiliza L-serina como substrato estritamente entre os aminoácidos onde todos os grupos hidroxil, amino e carboxílico são responsáveis pelo seu reconhecimento pela enzima [54]. Esfingolípídeos complexos tem funções importantes em membranas celulares, incluindo estabilização, identificação de lipídeos e proteínas das membranas, ligação a elementos citoesqueléticos e reconhecimento célula a célula [54].

Possui três subunidades distintas e ligadas na membrana externa do retículo endoplasmático SPTLC1, SPTLC2 e identificada recentemente SPTLC3. Existe uma similaridade de 20% entre os aminoácidos de SPTLC1 e SPTLC2, porém 84% entre SPTLC2 e SPTLC3 [54].

Essa proteína foi caracterizada no spot 40, sendo mais expressa no T1I em relação ao T2I, onde a taxa de esfingolípídeos está correlacionada com as concentrações de serina e ácido palmítico e não com outros ácidos graxos, sugerindo que a síntese de esfingolípídeos reflete os níveis de serina e palmitoil-CoA, sendo esta mais expressa no G1 [53].

Ressalta-se que todas as proteínas que tiveram diferença de expressão entre os grupos ou fontes e não só terem o zinco identificado como serem zinco dependentes, pode-se inferi-las como possíveis biomarcadores.

Considerando a revisão das proteínas caracterizadas acima, pode-se resumir seus processos de envolvimento da seguinte forma (Figura 24).

A biossíntese proteica é resultado do processo de tradução da informação contida no material genético da célula; as proteínas são, portanto, a expressão da

informação genética. A síntese proteica é um fenômeno complexo que ocorre em duas etapas: A transcrição e a tradução.

A transcrição é o processo de síntese de uma molécula de RNA usando como molde a sequência de uma cadeia de DNA de um gene.

A maior parte do DNA de uma célula eucariota está no núcleo, não passando através da membrana nuclear dadas as suas dimensões. A transcrição, que ocorre no núcleo, irá permitir que a informação genética contida no DNA passe para o citoplasma sob a forma de uma molécula de RNA de menores dimensões, possibilitando a síntese proteica.

Para que ocorra a síntese de RNA é necessária a enzima polimerase de RNA, nucleótidos e energia (sob a forma de ATP). O processo de transcrição, com algumas semelhanças à replicação do DNA, ocorre em três etapas: iniciação, alongamento e terminação das cadeias polinucleotídicas de RNA sintetizado, tendo participação da *HMX3*. Inicia-se com a abertura e separação de pequena porção das duas cadeias de DNA. Uma das cadeias de DNA irá servir de molde à síntese da molécula de RNA. Tal como na replicação do DNA, a sequência de nucleótidos na cadeia de RNA é determinada pela complementaridade no emparelhamento das bases entre os novos nucleótidos e a cadeia de DNA molde. Cada nucleótido acrescentado à cadeia ribonucleotídica liga-se covalentemente ao último nucleótido da nova cadeia de RNA, sendo este processo catalisado pela enzima polimerase de RNA.

A etapa de tradução ocorre no citoplasma e consiste na leitura da mensagem do RNAm, produzido a partir de um molde de DNA, da qual resulta a produção de sequência de aminoácidos que, em cadeia, constitui uma proteína e cada aminoácido pode ser transportado por mais de uma molécula de RNAt. Além destes, o ribossomo que pode estar na forma livre ou associado ao retículo endoplasmático, quando sintetizam proteínas que serão "exportadas" da célula. São formados por duas subunidades, uma maior e outra menor, cujas características são expressas em termos de coeficientes de sedimentação, ou "S" (de Svedberg). O ribossomo eucariótico é formado por uma subunidade 60S e outra 40S, portanto participação da proteína 60S ribossomal.

Considerando que a demanda de síntese protéica é alta, conseqüentemente, a quantidade de proteínas que podem formar enovelamentos irregulares aumenta, exigindo maior participação das proteínas *HSP*. Além disso, o metabolismo exige

produção de ATP da via glicolítica, onde a glicose é decomposta em duas moléculas de piruvato e formam-se também duas moléculas de ATP e $\text{NADH} + \text{H}^+$. Na presença do O_2 , o piruvato e o $\text{NADH} + \text{H}^+$ conseguem entrar nas mitocôndrias para serem convertidos em acetil CoA para entrar no ciclo de Krebs, produzindo CO_2 , NADH e FADH_2 . Estes dois últimos doam elétrons de alta energia que por fosforilação oxidativa na cadeia respiratória reduzem o O_2 à água na presença de íons H^+ , tendo participação da proteína *ATP sintase*.

