

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese/dissertação será disponibilizado somente a partir de
28/03/2025

At the author's request, the full text of this thesis/dissertation will not be available online until
March 28, 2025

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CÂMPUS DE BOTUCATU

ESTUDO METALOPROTEÔMICO DO TECIDO HEPÁTICO E PLASMA DE
FRANGOS DE CORTE SUPLEMENTADOS COM COBRE E MANGANÊS

RENATA APARECIDA MARTINS

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

BOTUCATU - SP
Março – 2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CÂMPUS DE BOTUCATU

ESTUDO METALOPROTEÔMICO DO TECIDO HEPÁTICO E PLASMA DE
FRANGOS DE CORTE SUPLEMENTADOS COM COBRE E MANGANÊS

RENATA APARECIDA MARTINS
ZOOTECNISTA

Orientador: Prof. Dr. Pedro De Magalhães Padilha

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

BOTUCATU - SP
Março – 2023

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA ANDRADE CRUZ E SANTOS-CRB

Martins, Renata Aparecida.

Estudo metaloproteômico do tecido hepático e plasma de frangos de corte suplementados com cobre e manganês / Renata Aparecida Martins. - Botucatu, 2023

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Pedro de Magalhães Padilha
Capes: 50403001

1. Eletroforese em Gel Bidimensional. 2. Frango de corte. 3. Minerais na nutrição animal. 4. Sulfatos. 5. Nutrição animal.

Palavras-chave: 2D-PAGE; Frangos de corte; Hidroxicloretos; Sulfatos; Suplementação mineral .

BIOGRAFIA DA AUTORA

Renata Aparecida Martins, filha de Celia Aparecida Momesso Martins e João Aparecido Martins, nasceu em 06 de agosto de 1993 na cidade de Cuiabá - MT. Em março de 2011, ingressou no curso de Zootecnia da Universidade Federal de Mato Grosso – Câmpus Cuiabá e graduou-se em outubro de 2016. Durante a graduação foi bolsista de iniciação tecnológica – PIBITI (2015) e voluntariada de iniciação científica – VIC (2016). Em março de 2017 iniciou o curso de Mestrado pelo Programa de Pós-graduação em Zootecnia da Universidade Federal da Grande Dourados, sendo bolsista pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), concluindo o curso em fevereiro de 2019. Em agosto de 2019 iniciou o curso de Doutorado em Zootecnia pelo Programa de Pós-graduação em Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “*Júlio de Mesquita Filho*” - Câmpus de Botucatu, onde inicialmente foi bolsista pela CAPES, e no ano de 2021 foi contemplada com a bolsa da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo nº 2019/13516-1.

Dedico esse trabalho aos meus pais, Celia e João, pelo exemplo de força, trabalho e dedicação. Todo o amor e apoio de vocês foram fundamentais para essa conquista. Amo vocês mais do que consigo expressar em palavras.

Obrigada por tudo!

Agradecimento especial

Ao meu amor, amigo e companheiro de vida, Andrey. Você esteve ao meu lado durante toda a minha trajetória acadêmica e tornou mais leve e bonito o caminho que percorremos até aqui. Obrigada pelo amor, apoio, incentivo e ajuda em todos os momentos. Te amo!

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

À CAPES pela concessão de bolsa de doutorado no período de agosto de 2019 a março de 2021.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro concedido por meio de bolsa de doutorado no período de abril de 2021 a março de 2023 (Processo n° 2019/13516-1, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)).

À Universidade Estadual Paulista (UNESP) e ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) pela oportunidade de realização deste curso.

Ao meu orientador, professor Dr. Pedro de Magalhães Padilha, pela oportunidade, atenção, apoio, ensinamentos e por confiar no meu trabalho.

Ao professor Dr. José Roberto Sartori, pelos conhecimentos transmitidos, contribuições e colaboração na condução desse trabalho.

À Dr^a. Priscila Michelin Groff Urayama e ao professor Dr. José Roberto Sartori por conceder as amostras para as análises.

Ao Dr. José Cavalcante Souza Vieira, pela amizade, parceria, momentos divertidos, instruções técnicas e ajuda imensa durante as análises. Estendo a minha gratidão à Dr^a. Grasieli de Oliveira, pela amizade, momentos de descontração, palavras de incentivo e motivação.

À minha mãe, Celia Aparecida Momesso Martins, e ao meu pai, João Aparecido Martins. Pelo amor e apoio incondicional, educação, incentivo e compreensão pela minha ausência ao longo dessa jornada. Essa conquista é de vocês. Amo muito vocês!

Ao meu namorado e melhor amigo, Andrey Sávio de Almeida Assunção. Por todo amor, carinho, companheirismo, incentivo, apoio e cumplicidade. Obrigada por fazer parte da minha vida. Te amo hoje e sempre!

Aos meus irmãos, Elçon Aparecido Martins, Edelson Aparecido Martins e Tiago Aparecido Martins, pelo incentivo e apoio.

Aos meus sobrinhos Kauany da Silva Martins, Erik Matos Martins, Letícia Matos Martins e João Pedro de Almeida Neponuceno, por tornar minha vida mais alegre e divertida.

À minha sogra, Silnéia Gonçalina de Almeida, e ao José Lino Simão, por todo carinho e apoio.

As minhas cunhadas, Andressa Aparecida de Almeida Assunção, Andrielly Aparecida de Almeida Assunção, Claudimara Ferreira Matos, e Gislaine Ferreira Matos, pelo apoio.

Aos membros do Laboratório de Bioanalítica e Metaloproteômica (LBM), Andrey Sávio de Almeida Assunção, José Cavalcante Sousa Vieira, Leone Campos Rocha, Maria Gabriela de Albuquerque Santiago, Otávio Augusto de Freitas Apostólico e Wellington Luiz de Paula Araújo, pelo convívio e ajuda durante as análises.

À Dr^a. Lucilene Delazari dos Santos, pelo exemplo de profissional, ajuda, orientações técnicas e ensinamentos.

A todos os professores que durante a minha jornada acadêmica contribuíram direta ou indiretamente para meu crescimento profissional e pessoal.

Muito Obrigada!

“Os problemas significativos com os quais nos deparamos não podem ser resolvidos no mesmo nível de pensamento em que estávamos quando eles foram criados.”

Albert Einstein

RESUMO GERAL

O cobre e o manganês são essenciais para o metabolismo normal de todos os animais. A ausência desses minerais nas dietas de frangos de corte prejudica vários processos bioquímicos e fisiológicos afetando substancialmente a saúde das aves. Portanto, a suplementação dietética de microminerais é fundamental para manter a produtividade na avicultura. Contudo, nem todas as fontes de suplementação disponíveis no mercado apresentam características adequadas que favoreçam a absorção de minerais. Este fato impulsiona a realização de numerosos estudos para avaliar quais fontes apresentam maior biodisponibilidade mineral. Porém, até o momento nenhum estudo avaliou os efeitos de diferentes fontes e níveis de cobre e manganês sobre a regulação de proteínas. Dessa forma, a presente tese foi dividida em dois capítulos principais (Artigo 1 e 2) correspondendo aos estudos proteômicos no tecido hepático e plasma de frangos corte.

Artigo 1 – O objetivo com o estudo foi avaliar o proteoma hepático de frangos de corte suplementados com duas fontes (sulfato e hidroxiclreto) e dois níveis de cobre (15 e 150 mg kg⁻¹) e manganês (80 e 120 mg kg⁻¹) utilizando ferramentas metaloproteômicas. Foram considerados quatro tratamentos: S15-80 (15 mg kg⁻¹ de CuSO₄ e 80 mg kg⁻¹ de MnSO₄); S150-120 (150 mg kg⁻¹ de CuSO₄ e 120 mg kg⁻¹ de MnSO₄); H15-80 (15 mg kg⁻¹ de Cu(OH)Cl e 80 mg kg⁻¹ de Mn(OH)Cl); e H150-120 (150 mg kg⁻¹ de Cu(OH)Cl e 120 mg kg⁻¹ de Mn(OH)Cl). Para o estudo foram feitos quatro *pools* a partir de amostras de fígado de 10 aves/tratamento. As proteínas foram fracionadas utilizando eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D-PAGE) e a análise de expressão dos *spots* proteicos foi realizada por meio do *software ImageMaster Platinum v.7.0*. Os *spots* diferencialmente expressos foram excisados dos géis e digeridos para mapeamento do Cu e Mn por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS). A quantificação dos minerais nas amostras de fígado e *pellets* proteicos foi realizada por espectrometria de absorção atômica em chama (FAAS). A identificação das proteínas dos *spots* associados ao Cu e Mn foi realizada por espectrometria de massas em sequência acoplada com cromatografia líquida (LC-MS/MS). 19 *spots* foram associados ao Cu, 10 *spots* ao Mn, e 5 *spots* ao Cu e Mn concomitante. As concentrações de Cu e Mn no fígado, *pellets* e *spots* proteicos sugerem maior biodisponibilidade das fontes hidroxiclretos em relação aos sulfatos. A análise proteômica demonstrou indução das proteínas de choque térmico (*HSPs*) e das glutationas-s-transferases (*GSTs*) em frangos de corte suplementados com níveis mais altos de Cu e Mn, sugerindo o envolvimento dessas proteínas na tolerância e estresse por metais. **Artigo 2** - O objetivo foi avaliar os efeitos