Considerando que a atividade muscular exige muito O_2 , que é transportado pela Hemoglobina. No entanto, quando a quantidade de O_2 não é suficiente para atender essa atividade intensa, a fermentação láctica pode também ajudar na produção de energia e regeneração das coenzimas reduzidas, onde prevalece a participação da *Lactato Desidrogenase*. Além disso, outras proteínas podem ser direcionadas para biossíntese do tecido muscular, como a *Parvalbumin*, e proteínas estruturais como a *Keratin*, favorecendo a contração muscular [25].

Com relação às diferenças de expressão das proteínas, observa-se que ao comparar os grupos de mesma fonte, verifica-se que à medida que aumenta os tamanhos, a expressão das proteínas dos animais alimentados com zinco orgânico também aumenta e diferentemente para os alimentados com zinco inorgânico que a expressão diminui com o aumento dos tamanhos. Além disso, para aquelas proteínas que possuem zinco em sua estrutura, a maior expressão dá-se para aquela que possuir maior concentração de zinco, no caso. Porém observa-se de uma maneira geral, independente do grupo analisado, houve um maior número de proteínas mais expressas para os peixes alimentados com zinco inorgânico, em relação ao orgânico, apesar da fonte orgânica ser melhor absorvida é a inorgânica que pode contribuir para o aumento das expressões das proteínas, justamente por não acompanhar a concentração de zinco e/ou sua identificação, o que possivelmente justifica as melhores respostas de desempenho analisadas em vários estudos.

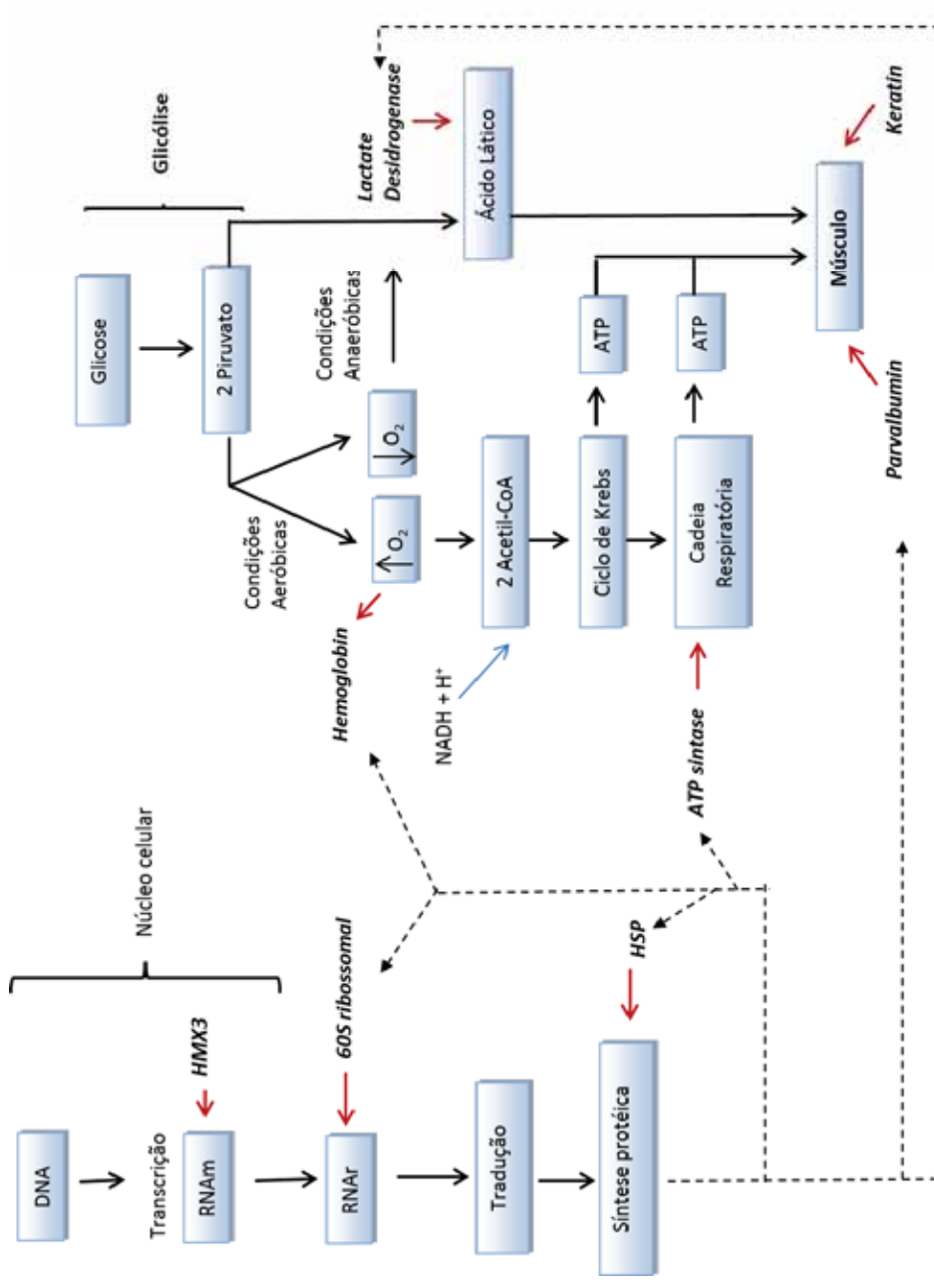


Figura 24. Correlação metabólica das principais proteínas diferencialmente expressas, englobando processos de síntese proteica e vias de obtenção de energia.

4. Conclusão

A avaliação dos histogramas permitiu verificar a homogeneidade quanto a distribuição dos spots nos géis em diferentes faixas de pI e MM, o que juntamente com a correlação dos %V dos spots permitiram verificar a similaridade entre os grupos de mesma fonte e entre as fontes de mesmo grupo.

Através das ferramentas da proteômica foi possível identificar proteínas diferencialmente expressas, favorecendo o estudo comparativo e sua compreensão entre os grupos e as fontes de zinco, contribuindo para as áreas de nutrição e fisiologia dos animais e finalmente a caracterização das mesmas, favorecendo a exploração de suas funções nas devidas rotas metabólicas.

Podendo-se portanto, identificar e inferir algumas das proteínas como possíveis biomarcadores.

5. Referências

1. APINES, M.J.SATOH, S.; KIRON, V. Bioavailability of amino acids chelated and glass embedded zinc to rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, fingerlings. **Aquaculture Nutrition**, v.7, p.221-228, 2001.
2. BARROS, M.M., PEZZATO, L.E., MIRANDA, E.C. SÁ, M.V.C., SAMPAIO, F.G.. Complexo zinco aminoácido em dietas práticas para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Animal Scientiarum Animal Sciences**, v. 26, n. 4, p. 437-441, 2004.
3. BACHÈRE, E.; GUEGUEN, Y.; GONZALEZ, M.; DE LORGERIL, J.; ROMESTAND, B. Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. **Immunol. Rev.** 198, p.149-168, 2004
4. CERENIUS, L.; LIANG, Z.; DUVIC, B.; KEYSER, P.; HELLMAN, U.; PALVA, E. T.; IWANAGA, S.; SODERHALL, K. Structure and biological activity of a 1,3-b-D-glucan-binding protein in crustacean blood. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 29462–29467, 1994.
5. SOMBOONWIWAT, K.; CHAIKEERATISAK, V.; WANG, H.; LO, C. F.; TASSANAKAJON, A. Proteomic analysis of differentially expressed proteins in *Penaeus monodon* hemocytes after *Vibrio harvey* infection. **Proteome Science**, v. 8, p. 1-11, 2010.
6. GONÇALVES, G. S. et al. Energia e nutrientes digestíveis de alimentos para a tilápia do Nilo. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 35, n. 2, p. 201-213, 2009.
7. GUIMARÃES, I. G.; PEZZATO, L. E.; BARROS, M. M. Amino acid availability and protein digestibility of several protein sources for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture Nutrition**, Bethesda, v. 14, n. 1, p. 396-405, 2008.
8. PEZZATO, L. E. et al. Digestibilidade aparente de ingredientes pela tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 31, n. 4, p. 1595-1604, 2002.

9. NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient requirements of fish and shrimp.** Washington, D.C.: National Academies Press, 2011. 376 p.
10. SCHMALE, M.C. Aquatic animal models of human disease. **Comp BiochemPhysiol C PharmacolToxicolEndocrinol**, v.138, p.229–31, 2004.
11. AMATRUDA, J. F., PATTON, E., **Genetic Models of Cancer in Zebrafish**, In: JEON, K. W., (Ed.), International Review of Cell and Molecular Biology, Academic Press, San Diego, CA 2008, pp. 1–34.
12. SYKES, E.; GRZYCH, C.; EPSTEIN, E.; KIECHLE, F. L. **Dextran interference in biuret-based assays for serum proteins.** *Clin. Chem.*, v.33, p.1073, 1987.
13. LIU, X., AFONSO, L., ALTMAN, E., JOHNSON, S. et al., O-acetylation of sialic acids in N-glycans of Atlantic salmon (*Salmosalar*) serum is altered by handling stress. **Proteomics**, v.8, p.2849–2857, 2008.
14. ANDRADE A. **Sequenciamento, identificação e análise das proteínas do caule de mudas de Eucalyptus grandis.** PAULO, U. D. S. 2006.
15. WULFF, T., HOFFMANN, E. S., ROEPSTORFF, P., JESSEN, F., Comparison of two anoxia models in rainbow trout cells by a 2-DE and MS/MS-based proteome approach. **Proteomics**, v.8, p.2035–2044, 2008.
16. BOOTH, N. J., BILODEAU-BOURGEOIS, L., Proteomic analysis of head kidney tissue from high and low susceptibility families of channel catfish following challenge with *Edwardsiella ictaluri*. **Fish Shellfish Immunol.**, v.26, p.193–196, 2009.
17. RIME, H., GUITTON, N., PINEAU, C., BONNET, E. et al., Postovulatory ageing and egg quality: A proteomic analysis of rainbow trout coelomic fluid. **Repr. Biol. Endocr.**, v.2, p.26, 2004.
18. MARTIN, S. A., VILHELMSSON, O., MEDALE, F., WATT, P. et al., Proteomic sensitivity to dietary manipulations in rainbow trout. **Biochim.Biophys.Acta**, v.165, p.17–29, 2003.
19. MARTIN, S.A.M.; VILHELMSSON, O.; ME'DALE, F.; WATT, P.; KAUSHIK, S.; HOULIHAN, D.F. Proteomic sensitivity to dietary manipulations in rainbow trout. **BiochimBiophysActa**, v.1651, p.17–29, 2003.

20. VILHELMSSON, O.T.; MARTIN, S.A.M.; MEDALE, F. Dietary plant-protein substitution affects hepatic metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **British Journal of Nutrition**, v.92, p.71-80, 2004.
21. OFFER, G.; MOOS, C.; OFFER, R. A New Protein of the Thick Filaments of Vertebrate Skeletal Myofibrils - Extraction, **PuScation and characterization. J. Afol. Biol.**, v.74, p.653-676, 1993.
22. BERBEL, P.; MARCO, P.; CERESO, J. R.; FELIPE, J. Distribution of parvalbumin immunoreactivity in the neocortex of hypothyroid adult rats. **Neuroscience Letters**, v.204, p.65-68, 1996.
23. BALDISSEROTTO, B. **Fisiologia de Peixes Aplicada à Piscicultura**, 2ed. Santa Maria, editora UFSM, 2009.
24. TUSNÁDY, G. E.; SIMON, I. Principles Governing Amino Acid Composition of Integral Membrane Proteins: Application to Topology Prediction. **J. Mol. Biol.**, v.283, p.489-506, 1998.
25. NELSON, D. L.; COX, M. M. Lehninger, **Principles of Biochemistry**. 5th ed. New York: W. H. Freeman. 2008.
26. CORTES, M., E. WONG, J. KOIPALLY, AND K. GEORGOPOULOS. Control of development by the Ikaros gene family. **Curr. Opin. Immunol. phocyte**, v.11, p.167-171, 1999.
27. CREVEL G, BATES H, HUIKESHOVEN H, COTTERILL S. The Drosophila Dpit47 protein is a nuclear Hsp90 co-chaperone that interacts with DNA polymerase alpha. **J Cell Sci**, v.114, p.2015-25, 2001.
28. DAHLHOFF, E.P. Biochemical indicators of stress and metabolism: applications for marine ecological studies. **Annual Review of Physiology**, v.66, p.183-207, 2004.
29. HOFMANN, G.E.; BUCKLEY, B.A.; AIRAKSINEN, S.; KEEN, J.E.; SOMERO, G.N. The Antarctic fish *Trematomus bernachii* lacks heat inducible heat shock protein synthesis. **Journal of Experimental Biology**, v.203, p.2331-2339.
30. OHTSUKA, K.; HATA, M. Molecular chaperone function of mammalian Hsp70 and Hsp40 — a review, **International Journal of Hyperthermia**, v.16, p.231–245, 2000.