da suplementação de duas fontes (sulfatos e hidroxiclreto) e dois níveis de Cu (15 e 150 mg kg⁻¹) e manganês (80 e 120 mg kg⁻¹) sobre o proteoma plasmático de frangos de corte. Foram avaliados quatro grupos experimentais: S15-80; S150-120; H15-80; e H150-120. A partir de amostras de plasma obtida de cada ave do mesmo tratamento foram feitos quatro *pools* considerando 10 aves por grupo. O fracionamento do proteoma plasmático foi realizado por *2D-PAGE*. A análise de expressão dos *spots* proteicos foi realizada utilizando o *software ImageMaster Platinum v.7.0*. Os *spots* diferencialmente expressos foram extraídos dos géis para identificação das proteínas por *LC-MS/MS*. As determinações de Cu e Mn nas amostras e *pellets* proteicos de plasma foi realizada por *FAAS*. Os grupos S150-120 e H150-120 apresentaram maiores concentrações de Cu e Mn nas amostras e *pellets* proteicos quando comparados aos grupos S15-80 e H15-80 ($P < 0.05$). O grupo H15-80 apresentou maior concentração de ambos os minerais quando comparado ao grupo S15-80, sugerindo maior biodisponibilidade da fonte hidroxiclreto. Foram caracterizados 31 *spots* proteicos diferencialmente expressos entre os grupos, demonstrando que a suplementação de níveis elevados de Cu e Mn promovem mudanças no nível de expressão de proteínas envolvidas principalmente nas vias da homeostase.

Palavras-chave: *2D-PAGE*, frangos de corte, *GFAAS*, hidroxiclretos, sulfatos, suplementação mineral

ABSTRACT

Copper and manganese are essential for the normal metabolism of all animals. The absence of these minerals in broiler diets impairs several biochemical and physiological processes, substantially affecting the health of the birds. Therefore, dietary supplementation of microminerals is essential to maintain productivity in poultry. However, not all sources of supplementation available on the market have adequate characteristics that favor mineral absorption. This fact drives numerous studies to assess which sources have greater mineral bioavailability. However, to date, no study has evaluated the effects of different sources and levels of copper and manganese on protein regulation. Thus, this thesis was divided into two main chapters (Paper 1 and 2) corresponding to proteomic studies in liver tissue and plasma of broiler chickens. **Paper 1** – The objective of the study was to evaluate the hepatic proteome of broilers supplemented with two sources (sulfate and hydroxychloride) and two levels of copper (15 and 150 mg kg⁻¹) and manganese (80 and 120 mg kg⁻¹) using metalloproteomic strategies. Four treatments were considered: S15-80 (15 mg kg⁻¹ of CuSO₄ and 80 mg kg⁻¹ of MnSO₄); S150-120 (150 mg kg⁻¹ CuSO₄ and 120 mg kg⁻¹ MnSO₄); H15-80 (15 mg kg⁻¹ Cu(OH)Cl and 80 mg kg⁻¹ Mn(OH)Cl); and H150-120 (150 mg kg⁻¹ of Cu(OH)Cl and 120 mg kg⁻¹ of Mn(OH)Cl). For the study, four pools were made from liver samples of 10 broilers/treatment. Proteins were fractionated using two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE) and expression analysis was performed using ImageMaster Platinum v.7.0 software. The differentially expressed spots were excised from the gels and subjected to acid digestion for Cu and Mn mapping by graphite furnace atomic absorption spectrometry (GFAAS). Quantification of minerals in liver samples and protein pellets was performed by flame atomic absorption spectrometry (FAAS). The identification of spot proteins associated with Cu and Mn was performed by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). 19 spots were associated with Cu, 10 spots with Mn, and 5 spots with Cu and Mn concomitantly. Cu and Mn concentrations in liver, protein pellets and spots suggest greater bioavailability of hydroxychloride sources compared to sulfates. Proteomic analysis demonstrated induction of heat shock proteins (HSPs) and glutathione-s-transferases (GSTs) in broiler chickens supplemented with higher levels of Cu and Mn, suggesting the involvement of these proteins in metal tolerance and stress. **Paper 2** - The objective was to evaluate the effects of supplementation from two sources (sulfates and hydroxychloride) and two levels of Cu (15 and 150 mg kg⁻¹) and manganese (80 and 120 mg kg⁻¹) on the plasma

proteome of broilers. Four experimental groups were evaluated: S15-80; S150-120; H15-80; and H150-120. From plasma samples obtained from each bird of the same treatment, four pools were made considering 10 broilers per group. Plasma proteome fractionation was performed by 2D-PAGE. Expression analysis of protein spots was performed using ImageMaster Platinum v.7.0 software. The differentially expressed spots were extracted from the gels for protein identification by LC-MS/MS. Cu and Mn determinations in plasma protein samples and pellets were performed by FAAS. Groups S150-120 and H150-120 showed higher concentrations of Cu and Mn in protein samples and pellets when compared to groups S15-80 and H15-80 ($P < 0.05$). The H15-80 group had a higher concentration of both minerals when compared to the S15-80 group, suggesting greater bioavailability of the hydroxychloride source. Thirty-one protein spots differentially expressed between groups were characterized, demonstrating that supplementation with high levels of Cu and Mn promote changes in the expression level of proteins mainly involved in homeostasis pathways.

Keywords: 2D-PAGE, broilers, GFAAS, hydroxychlorides, mineral supplementation, sulfates

LISTA DE ABREVIATURAS

2D-PAGE – Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida

ATP - Adenosina trifosfato

ANOVA – Análise de variância

BSA – Albumina de soro bovino

CEUA - Comitê de Ética no Uso de Animais

Cu – Cobre

Cu(OH)Cl – Hidroxicloreto de cobre

CuSO₄ – Sulfato de cobre

CuZn-SOD – CobreZinco-superóxido dismutase

Da - Dalton

DTT – Ditioneitol

EROS – Espécies reativas de oxigênio

FAAS - Espectrometria de absorção atômica em chama (*Flame Atomic Absorption Spectrometry*)

FDR – Taxa de descoberta falsa (*False Discovery Rate*)

GFAAS - Espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (*Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry*)

GO – *Gene Ontology*

GSTs – Glutathionas-s-transferases

HSPs – Proteínas de choque térmico (*Heat Shock Protein*)

IEF – Focalização isoeétrica (*Isoelectric focusing*)

KDa - Quilodalton

KEGG - Enciclopédia de Genes e Genomas de Kyoto (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*)

LC-MS/MS - Espectrometria de massas em sequência acoplada com cromatografia líquida (*Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry*)

Mn – Manganês

Mn(OH)Cl – Hidroxicloreto de manganês

MnSO₄ – Sulfato de manganês

Mn-SOD – Manganês-superóxido dismutase

MM – Massa Molecular

pH - Potencial Hidrogeniônico

pI – Ponto isoelétrico

SDS - *Sodium Dodecyl Sulfate*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 1

- Figura 1 - Representação esquemática da eletroforese bidimensional. Adaptado de Nelson e Cox (2019)..... 29
- Figura 2 - Representação esquemática da proteômica livre de gel (*shotgun*). Fonte: Passaglia e Zaha (2014)..... 31

CAPÍTULO 2

- Figura 1.** Representação dos géis de poliacrilamida obtidos por *2D-PAGE* do *pool* de amostras do tecido hepático de frangos de corte dos grupos S150-120 (150 mg kg⁻¹ de sulfato de Cu e 120 mg kg⁻¹ de sulfato de Mn) e H150-120 (150 mg kg⁻¹ de hidroxicloreto de Cu e 120 mg kg⁻¹ de hidroxicloreto de Mn)..... 47
- Figura 2.** Rede de interação proteína-proteína das proteínas identificadas nos *spots* proteicos associados ao cobre e manganês (*2D-PAGE/GFAAS*), utilizando o banco de dados online *String* 57
- Figura S1.** Representação dos géis de poliacrilamida obtidos por *2D-PAGE* do *pool* de amostras do tecido hepático de frangos de corte suplementados com diferentes fontes e níveis de Cu e Mn..... 70
- Figura S2.** Anotação funcional das proteínas identificadas nos *spots* proteicos associados ao cobre e manganês (*2D-PAGE/GFAAS*) utilizando o *software* Blast2GO 71