31. CIAVARRA, R. P.; SIMEONE, A. Tlymphocyte stress response. **Cellular Immunology**, v.129, p.363, 1990.
32. HIGHTOWER, L. E. Heat shock, stress proteins, chaperones and proteotoxicity. **Cell**, v.56, p.191-197, 1991.
33. IWAMA, J.K.; AFONSO, L.O.B.; TODGHAM, A.; ACKERMAN,P.; NAKANO, K. Are hps suitable for indicating stressed states in fish? **Journal of Experimental Biology**, v.207, p.15- 19, 2004.
34. ACKERMAN, P. A.; FORSYTH, R. B.; MAZUR, C. F.; IWAMA, G. K. Stress hormones and the cellular stress response in salmonids. **Fish Physiology and Biochemistry**, v.23, p.327-336, 2000.
35. EFREMOVA, S.M.; MARGULIS, B.A.; GUZHOVA, I.V.; ITSKOVICH, V.B.; LAUENROTH, S.; MULLER, W.E.G.; SCHRODER, H.C. Heat shock protein hsp70 expression and DNA damage in baikalian sponges exposed to model pollutants and wastewater from baikalsk pulp and paper plant. **Aquatic Toxicology**, v.57, p.267–280, 2002.
36. CARA, J.B.; ALURU, N.; MOYANO, F.J.; VIJAYAN, M.M. Food-deprivation induces Hsp70 and HSP90 protein expression in fry gilthead sea bream and rainbow trout. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v.142, p.426–431, 2005.
37. WANG, Y.; XU, J.; SHENG, L.; ZHENG, Y. Field and laboratory investigations of the thermal influence on tissue-specific Hsp70 levels in common carp (*Cyprinus carpio*), **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, v.148, n.4, p.821-827, 2007.
38. JONSSON, H.; SCHIEDEK, D.; GOKSOYR, A. Expression of cytoskeletal proteins, cross- reacting with anti-CYP1A, in *Mytilus* sp. exposed to organic contaminants. **Aquatic Toxicology**, v.78S, p.42–48, 2006.
39. TOMANEK, L. The importance of physiological limits in determining biogeographical range shifts due to global climate change: the heat shock response. **Physiological and Biochemical Zoology**, v.81, p.709–717, 2008.
40. HEREDIA-MIDDLETON, P.; BRUNELLI, J.; DREW, R. E.; THORGAARD, G. H. Heat shock protein (HSP70) RNA expression differs among rainbow trout

(*Oncorhynchus mykiss*) clonal lines. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**, v.149, p.552-556, 2008.

41. FINLEY, D., BARTEL, B. & VARSHAVSKY, A. The tails of ubiquitin precursors are ribosomal proteins whose fusion to ubiquitin facilitates ribosome biogenesis. **Nature**, v.338, p.394-401, 1989.

42. CHEVALIER, C.; QUERREC, F. L.; CHEVALIER, P. R. C.; QUERREC, F. L.; RAYMON, P. Sugar levels regulate encoding protein S28 the expression of ribosomal protein genes and ubiquitin-fused protein S27a in maize primary root tips. **Plant Science**, v.117, p.95-105, 1996.