CAPÍTULO 3

- Figura 1.** Representação dos géis de poliacrilamida obtidos por *2D-PAGE* do *pool* de amostras de plasma de frangos de corte suplementados com diferentes fontes e níveis de Cu e Mn 79
- Figura 2.** Rede de interação proteína-proteína das proteínas identificadas nos *spots* proteicos diferencialmente expressos nos géis de poliacrilamida das amostras de plasma de frangos de corte suplementados com diferentes níveis e fontes de cobre e manganês.....86

Figura 3. Visão hierárquica da análise da via das proteínas identificadas nos *spots* diferencialmente expressos, destacando-se a vias da homeostase, organização da matriz extracelular e sistema imune inato. A análise da via foi realizada usando a ferramenta do banco de dados *Reactome*..... 87

Figura S1. Análise de ontologia genética do proteoma plasmático de frangos de corte suplementados com diferentes níveis e fontes de cobre e manganês 96

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Determinações de cobre e manganês nas amostras e <i>pellets</i> de tecido hepático de frangos de corte suplementados com diferentes fontes e níveis de cobre e manganês.....	46
Tabela 2. Concentrações de cobre e manganês nos <i>spots</i> proteicos do tecido hepático de frangos de corte dos grupos S150-120 (150 mg kg ⁻¹ de sulfato de Cu e 120 mg kg ⁻¹ de sulfato de Mn) e H150-120 (150 mg kg ⁻¹ de hidroxicloreto de Cu e 120 mg kg ⁻¹ de hidroxicloreto de Mn).....	48
Tabela 3. Expressão dos <i>spots</i> proteicos (teste t, P<0,05) associados ao Cu e Mn do tecido hepático de frangos de corte suplementados com diferentes fontes e níveis de cobre e manganês	49
Tabela 4. Proteínas identificadas por LC-MS/MS nos <i>spots</i> proteicos associados ao Cu e Mn do tecido hepático de frangos de cortes suplementados com duas fontes (sulfato e hidroxicloreto) e dois níveis de Cu (15 e 150 mg kg ⁻¹) e Mn (80 e 120 mg kg ⁻¹).....	51
Tabela 5. Vias <i>KEGG</i> significativamente enriquecidas (FDR<0,05) utilizando o <i>software Cytoscape</i> com o plugin <i>String</i>	59

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Descrição dos grupos experimentais.....	75
Tabela 2. Concentrações de cobre e manganês nas amostras e <i>pellets</i> de plasma de frangos de corte suplementados com diferentes fontes e níveis de cobre e manganês ..	80
Tabela 3. Proteínas caracterizadas nos <i>spots</i> proteicos diferencialmente expressos nos géis de poliacrilamida dos <i>pools</i> de plasma de frangos de corte suplementados com duas fontes (sulfatos (S) e hidroxicloretos (H)) e dois níveis de cobre (15 e 150 mg k ⁻¹) e manganês (80 e 120 mg k ⁻¹)	82
Tabela S1. Vias significativamente enriquecidas (FDR<0.05) utilizando o banco de dados de vias <i>Reactome</i>	97

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	20
CONSIDERAÇÕES INICIAIS	21
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
1.1. Funções do cobre e manganês.....	23
1.2. Biodisponibilidade dos minerais.....	24
1.3. Fontes de suplementação mineral	25
1.4. Proteômica e metaloproteômica.....	27
1.5. Abordagens proteômicas.....	28
2. JUSTIFICATIVA	31
3. OBJETIVOS	32
REFERÊNCIAS	33
CAPÍTULO 2	38
<i>Abordagem metaloproteômica do tecido hepático de frangos de corte suplementados com diferentes fontes e níveis de cobre e manganês</i>	39
RESUMO	39
1. Introdução	40
2. Material e Métodos	41
2.1. Animais, tratamentos e instalações	41
2.2. Coleta das amostras.....	42
2.3. Extração e precipitação das proteínas	42
2.4. Determinação da proteína total	42
2.5. Eletroforese bidimensional (2D-PAGE) e análise dos géis de poliacrilamida	43
2.6. Determinação de cobre e manganês nas amostras de tecido hepático, <i>pellets</i> e <i>spots</i> proteicos.....	44
2.7. Espectrometria de massas	45
2.8. Análise de bioinformática	45
3. Resultados	46
3.1. Concentração de Cu e Mn nas amostras e <i>pellets</i> de tecido hepático.....	46
3.2. Análise de imagem dos géis e mapeamento de Cu e Mn nos <i>spots</i>	47
3.3. Identificação das proteínas, análise funcional, interação proteína-proteína e vias metabólicas	50
4. Discussão	60

4.1.	Concentração de Cu e Mn no tecido hepático e <i>pellet</i> proteico.....	60
4.2.	Mapeamento de Cu e Mn nos <i>spots</i> proteicos	60
4.3.	Alterações na regulação de proteínas em resposta a diferentes fontes e níveis elevados de Cu e Mn.....	63
5.	Conclusão	65
6.	Referências	65
	MATERIAL SUPLEMENTAR	70
	CAPÍTULO 3	72
	<i>Estudo proteômico do plasma de frangos de corte suplementados com diferentes fontes e níveis de cobre e manganês</i>	73
	RESUMO	73
1.	Introdução	74
2.	Material e métodos	75
2.1.	Aves, grupos experimentais e coleta das amostras	75
2.2.	Extração, precipitação e determinação da proteína total	76
2.3.	Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (<i>2D-PAGE</i>) e análise dos géis.....	76
2.4.	Espectrometria de massas	78
2.5.	Análise de bioinformática	78
2.6.	Quantificação de cobre e manganês nos <i>pellets</i> proteicos e amostras de plasma.....	78
3.	Resultados	79
4.	Discussão	87
4.1.	Concentração de Cu e Mn nas amostras de plasma e <i>pellets</i> proteicos	87
4.2.	Regulação das proteínas plasmáticas	88
5.	Conclusão	90
6.	Referências	91
	MATERIAL SUPLEMENTAR	96
	CAPÍTULO 4	99
	IMPLICAÇÕES	100

CAPÍTULO 1

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Os minerais são essenciais para o desenvolvimento normal dos organismos, pois exercem diversas funções importantes no metabolismo, atuando como componentes estruturais de biomoléculas, eletrólitos associados a manutenção da pressão osmótica e equilíbrio ácido-básico, catalisadores em sistemas enzimáticos e endócrinos, reguladores da replicação e diferenciação celular, entre outros processos (SUTLLE, 2010; MACARI; MAIORKA, 2017). Estes nutrientes são classificados de acordo com a exigência dietética. Os minerais que são exigidos em quantidades relativamente grandes ($> 100 \text{ mg kg}^{-1}$) são definidos como macrominerais, enquanto os minerais exigidos em menores quantidades ($< 100 \text{ mg kg}^{-1}$) são denominados de microminerais ou minerais-traços (MCDOWELL, 2003).

Embora os microminerais sejam requeridos em pequenas quantidades, o fornecimento destes, tais como cobre e manganês, é fundamental para manter a saúde e o desempenho dos animais, uma vez que esses micronutrientes desempenham papéis indispensáveis em vários processos fisiológicos e bioquímicos necessários para o crescimento e a vida (MACARI; MAIORKA, 2017). A deficiência de um ou mais microminerais, promove a ocorrência de desequilíbrios metabólicos que favorecem o desenvolvimento de doenças, levando a redução no crescimento, apetite, fertilidade e, conseqüentemente, no desempenho e na produtividade, ressaltando a importância dos microminerais essenciais na manutenção da função metabólica (BRUGGER; WINDISCH, 2015).

Os minerais são elementos químicos inorgânicos, sólidos e cristalinos, que não podem ser decompostos ou sintetizados por reações químicas comuns (MCDOWELL, 2003). Neste sentido, estes nutrientes devem ser obtidos através da alimentação em razão dos organismos vivos não serem capazes de sintetizá-los (MACARI; MAIORKA, 2017). Os principais ingredientes alimentares utilizados nas rações de monogástricos são o milho e o farelo de soja. No entanto, esses alimentos não são suficientes para suprir a quantidade ideal de microminerais que os animais necessitam devido à baixa disponibilidade destes elementos. A oferta de dietas práticas formuladas a base de milho e farelo de soja sem a suplementação mineral, é capaz de promover mudanças fisiológicas consideráveis mesmo em um curto período, demonstrando que o fornecimento de microminerais por meio de suplementos nas dietas é inevitável na produção animal (BRUGGER; WINDISCH, 2015).

Em geral, os microminerais são suplementados nas formas de sais inorgânicos como sulfatos, óxidos e carbonatos (BAO et al., 2007). Entretanto, os sais minerais tendem a dissociar-se no trato gastrointestinal possibilitando a ocorrência de interações negativas com outros nutrientes ou ingredientes da dieta, o que prejudica a absorção e, conseqüentemente, a biodisponibilidade (UNDERWOOD; SUTTLE, 1999). Desta forma, a indústria tem formulado dietas adotando uma alta margem de segurança, com adição de quantidades de minerais acima do recomendado na tentativa de garantir que as exigências das aves sejam atendidas (BRUGGER; WINDISCH, 2015). Contudo, esta prática pode aumentar os custos da suplementação sem obter benefícios, uma vez que altas concentrações de minerais podem provocar efeitos tóxicos aos animais, além de poluição ambiental devido a excreção excessiva de minerais no meio ambiente (BAO et al., 2007; SUTTLE, 2010). Neste sentido, torna-se necessário o estudo de fontes de minerais alternativas que apresentem maior eficiência de absorção e biodisponibilidade, de modo a maximizar o desempenho das aves e tornar a avicultura industrial mais sustentável.

Os hidroxicloretos constituem uma fonte potencial de suplementação de cobre e manganês, pois são caracterizados pela maior proporção de ligações covalentes, o que permite melhor estabilidade no trato gastrointestinal e redução das interações antagonistas, tornando os minerais mais disponíveis para a absorção (PEREZ et al., 2017). No entanto, poucos estudos foram realizados para determinar a biodisponibilidade desta fonte em comparação com as fontes tradicionalmente empregadas. Além disso, até o momento, nenhum estudo avaliou os efeitos de diferentes fontes e concentrações de microminerais sobre o proteoma e, particularmente, sobre o metaloproteoma de frangos de corte.

Considerando que a grande maioria dos íons metálicos estão ligados às proteínas/enzimas específicas e exercem seus efeitos como centros ativos ou estruturais destas proteínas (GARCIA et al., 2006), a utilização de ferramentas metaloproteômicas podem auxiliar na compreensão dos papéis biológicos, da essencialidade e da toxicidade do cobre e manganês em frangos de corte, além de fornecer informações sobre como a suplementação dietética de diferentes fontes e concentrações destes microminerais pode afetar os mecanismos fisiológicos e funcionais das proteínas dependentes destes elementos. Logo, a partir do estudo metaloproteômico, é possível identificar e caracterizar proteínas responsivas às concentrações de cobre e manganês nos organismos, contribuindo na determinação de biomarcadores associados com suplementação de níveis

elevados desses minerais (HARVEY; MCARDLE, 2008; KUSSMANN; PANCHAUD; AFFOLTER, 2010).

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Funções do cobre e manganês

Nos organismos, os íons de cobre podem existir em dois estados de oxidação, Cu^{1+} que corresponde ao estado reduzido e Cu^{2+} sendo o estado oxidado e mais estável. Esta característica de aceitar ou doar elétrons, torna o cobre um cofator catalítico essencial para a atividade de várias enzimas, especialmente metaloenzimas, as quais exercem uma ampla gama de funções estruturais, bioquímicas e reguladoras celulares nos organismos (KIM; NEVITT; THIELE, 2008).

O cobre está envolvido na produção do tecido conjuntivo por meio da lisil oxidase, uma enzima que contém esse micromineral como seu cofator principal, sendo essencial para formar as ligações cruzadas entre as fibras de colágeno e elastina, conferindo rigidez e elasticidade às proteínas (RUCKER et al., 1998; MCDOWELL, 2003). Na respiração celular, o cobre é fundamental para a atividade da metaloenzima citocromo-c-oxidase (complexo IV), que consiste em uma oxidase terminal da cadeia de transporte de elétrons responsável pelo bombeamento de prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas, gerando um gradiente de prótons que é posteriormente usado pela ATP sintase para conduzir a síntese de ATP (HORN; BARRIENTOS, 2008).

O cobre atua na proteção dos tecidos contra o estresse oxidativo participando como cofator da enzima CuZn-superóxido dismutase (CuZn-SOD), a qual possui atividade antioxidante dependente da presença do cobre (SUTLLE, 2010). Esta enzima é responsável por catalisar a conversão intracelular e extracelular do ânion superóxido (O_2^-) potencialmente tóxico, em oxigênio molecular (O_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), sendo este último uma molécula menos tóxica que pode ser convertida em água pela ação da glutathione peroxidase (RICHARDS et al., 2010).

A ceruloplasmina é uma proteína produzida no fígado e contém em sua estrutura cerca de 6 a 7 íons de cobre fortemente ligados, aos quais podem ser transferidos para outros tecidos. A incorporação do cobre é necessária para que a ceruloplasmina funcione ativamente como uma ferroxidase (ROBERTS, 2012). Desta forma, esta proteína contendo cobre está envolvida na mobilização do ferro catalisando a oxidação do íon ferroso (Fe^{2+}) em íon férrico (Fe^{3+}), possibilitando assim, sua ligação com a transferrina, uma proteína responsável pelo transporte do ferro em seu estado férrico na corrente

sanguínea. Além disso, a ceruloplasmina também possui atividade antioxidante tendo em vista que atua na remoção dos radicais livres promovendo proteção às células contra o dano oxidativo (KIM; NEVITT; THIELE, 2008).

Assim como o cobre, o manganês é cofator de diversas metaloenzimas, como a piruvato carboxilase e Mn-superóxido dismutase (Mn-SOD) (MCDOWELL, 2003). Desse modo, o manganês é necessário para o metabolismo normal de lipídios e carboidratos por meio da atividade da piruvato carboxilase, visto que esta enzima é responsável por catalisar a formação do oxaloacetato que juntamente com a Acetil-CoA iniciam o ciclo de Krebs (KOHLMEIER, 2015). Além disso, este micromineral participa na defesa contra o estresse oxidativo, uma vez que a Mn-SOD encontrada principalmente nas mitocôndrias, complementa a ação da CuZn-SOD citosólica na proteção das células contra os danos provocados pelas espécies reativas de oxigênio (SUTLLE, 2010).

Além de fazer parte da estrutura de metaloenzimas, o manganês está envolvido em numerosas reações bioquímicas como ativador enzimático de várias classes de enzimas, incluindo liases, oxirredutases, isomerases, hidrolases, transferases e ligases (LI et al., 2005; TUFARELLI; LAUDADIO, 2017). Por exemplo, a ativação das glicosiltransferases, enzimas responsáveis por coordenar a síntese de mucopolissacarídeos, pode ser realizada pelo manganês, atribuindo a este micromineral, um papel fundamental no desenvolvimento dos ossos, cartilagens e cascas dos ovos (MCDOWELL, 2003).

1.2. Biodisponibilidade dos minerais

Muitas fontes de suplementação mineral estão disponíveis no mercado para serem empregadas na nutrição de frangos de corte. Porém, durante a formulação das rações, a escolha da fonte adequada não deve depender somente do seu conteúdo mineral, mas principalmente da sua biodisponibilidade, que é definida como o grau em que os nutrientes ingeridos são absorvidos em uma forma que podem ser utilizados pelo metabolismo do animal (AMMERMAN; BAKER; LEWIS, 1995; SUTLLE, 2010).

De acordo com Suttle (2010), a biodisponibilidade envolve quatro fatores importantes: acessibilidade, capacidade de absorção, retenção e funcionalidade. A acessibilidade constitui o acesso potencial do mineral à mucosa absorptiva, sendo influenciada pelas formas químicas do mineral e suas interações com agonistas ou antagonistas presentes na ração ou no lúmen intestinal. A capacidade de absorção corresponde a transferência potencial do mineral disponível através da mucosa, estando

diretamente relacionada com a capacidade da mucosa em absorver o mineral acessível. A retenção é determinada pela capacidade do mineral absorvido permanecer retido no corpo e escapar da excreção renal ou intestinal. Por fim, a funcionalidade reflete o potencial de incorporação dos minerais retidos em biomoléculas funcionais, sendo considerada uma medida completa da biodisponibilidade, pois engloba todos os outros três fatores citados anteriormente (acessibilidade, capacidade de absorção e retenção).

Neste contexto, a forma química dos minerais oriundos de fontes suplementares constitui o primeiro fator observado na avaliação da biodisponibilidade, uma vez que está diretamente relacionada com a eficiência de absorção. Contudo, esta característica não deve ser analisada isoladamente, já que fornece apenas uma compreensão parcial da biodisponibilidade. A mensuração da concentração de minerais em tecidos variados tem sido a forma mais comum de estimar a biodisponibilidade de microminerais (UNDERWOOD; SUTTLE, 1999). Ainda assim, este método não deve ser utilizado como o único parâmetro indicador de biodisponibilidade, tendo em vista que interações negativas podem ocorrer tanto no trato gastrointestinal antes da absorção, quanto nos tecidos do animal após a absorção (HAZEL, 1985).