43. KNOWLES JR. Enzyme catalysis: not different, just better. **Nature**, v.350, p.121-124, 1991.

44. MEYERHOF O, BECK LV. Triosephosphate isomerase. **J BiolChem**, v.156, p.109-120, 1994.

45. LOLIS E , ALBER T , DAVENPORT RC, ROSE D, HARTMAN FC, PETSKO G.A. Structure of Biochemistry yeast triosephosphate isomerase at 1.9 - A resolution. v.29, p. 6609-6618, 1990.

46. SCHLIEBS W, THANKI N, ERITJA R, WIERENGA R. Active site properties of monomeric triosephosphate isomerase (monoTIM) as deduced from mutational and structural. **Protein Sciencstudies**, v.5, p.229-239, 1996.

47. KURSULA I, PARTANEN S, LAMBEIR AM, WIERENGA RK. The importance of the conserved Arg-191-Asp227 salt bridge of triosephosphate isomerase for folding, **FEBS Lettstability**, and catalysis. v.518, p.39-42, 2002.

48. CHAMPE PC., HARVEY, RA. **Bioquímica ilustrada**, 2ª ed. Porto Alegre: Editora Artes Médicas, 1997.

49. Clayton DA. Transcription and replication of mitochondrial DNA. **Humam Reproduction**, 2000, v. 15,n. 2,p .11-17, 2000.

50. MILLER, J.K.; RAMSEY, N.; MADSEN, F.C. Elementos vestigiales. In: CHURCH, D.C. **Fisiologia digestive y nutrition de los ruminantes**, 1993. p.391-457.

51. MURRAY, R. K.; GRANNER, D. K.; MAYES, P. A.; RODWELL, V. W. Harper's **Illustrated Biochemistry**. 27th ed. New York: McGraw-Hill Medical, 2006.
52. BONE, Q.; MARSHALL, N.B; BLAXTER, J.H.S. **Biology of Fishes**, 2ed. Chapman & Hall, 1995.
53. WEISS B, STOFFEL, W. "Human and murine serine-palmitoyl-CoA transferase--cloning, expression and characterization of the key enzyme in sphingolipid synthesis". **Eur. J. Biochem.** v. 249, n. 1,p. 239–47, 1997.
54. HANADA, K. Serine palmitoyltransferase, a key enzyme of sphingolipid metabolism. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1632, p. 16-30, 2003.

IMPLICAÇÕES

A metalômica é um novo campo de investigação que integra estudos de espécies metálicas com estudos de macromoléculas, mais especificamente de proteínas. Dessa forma, faz-se necessário o desenvolvimento de métodos analíticos que possam permitir a investigação segura das metaloproteínas, principalmente em relação aos macros e microminerais que são fundamentais para que essas biomoléculas produzam atividades biológicas.

Através de suas ferramentas os estudos podem contribuir cada vez mais, à medida que se adquire maiores conhecimentos, onde pode-se dizer que este trabalho contribuiu para o “start” nessa área de proteômica em peixes, principalmente no que diz respeito a tilápia do Nilo. Espécie esta que tem recebido considerável destaque de produção, tornando cada vez maior a necessidade de serem exploradas. Contudo mais estudos devem ser realizados a fim de contribuir na elucidação mais detalhada dessa espécie.

ANEXO

**PROTEÍNAS CARACTERIZADAS POR ESI MS/MS NOS SPOTS PROTEICOS,
ONDE O ZINCO FOI IDENTIFICADO E QUANTIFICADO**

Tabela 1. Proteínas identificadas por espectrometria de massa, a partir da identificação de zinco por GFAAS