Considerando a questão da funcionalidade, um método alternativo e promissor para estimar a biodisponibilidade dos microminerais consiste na identificação de biomarcadores sensíveis e específicos à concentração destes elementos, como por exemplo, alterações na expressão gênica ou na expressão proteica (RICHARDS et al., 2010). Uma vez determinados, os biomarcadores podem ser utilizados como um dos critérios na avaliação de diferentes fontes de minerais, fornecendo uma medida mais fácil, direta e completa da biodisponibilidade mineral (RICHARDS, 2010).

1.3. Fontes de suplementação mineral

As principais formas de microminerais utilizadas nas rações de frangos de corte são provenientes de fontes compostas por sais inorgânicos como sulfatos e óxidos, e mais recentemente de fontes definidas como “orgânicas”, em função destes elementos estarem complexados as moléculas orgânicas (BAO; CHOCT, 2009). Os sulfatos são mais utilizados devido ao seu baixo custo e abundância. Esta forma de mineral caracterizada pela alta solubilidade em meio aquoso, tem sido questionada por ser propensa a antagonismos que causam variação na biodisponibilidade mineral (UNDERWOOD; SUTTLE, 1999). Por outro lado, tem havido grande interesse pela utilização dos minerais complexados devido a hipótese de que esses são melhor absorvidos e utilizados pelos

animais do que os sais inorgânicos, fornecendo um novo caminho para menor excreção mineral sem afetar a saúde e o desempenho das aves (BAO; CHOCT, 2009). Esta premissa baseia-se no fato de que os minerais podem ser absorvidos pelas vias de absorção das moléculas orgânicas nas quais estão ligados, reduzindo a competição com outros minerais pelos mesmos sítios de absorção intestinal (LOPES et al., 2017). No entanto, para que isso seja verdadeiro, as ligações que mantêm o mineral complexado na molécula orgânica devem ser fortes o suficiente para resistir ao baixo pH do estômago e aos antagonistas da dieta, e ainda entregar o elemento complexado aos tecidos em uma forma utilizável (SUTLLE, 2010). Além disso, muitos estudos apresentaram resultados inconsistentes quanto a biodisponibilidade entre as fontes orgânicas e inorgânicas, bem como no desempenho dos animais (AMMERMAN; BAKER; LEWIS, 1995; CAO et al., 2000; RICHARDS et al., 2010). Estas informações demonstram que a avaliação da biodisponibilidade de um mineral está além da sua forma química, em que o simples fato de o mineral estar complexado à uma molécula orgânica ou apresentar alta solubilidade, não garante nenhum benefício nutricional por razões que não são totalmente compreendidas (SUTLLE, 2010).

Uma classe menos comum de fonte inorgânica de microminerais conhecida como hidroxicloretos (OHCl), tem sido estudada como alternativa às fontes inorgânicas tradicionais nas dietas de ruminantes (SHAEFFER; LLOYD; SPEARS, 2017), suínos (CEMIN et al., 2019), organismos aquáticos (ZHOU et al., 2017) e aves (PEREZ et al., 2017; M'SADEQ et al., 2018). Acredita-se que devido a sua estrutura cristalina, esta fonte promove a liberação mais lenta de minerais durante o processo de digestão, proporcionando maior absorção e, conseqüentemente, redução da excreção (HAWTHORNE; SKOLOVA, 2002; OLUKOSI; KUIJK; HAN, 2019). Há relatos de que, ao contrário dos sulfatos, os hidroxicloretos possuem menor higroscopicidade e solubilidade em água, o que pode favorecer a biodisponibilidade mineral em virtude da menor reatividade com outros componentes da ração, além de reduzir a atividade pró-oxidante de alguns minerais (MILES et al., 1998; PANG; APPLGATE, 2006; LU et al., 2010).

Diante dos resultados variados e divergentes encontrados na literatura, observa-se que ainda existem muitos mecanismos desconhecidos que influenciam a absorção e a utilização dos microminerais provenientes de fontes distintas, sendo necessário dar continuidade aos ensaios de biodisponibilidade utilizando especialmente novas

metodologias e novas estratégias de suplementação mineral, como ferramentas metaloproteômicas e hidroxicloretos, respectivamente.

1.4. Proteômica e metaloproteômica

A Proteômica compreende o estudo das propriedades das proteínas, tais como, nível de expressão, modificação pós-traducional, interações, estrutura e função, tendo como finalidade obter uma visão abrangente dos processos biológicos e doenças nas quais estão envolvidas (BLACKSTOCK; WEIR, 1999). Na era pós-genômica, a proteômica funcional é considerada uma das mais importantes abordagens para a compreensão da função dos genes, proporcionando uma descrição qualitativa e quantitativa do proteoma de processos específicos (GAMES; BARBOSA; BARACAT-PEREIRA, 2014).

O termo metaloproteômica restringe o estudo da proteômica às metaloproteínas ou às proteínas ligadas a metais (ROBERTS, 2012). Vale ressaltar que as metaloproteínas diferem das proteínas ligadas a metais. Uma metaloproteína consiste em uma proteína que depende de um cofator metálico para exercer sua função, ou seja, a proteína precisa estar obrigatoriamente ligada a um determinado metal para desempenhar normalmente a sua atividade. Por outro lado, nas proteínas ligadas aos metais, o metal não confere nenhuma função específica à proteína, já que este tipo de ligação ocorre devido a existência de um equilíbrio termodinâmico no sistema e pode ser facilmente rompida (MOUNICOU; SZPUNAR; LOBINSKI, 2009).

Estima-se que em torno de 40% de todas as proteínas e enzimas presentes em um organismo são dependentes de um íon metálico para realizarem suas funções (GARCIA et al., 2006). Este fato demonstra a essencialidade dos metais para o desenvolvimento e a manutenção da vida. Neste sentido, os estudos proteômicos e metaloproteômicos são importantes para elucidar a ação de numerosos metais nos organismos e gerar informações valiosas para a compreensão da biologia humana e animal (ROBERTS, 2012). Na nutrição animal, a proteômica pode auxiliar na avaliação dos efeitos de diferentes estratégias nutricionais sobre as alterações no proteoma de células, tecidos ou fluídos corporais, e esclarecer como estas alterações podem influenciar a saúde, produção e reprodução dos animais, assim como, a qualidade dos produtos gerados (ALMEIDA; BENDIXEN, 2012).

Os avanços tecnológicos obtidos nos procedimentos de extração e fracionamento de proteínas, juntamente com o desenvolvimento de tecnologias de alto rendimento e análise de dados, possibilitaram a descoberta de biomarcadores sensíveis, específicos e

precisos (OSKOUETIAN et al., 2016). Os biomarcadores sinalizam mudanças nos processos biológicos em resposta à diversos fatores externos, como o estresse, exposição a patógenos, intervenção terapêutica, ou mesmo alterações dietéticas (ALMEIDA et al., 2015). Sendo assim, os biomarcadores podem auxiliar no monitoramento da saúde e bem-estar dos animais, o que também permite que sejam utilizados como preditores da qualidade dos produtos de origem animal, e podem ser aplicados em diversos estudos, inclusive na nutrição (ALMEIDA et al., 2015; OSKOUETIAN et al., 2016).

Os biomarcadores nutricionais ajudam a esclarecer os mecanismos envolvidos na absorção, transporte e metabolismo de nutrientes dentro de um organismo. Além disso, também podem funcionar como um parâmetro mensurável que relaciona uma exposição específica de um composto alimentar a um estado de saúde e, portanto, oferece um grande potencial para entender a relação entre nutrição e saúde (KUSSMANN; PANCHAUD; AFFOLTER, 2010). Partindo deste princípio, as tecnologias empregadas nos estudos proteômicos em conjunto com uma variedade de técnicas inovadoras de detecção de metais, oferecem um potencial significativo na identificação de metaloproteínas ou proteínas ligadas a metais como possíveis biomarcadores que representem a biodisponibilidade, deficiência e toxicidade de minerais (HARVEY; MCARDLE, 2008), uma vez que o metaloproteoma pode fornecer informações relevantes sobre o quanto dos minerais ingeridos foram absorvidos e incorporados às biomoléculas funcionais.

1.5. Abordagens proteômicas

A evolução da proteômica é sustentada pelos desenvolvimentos tecnológicos e instrumentais que permitiram uma análise abrangente do proteoma em diferentes amostras biológicas. Embora o estudo proteômico ainda apresente desafios e limitações, avanços nas técnicas de fracionamento de proteínas, espectrometria de massas (*MS*) e ferramentas de bioinformática possibilitaram a caracterização e identificação de um grande repertório de proteínas (ECKERSALL; WHITFIELD, 2011). Nesse sentido, diferentes abordagens e ferramentas proteômicas podem ser utilizadas e de maneira geral, a análise proteômica envolve várias etapas em comum que incluem a extração proteica, a separação de proteínas complexas ou mistura de peptídeos, seguida da identificação das proteínas e estudo de bioinformática para processar e analisar os dados obtidos (GAMES; BARBOSA; BARACAT-PEREIRA, 2014; PASSAGLIA; ZAHA, 2014).

Uma das técnicas de fracionamento mais utilizadas é a eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (*2D-PAGE*) (Figura 1). Basicamente, na *2D-PAGE* as proteínas

são separadas inicialmente em função do seu ponto isoelétrico (pI) por meio da focalização isoelétrica (*IEF*), processo denominado de primeira dimensão. Na focalização isoelétrica a mistura de proteínas é colocada em uma fita que contém um gel com um gradiente de pH imobilizado (*IPG*). Em seguida, é aplicado um campo elétrico ao longo do gel no qual ocorre a migração das proteínas até seu respectivo pI, que é o pH no qual a proteína apresenta carga líquida igual a zero (PASSAGLIA; ZAHA, 2014; NELSON; COX, 2019).

Na segunda dimensão, as proteínas já separadas de acordo com o pI são fracionadas em função de sua massa molecular. Nesta etapa ocorre a separação vertical das proteínas por meio de um gel de poliacrilamida (acrilamida e bisacrilamida) que funciona como uma peneira molecular. Ao ser aplicado uma corrente elétrica no gel, as proteínas previamente desnaturadas e carregadas uniformemente com cargas negativas pelo detergente dodecil sulfato de sódio (*SDS*), migram pelos poros do gel em direção ao polo positivo que fica na base do gel, ocorrendo a separação das proteínas com base no tamanho (massa molecular), onde proteínas menores migram mais rapidamente que as maiores (NELSON; COX, 2019).

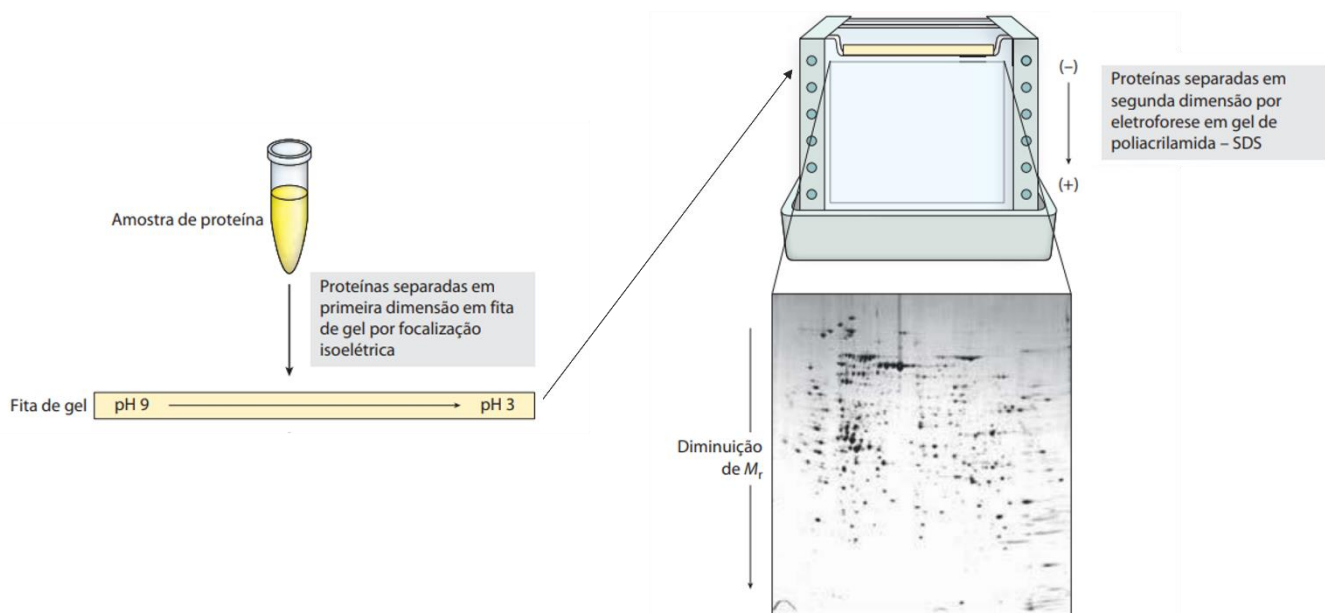


Figura 1 - Representação esquemática da eletroforese bidimensional. Adaptado de Nelson e Cox (2019).

Após a corrida eletroforética, o gel é imerso em uma solução contendo um corante específico para as proteínas como o *Comassie Blue*, favorecendo a visualização das

mesmas na forma de “*spots*” (NELSON; COX, 2019). A próxima etapa consiste em analisar os géis obtidos. Primeiramente os géis são escaneados e as imagens são analisadas em um *software* específico, onde são mensurados o número de *spots*, o percentual de correlação entre os géis (*matching*), pI e massa molecular experimentais e a diferença de expressão dos *spots* proteicos entre os grupos estudados. Os *spots* diferencialmente expressos são então recortados do gel e submetidos a digestão proteolítica com tripsina para que posteriormente as proteínas possam ser identificadas no espectrômetro de massas (BALDASSINI et al., 2015).

Neste contexto, a *2D-PAGE* apresenta diversas vantagens, como a visualização simultânea de vários *spots* proteicos que podem corresponder de 500 a 1000 proteínas provenientes de uma amostra, além de possibilitar a observação de modificações pós-traducionais (observadas como aglomerados de manchas horizontais ou verticais), estimar o pI e massa molecular das proteínas, e permitir a realização de uma análise comparativa da expressão proteica entre diferentes amostras (BODZON-KULAKOWSKA, 2013). Por outro lado, a *2D-PAGE* também possui limitações, como baixa detecção de proteínas grandes (proteínas grandes apresentam dificuldade de entrar nas fitas de IPG), de baixa abundância, ou proteínas altamente ácidas ou básicas, bem como proteínas de membrana devido à baixa solubilidade aquosa e alto teor de lipídeos (OLVER, 2011; BODZON-KULAKOWSKA, 2013).

Outra abordagem que tem ganhado popularidade é a técnica livre de gel, também conhecida como *Shotgun* ou *Bottom up* (Figura 2). Ao contrário da *2D-PAGE*, na *Shotgun* a digestão proteolítica acontece diretamente na solução de proteínas intactas de uma amostra. Em seguida é realizado o fracionamento da mistura de peptídeos utilizando tecnologia multidimensional (*MudPIT*), na qual o fracionamento envolve a cromatografia líquida (*LC*) combinando vários princípios de separação (normalmente troca catiônica forte e fase reversa) seguida da espectrometria de massas em tandem (*MS/MS*) (OLVER, 2011; PASSAGLIA; ZAHA, 2014).

Esta técnica poderosa possui alta sensibilidade e permite a identificação de proteínas em grande escala apresentando um rendimento superior a técnica *2D-PAGE* tradicional. Porém, assim como a *2D-PAGE*, a *Shotgun* também apresenta algumas limitações, como dificuldade para identificar isoformas e modificações pós-traducionais, além de ser um procedimento mais oneroso (OLVER, 2011; LIPPOLIS; NALLY, 2018). Logo, ambas as técnicas possuem pontos fortes e limitações, e a escolha do método vai depender dos objetivos do estudo, bem como dos recursos disponíveis, podendo utilizar

as técnicas individualmente ou de forma combinada. Vale destacar que somente a combinação das duas técnicas possui o potencial de fornecer uma visão e compreensão mais completa do proteoma de amostras biológicas complexas (MILLER, 2011; LIPPOLIS; NALLY, 2018).