Spot	Proteína	Acesso	Score	pI/MM experimental	MM massas	MM teórica	Cobertura (%)	Peptídeos Sequenciados
1	Parvalbumin beta	P02618	281.426	3.86/ 11817.2	12109.9331	11.436	32.41	AFAIIDQDK AFAGVLNDADIAAALEACK SADDVKK
1B	60S ribosomal protein L34	Q7ZWJ7	138.0635	4.22/ 8269.4	14474.2055	13.369	11.11	AFLIEEQK TPGNR
3	Não identificado							
6C	Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a	P68200	1659.622	7.33/ 11484.6	19764.3451	17.999	11.54	ESTLHLVLR EGIPDQQR ESTLHLVLR ESTLHLVLR ESTLHLVLR ESTLHLVLR
9A	Hemoglobin subunit alpha-B	Q9PVM3	168.7009	5.28/ 16561	16549.7568	15.948	5.56	VALALAER VALALAER
10	Adenylate kinase isoenzyme 1	P12115	2917.746	5.7/ 22306.5	22550.0651	21.489	29.9	GYLIDGYPR YGYTHLSSGDLR QLQAIMQK ADVSK AEVAGSER GELVPLDTVLDMIK GYLIDGYPR
11	Adenylate kinase isoenzyme 1	P12115	271.9184	6.29/ 21645.06	22550.0651	21.489	14.95	YGYTHLSSGDLR GYLIDGYPR AETMVQR
11A	Adenylate kinase isoenzyme 1	P12115	5180.128	6.48/ 22035.6	22550.0651	21.489	29.38	YGYTHLSSGDLR GYLIDGYPR GELVPLDTVLDMIK QLQAIMQK AEVAGSER IVEKYGYTHLSSGDLR
12	Coiled-coil domain-containing protein 153	A8KB59	284.3496	7.08/ 24313	24469.59	23.135	32.18	GIGGSKK DMLREFGINPLHM WEEQSTVIHQDVK DITADLNRQYK RSVLDVSVLK EHLALRSQVAR
12A	Triosephosphate isomerase	Q589R5	516.0374	6.9/ 25033.2	28160.8114	27.113	29.03	GAFTGEISPAMIK HVFGENDELIGQK VAHALESDSLVIACIGEK VVLAYEPVWAIGTGK VVLAYEPVWAIGTKATPEAQAEVHEK
13	Creatine kinase, testis isozyme	P24722	165.1275	8.48/ 28006	44955.554	43.004	10.7	GGDDLDPNYVISSR MSVEALDLSLGGDLK TFLVWVNEEDHLR
13A	Homeobox protein HMX3-B	Q90XN9	95.0896	8.26/ 27732	33624.6249	32.606	2.76	LGDLSLPR QLAAELEAANMSHAAAQR LGDLSLPR LGDLSLPR LGDLSLPR

15	Guanydinacetate N-methyltransferase	Q71N41	295.5476	5.71/ 26399.4	28019.8889	26.743	26.92	WETPYMHSLATVAASK VLEIGFGMAIAATK MFQETQVPHLEAGFK EKISTTLMIDISPPECK
17	L-lactate dehydrogenase A chain	O93543	188.3847	5.34/ 33539	37578.195	36.043	21.45	VLGSGTINLDSAR AIHKEVVVDGAYEVIK VVVVTAGAR GEVMDLQHGSFLKTK NMHKVHPVSTLVQGMHGKVK
18	Tropomyosin alpha-I chain	P84335	941.5957	4.32/ 35793.06	34521.9563	32.730	34.15	LVIEGDLER IQLVEEELDR AEFAER ATDAEGDVASLNRR QLEDDLV ALQK HIAEEADR ENALDR IQLVEEELDRAQER AISEELDHALNDMTSI MELQEIQLKEAK
20	Hemoglobin subunit alpha-B	Q9PVM3	119.746	3.09/ 44698.6	16549.7568	15.948	5.56	VALALAER
21	Actin. alpha skeletal muscle	P68264	2456.748	5.18/ 44015	43452.313	41.945	36.34	GYSFVTTAER AVFPSIVGRPR AGFAGDDAPR QEYDEAGPSIVHR IIAPPER LDLAGR ILTER EITALAPSTMK SYELPDGQVITIGNER GYSFVTTAEREIVRDIK DLTDYLMK KDLYANNVLSGGTTMYPGIADR HOGVMVGMGQK IIAPPER ILTER IIAPPER AGFAGDDAPR AGFAGDDAPR GYSFVTTAER IIAPPER GYSFVTTAER
22	Ice-structuring protein AB2	P12101	308.5654	5.6/ 54759	7173.317	7.001	14.29	GIPAEIIPR
23	ATP synthase subunit beta. mitochondrial	Q9PTY0	10180.07	4.85/ 57379.8	56423.6529	61.39	61.39	LVLEVAQHLGENTVR FTQAGSEVSALLGR VALTGLTVAEYFR AHGGYSVFAGVGER IPVGPETLGR VLDTGAPIR VALVYGQMNPPGAR TIAMDGTGLVLR IMNVIGEPIER GSITSVQAIYVPADDLTDPAPATTF AHLDAITTVLSR IMDPNIVGSEHYDVAR TVLIMELINNVAK EGNDLYHEMIESGVINLK TREGNDLYHEMIESGVINLK IPSAVGYQPTLATDMGMTQER DQEGQDVLFLFDNIFR LTVAR AIAELGIYPVAVDPLDSTSE QTAPIHAEAPEFTDMSVEQEILVTGIK LAEEHS VLDTGAPIRIPVGPETLGR IMNVIGEPIERGPITTK SLQDIILGMDLSEEDKLTVAR DQEGQDVLFLFDNIFRFTQAGSEVSALLGR TIAMDGTGLVRL VALVYGQMNPPGAR IMNVIGEPIEI IPSAVGYQPTLATDMGMTQER IMPDNIVGSEHYDVAR