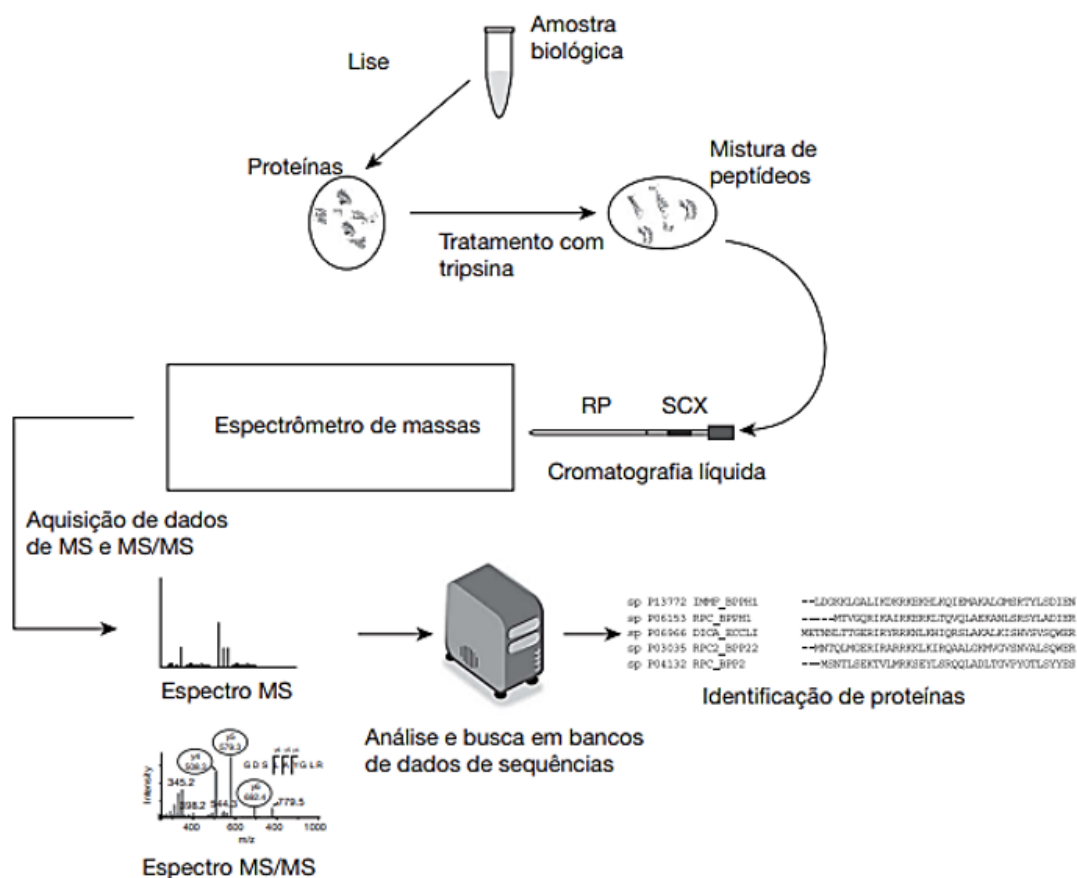


Figura 2 - Representação esquemática da proteômica livre de gel (*shotgun*). Fonte: Passaglia e Zaha (2014).

2. JUSTIFICATIVA

O cobre e o manganês são microminerais fundamentais para manter a saúde e a produtividade das aves. Esses minerais são comumente suplementados a partir de fontes de sais inorgânicos, conhecidos por favorecerem a ocorrência de antagonismos no trato gastrointestinal afetando negativamente a biodisponibilidade. Por outro lado, os hidroxicloretos constituem uma fonte potencial de suplementação de cobre e manganês em função da maior proporção de ligações covalentes que podem impedir interações negativas com outros nutrientes. A maioria dos estudos relatados na literatura se concentram em avaliar a biodisponibilidade pela concentração de minerais em tecidos e

até o momento nenhum estudo avaliou a funcionalidade dos minerais por meio da sua incorporação em biomoléculas. Sendo assim, abordagens metaloproteômicas podem ser utilizadas na avaliação da biodisponibilidade de diferentes fontes de suplementação mineral, bem como na compreensão e elucidação da interação do cobre e manganês com as proteínas e dos mecanismos envolvidos na exposição aos maiores níveis desses minerais em frangos de corte.

3. OBJETIVOS

O objetivo geral com o presente estudo foi avaliar o perfil diferencial de proteínas expressas em amostras de fígado e plasma de frangos de corte, em resposta à suplementação de duas fontes (sulfatos e hidroxicloretos) e dois níveis de cobre e manganês (15 e 150 ppm de Cu; 80 e 120 ppm de Mn). Para atender o objetivo geral proposto, o estudo foi dividido em dois capítulos.

O Capítulo 2 intitulado “**Abordagem metaloproteômica do tecido hepático de frangos de corte suplementados com diferentes fontes e níveis de cobre e manganês**”, apresenta os resultados do estudo metaloproteômico nas amostras de tecido hepático. O objetivo com o estudo foi utilizar a técnica proteômica *2D-PAGE* combinada com a análise do Cu e Mn nos *spots* proteicos, *pellets* proteicos e amostras de tecido hepático por *GFAAS* e *FAAS*, para avaliar a diferença de expressão das proteínas associadas aos minerais e a biodisponibilidade das fontes hidroxicloretos e sulfatos.

O Capítulo 3 intitulado “**Estudo proteômico do plasma de frangos de corte suplementados com diferentes fontes e níveis de cobre e manganês**”, apresenta os resultados da análise proteômica das amostras de plasma. O estudo teve como objetivo avaliar por meio da técnica *2D-PAGE* a expressão diferencial das proteínas plasmáticas, e as concentrações de Cu e Mn nas amostras e *pellets* de plasma de frangos de corte suplementados com dois níveis de Cu e Mn a partir das fontes sulfatos e hidroxicloretos.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, A. M.; BASSOLS, A.; BENDIXEN, E.; BHITE, M.; CECILIANI, F.; CRISTOBAL, S.; ECKERSALL, P. D.; HOLLUNG, K.; LISACEK, F.; MAZZUCHELLI, G.; MCLAUGHLIN, M.; MILLER, I.; NALLY, J. E.; PLOWMAN, J.; RENAUT, J.; RODRIGUES, P.; RONCADA, P.; STARIC, J.; TURK, R. Animal board invited review: Advances in proteomics for animal and food sciences. **Animal**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 1–17, 2015.

ALMEIDA, A. M.; BENDIXEN, E. Pig proteomics: A review of a species in the crossroad between biomedical and food sciences. **Journal of Proteomics**, [s. l.], v. 75, n. 14, p. 4296–4314, 2012.

AMMERMAN, C. B.; BAKER, D. H.; LEWIS, A. J. **Bioavailability of nutrients for animals - Amino Acids, Minerals, and Vitamins**. San Diego: Academic Press, 1995.

BALDASSINI, W. A.; BRAGA, C. P.; CHARDULO, L. A. L.; SILVA, J. A. I. V.; MALHEIROS, J. M.; DE ALBUQUERQUE, L. G.; FERNANDES, T. T.; PADILHA, P. D. M. Bioanalytical methods for the metalloproteomics study of bovine longissimus thoracis muscle tissue with different grades of meat tenderness in the Nellore breed (*Bos indicus*). **Food Chemistry**, [s. l.], v. 169, p. 65–72, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.131>>

BAO, Y.; CHOCT, M.; IJI, P.; BRUERTON, K. Effect of Organically Complexed Copper, Iron, Manganese, and Zinc on Broiler Performance, Mineral Excretion, and Accumulation in Tissues. **Journal of Applied Poultry Research**, [s. l.], v. 16, p. 448–455, 2007.

BAO, Y. M.; CHOCT, M. Trace mineral nutrition for broiler chickens and prospects of application of organically complexed trace minerals: a review. **Animal Production Science**, [s. l.], v. 49, p. 269–282, 2009.

BLACKSTOCK, W. P.; WEIR, M. P. Proteomics: Quantitative and physical mapping of cellular proteins. **Trends in Biotechnology**, [s. l.], v. 17, n. 3, p. 121–127, 1999.

BODZON-KULAKOWSKA, A. Two-Dimensional Gel Electrophoresis. In: CIBOROWSKI, P.; SILBERRING, J. (Eds.). **Proteomic Profiling and Analytical Chemistry: The Crossroad**. 1. ed. [s.l.] : Elsevier, 2013. p. 119–133.

BRUGGER, D.; WINDISCH, W. M. Environmental responsibilities of livestock feeding using trace mineral supplements. **Animal Nutrition**, [s. l.], v. 1, n. 3, p. 113–118, 2015.

CAO, J.; HENRY, P. R.; GUO, R.; HOLWERDA, R. A.; TOTH, J. P.; LITTELL, R. C.; MILES, R. D.; AMMERMAN, C. B. Chemical characteristics and relative bioavailability of supplemental organic zinc sources for poultry and ruminants. **Journal of Animal Science**, [s. l.], v. 78, n. March, p. 2039–2054, 2000.

CEMIN, H. S.; CARPENTER, C. B.; WOODWORTH, J. C.; TOKACH, M. D.; DRITZ, S. S.; DEROUCHÉY, J. M.; GOODBAND, R. D.; USRY, J. L. Effects of zinc source and level on growth performance and carcass characteristics of finishing pigs. **Translational Animal Science**, [s. l.], p. 1–7, 2019.

ECKERSALL, D.; WHITFIELD, P. D. **Methods in Animal Proteomics**. [s.l: s.n.].

GAMES, P. D.; BARBOSA, M. de O.; BARACAT-PEREIRA, M. C. Preparo de amostras proteicas . In: BARACT-PEREIRA, M. C. (Ed.). **Bioquímica de proteínas**. Viçosa: UFV, 2014. p. 219–246.

GARCIA, J. S.; MAGALH, C. S. De; AUR, M.; ARRUDA, Z. Trends in metal-binding and metalloprotein analysis. **Talanta**, [s. l.], v. 69, p. 1–15, 2006.

HARVEY, L. J.; MCARDLE, H. J. Biomarkers of copper status : a brief update. **British Journal of Nutrition**, [s. l.], v. 99, p. 10–13, 2008.

HAWTHORNE, F. C.; SKOLOVA, E. Simonkolléite, $Zn_5(OH)_8Cl_2(H_2O)$, a decorated interrupted-sheet structure of the form $[m^2]_4$. **The Canadian Mineralogist**, [s. l.], v. 40, p. 939–946, 2002.

HAZEL, T. Minerals in Foods : Dietary Sources, Chemical Forms, Interactions, Bioavailability. **World Review of Nutrition and Dietetics**, [s. l.], v. 46, p. 1–123, 1985.

HORN, D.; BARRIENTOS, A. Mitochondrial Copper Metabolism and Delivery to Cytochrome c Oxidase. **IUBMB Life**, [s. l.], v. 60, n. 7, p. 421–429, 2008.

KIM, B.; NEVITT, T.; THIELE, D. J. Mechanisms for copper acquisition, distribution and regulation. **Nature Chemical Biology**, [s. l.], v. 4, n. 3, p. 176–185, 2008.

KOHLMEIER, M. **Nutrient Metabolism - Structures, Functions, and Genes**. 2. ed. London: Academic Press, 2015.

KUSSMANN, M.; PANCHAUD, A.; AFFOLTER, M. Proteomics in Nutrition: Status Quo and Outlook for Biomarkers and Bioactives. **Journal of Proteome Research**, [s. l.], v. 9, p. 4876–4887, 2010.

LI, S. F.; LUO, X. G.; LU, L.; CRENSHAW, T. D.; BU, Y. Q.; LIU, B.; KUANG, X.; SHAO, G. Z.; YU, S. X. Bioavailability of organic manganese sources in broilers fed high dietary calcium. **Animal Feed Science and Technology**, [s. l.], v. 123–124, p. 703–715, 2005.

LIPPOLIS, J. D.; NALLY, J. E. Considerations for Farm Animal Proteomic Experiments: An Introductory View Gel-Based Versus Non-gel-Based Approaches. In: ALMEIDA, A. M. De; ECKERSALL, D.; MILLER, I. (Eds.). **Proteomics in Domestic Animals: from Farm to Systems Biology**. Cham: Springer, 2018. p. 7–16.

LOPES, M.; PAROUL, N.; BARBOSA, J.; VALDUGA, E.; LUIS, R.; TONIAZZO, G.; OLIVEIRA, D. Effect of Partial and Total Replacement of Inorganic by Organic Microminerals Sources on the Quality of Broiler Carcasses. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, [s. l.], v. 60, p. 1–11, 2017.

LU, L.; WANG, R. L.; ZHANG, Z. J.; STEWARD, F. A.; LUO, X.; LIU, B. Effect of Dietary Supplementation with Copper Sulfate or Tribasic Copper Chloride on the Growth Performance, Liver Copper Concentrations of Broilers Fed in Floor Pens, and Stabilities of Vitamin E and Phytase in Feeds. **Biological Trace Element Research**, [s. l.], v. 138, p. 181–189, 2010.

MACARI, M.; MAIORKA, A. **Fisiologia das aves comerciais**. Jaboticabal: Funep, 2017.

MCDOWELL, L. R. **Minerals in Animal and Human Nutrition**. [s.l.] : Elsevier, 2003. v. 639

MILES, R. D.; KEEFE, S. F. O.; HENRY, P. R.; AMMERMAN, C. B.; LUO, X. G. The Effect of Dietary Supplementation with Copper Sulfate or Tribasic Copper Chloride on Broiler Performance, Relative Copper Bioavailability, and Dietary Prooxidant Activity. **Poultry Science**, [s. l.], v. 77, p. 416–425, 1998.

MILLER, I. Protein Separation Strategies. In: ECKERSALL, D. P.; WHITFIELD, P. D. (Eds.). **Methods in Animal Proteomics**. Oxford: John Wiley & Sons, 2011. p. 41–76.

MOUNICOU, S.; SZPUNAR, J.; LOBINSKI, R. Metallomics: the concept and methodology. **Chemical Society Reviews**, [s. l.], v. 38, p. 1119–1138, 2009.

M'SADEQ, S. A.; WU, S.; CHOCT, M.; SWICK, R. A. Influence of trace mineral sources on broiler performance , lymphoid organ weights , apparent digestibility , and bone mineralization. **Poultry Science**, [s. l.], v. 0, p. 1–7, 2018.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Principios de Bioquímica**. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2019.

OLUKOSI, O. A.; KUIJK, S. J. A. Van; HAN, Y. Sulfate and hydroxychloride trace minerals in poultry diets – comparative effects on egg production and quality in laying hens , and growth performance and oxidative stress response in broilers. **Poultry Science**, [s. l.], p. 1–11, 2019.

OLVER, C. Types of Sample and Experimental Planning. In: ECKERSALL, P. D.; WHITFIELD, P. D. (Eds.). **Methods in Animal Proteomics**. Oxford: John Wiley & Sons, 2011. p. 11–39.

OSKOUÉIAN, E.; ECKERSALL, D.; BENCUROVA, E.; DANDEKAR, T. Application of Proteomic Biomarkers in Livestock Disease Management Ehsan. In: SALEKDEH, G. H. (Ed.). **Agricultural Proteomics**. Switzerland: Springer International Publishing, 2016. p. 299–310.

PANG, Y.; APPLGATE, T. J. Effects of Copper Source and Concentration on in Vitro Phytate Phosphorus Hydrolysis by Phytase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 54, p. 1792–1796, 2006.

PASSAGLIA, L. M. P.; ZAHA, A. Técnicas de biología molecular. In: ZAHA, A.; FERREIRA, H. B.; PASSAGLIA, L. M. P. (Eds.). **Biología Molecular Básica** . 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. p. 331–362.

PEREZ, V.; SHANMUGASUNDARAM, R.; SIFRI, M.; PARR, T. M.; SELVARAJ, R. K. Effects of hydroxychloride and sulfate form of zinc and manganese supplementation on

superoxide dismutase activity and immune responses post lipopolysaccharide challenge in poultry fed marginally lower doses of zinc and manganese. **Poultry Science**, [s. l.], v. 96, p. 4200–4207, 2017.

RICHARDS, J. D. Measuring trace mineral bioavailability key. **Feedstuffs**, [s. l.], v. 82, n. 3, p. 1–3, 2010.

RICHARDS, J. D.; ZHAO, J.; HARRELL, R. J.; ATWELL, C. A.; DIBNER, J. J. Trace Mineral Nutrition in Poultry and Swine. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, [s. l.], v. 23, n. 11, p. 1527–1534, 2010.

ROBERTS, E. A. Metallomics Using metalloproteomics to investigate the cellular physiology of copper in hepatocytes. **Metallomics**, [s. l.], v. 4, p. 633–640, 2012.

RUCKER, R. B.; KOSONEN, T.; CLEGG, M. S.; MITCHELL, A. E.; RUCKER, B. R.; URIU-HARE, J. Y.; KEEN, C. L. Copper, lysyl oxidase, and extracellular matrix protein. **American Journal of Clinical Nutrition**, [s. l.], v. 67, p. 996–1002, 1998.

SHAEFFER, G. L.; LLOYD, K. E.; SPEARS, J. W. Bioavailability of zinc hydroxychloride relative to zinc sulfate in growing cattle fed a corn-cottonseed hull-based diet. **Animal Feed Science and Technology**, [s. l.], 2017.

SUTTLE, N. **Mineral Nutrition of Livestock**. 4. ed. Cambridge: CABI Publishing, 2010.

TUFARELLI, V.; LAUDADIO, V. Manganese and its role in poultry nutrition: an overview. **Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences**, [s. l.], v. 5, n. 6, p. 749–754, 2017.

UNDERWOOD, E. J.; SUTTLE, N. F. **The mineral nutrition of livestock**. 3. ed. New York: CABI Publishing, 1999.

ZHOU, Y.; ZHANG, D.; PEATMAN, E.; RHODES, M. A.; LIU, J.; DAVIS, D. A. Effects of various levels of dietary copper supplementation with copper sulfate and copper hydroxychloride on Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* performance and microbial communities. **Aquaculture**, [s. l.], v. 476, p. 94–105, 2017.