24A	Keratin, type I cytoskeletal 18	O57607	71.4868	3.9/ 62125.5	50055.2469	48.779	10.96	IMNVIGEPIDERGPITTK AHGGYSYFAGVGER MNLESEIEALKKEELFLK VVSSSTETKER LAADDFR VMTVTQTLVDGK
25	Triosephosphate isomerase B	Q90XG0	252.6277	5.64/ 59046	28391.9705	26.828	16.53	TNVSEAVANSVR ELASQKDLDFLVGGASLKPFEIDIINAK
26	Não identificado							
26A	Hemopexin	Q6PHG2	1645.737	5.8/ 92363.5	53926.3565	51.027	11.41	VHLDATISDDAGNIYAFR GHFHLSTIGDK HELHHGAQLDR GDHLFKGFHGK
27	Heat shock cognate 71 kDa protein	Q9W6Y1	1692.162	5.31/ 81277	79626.36	76.169	19.1	TTPSYVAFTDTER VEIANDQGNR FEELNADLFR TVNNAVITVPAYFNDQR NQVAMNPTNIVFDAGR STAGDTHLGGEDFDR LNQFFITIT GQIHDIVLVGGSTF MVNHFIAEFKR MVNHFIAEFK NQVAMNPTNIVFDAK ARFEELNADLFR VQVEYKGETK ARFEELNADLFR
28	Heat shock protein HSP 90-alpha 1	Q90474	2279.747	5.04/ 92578	87564.4412	83.319	14.07	GVVDSIDLNISR DQVANSFVFR ALLFVPR HFSVEGQLEFR LGHEDSQNR EIFLR YYTSASGDEMVSLLKDYVSR YYTSASGDEMVSLLK DYVSR HSQFIGYPITLYIEK
29	Creatine kinase, testis isozyme	P24722	3503.111	2.99/ 44818	44955.554	43.004	14.1	GGDDLDPNYVISSR TFLVWVNEEDHLR DWPDGR IETLFK VISMOK FCTGLTK GGDDLDPNYVISSRVR VISMOK
30	Hemoglobin subunit alpha-B	Q9PVM3	259.9112	3.04/ 56179	16549.7568	15.948	15.28	VALALAER MLVAYPQTK SLSAK
31	Alpha-endosulfine	Q1L8X2	43.8794	3.05/ 70637.2	14831.8836	13.756	13.71	YPSLGHKPGGSDFLMKR
32	Não identificada							
33	Não identificado							
39	Hemoglobin subunit alpha-B	Q9PVM3	255.7209	8.9/ 26860	16549.7568	15.948	15.28	VALALAER HGAIIMGIGKAVK

40	Serine palmitoyltransferase small subunit A	B9EN89	147.9368	7.48/ 23972	8252.7758	8.167	54.41	AIFNSILSVAGMAVYVTGYVFMPQHMAILQYFEMVQ
40A	Parvalbumin beta 2	P86432	396.0676	7.33/ 23664.5	10245.9178	11.345	19.63	LFLQNFASAR SGFLEEDELKFLQNFASAR
41	Nucleoside diphosphate kinase B	P85291	973.1249	5.23/ 62690	14936.6794	14.118	30.16	TFIAIKPDGVQR MMLGETNPADSKPGSIR GDFCINIGR