

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 21/07/2018.

APLICAÇÃO DE FERRAMENTAS PROTEÔMICAS E
METALOPROTEÔMICAS NA CARACTERIZAÇÃO DE
BIOMARCADORES PLASMÁTICOS E HEPÁTICOS DE RATOS
SUBMETIDOS AO DIABETES TIPO 1

CAMILA PEREIRA BRAGA

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do
título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em
Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração
Biomoléculas: estrutura e função.

Prof. Dr. Pedro de Magalhães Padilha

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

APLICAÇÃO DE FERRAMENTAS PROTEÔMICAS E
METALOPROTEÔMICAS NA CARACTERIZAÇÃO DE
BIOMARCADORES PLASMÁTICOS E HEPÁTICOS DE RATOS
SUBMETIDOS AO DIABETES TIPO 1

CAMILA PEREIRA BRAGA

Nutricionista

PROF. DR. PEDRO DE MAGALHÃES PADILHA

Químico

PROF. DR. ANA ANGÉLICA HENRIQUE FERNANDES

Bióloga

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do
título de Doutor no Programa de Pós-Graduação
em Biologia Geral e Aplicada, Área de
concentração Biomoléculas: estrutura e função.

BOTUCATU – SP
2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Braga, Camila Pereira.

Aplicação de ferramentas proteômicas e metaloproteômicas na caracterização de biomarcadores plasmáticos e hepáticos de ratos submetidos ao diabetes tipo 1 / Camila Pereira Braga.
- Botucatu, 2016

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Pedro de Magalhães Padilha
Coorientador: Ana Angélica Henrique Fernandes
Capes: 20801009

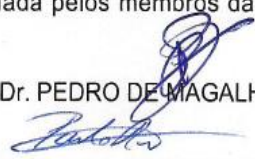
1. Diabetes mellitus. 2. Marcadores bioquímicos. 3. Eletroforese bidimensional. 4. Metaloproteínas. 5. Proteínas
- Metabolismo.

Palavras-chave: Diabetes - Biomarcadores; Eletroforese bidimensional; Metabolismo; Metaloproteínas; Proteínas.

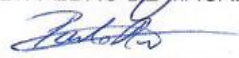
ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE CAMILA PEREIRA BRAGA, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA GERAL E APLICADA, DO INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS.

Aos 21 dias do mês de julho do ano de 2016, às 09:00 horas, no(a) Sala de Defesas da Pós-Graduação, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Prof. Dr. PEDRO DE MAGALHAES PADILHA - Orientador(a) do(a) Departamento de Química e Bioquímica / Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP, Prof. Dr. PAULO DOS SANTOS ROLDAN do(a) Departamento de Química e Biotecnologia / Instituto de Química e Biotecnologia - Universidade Federal de Alagoas, Profa. Dra. ANA RITA DE ARAUJO NOGUEIRA do(a) Centro de Pesquisa de Pecuária do Sudeste / Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA - São Carlos, Prof. Dr. LINCOLN CARLOS SILVA DE OLIVEIRA do(a) Departamento de Química / Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Prof. Dr. JOSÉ MAURICIO SFORCIN do(a) Departamento de Microbiologia e Imunologia / Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da TESE DE DOUTORADO de CAMILA PEREIRA BRAGA, intitulada **APLICAÇÃO DE FERRAMENTAS PROTEÔMICAS E METALOPROTEÔMICAS NA CARACTERIZAÇÃO DE BIOMARCADORES PLASMÁTICOS E HEPÁTICOS DE RATOS SUBMETIDOS AO DIABETES TIPO 1**. Após a exposição, a discente foi arguida oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final: ____

APROVADO. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.



Prof. Dr. PEDRO DE MAGALHAES PADILHA



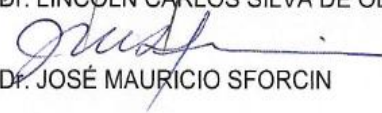
Prof. Dr. PAULO DOS SANTOS ROLDAN



Profa. Dra. ANA RITA DE ARAUJO NOGUEIRA



Prof. Dr. LINCOLN CARLOS SILVA DE OLIVEIRA



Prof. Dr. JOSÉ MAURICIO SFORCIN

AUXÍLIOS FINANCEIROS

FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

Processos: 2011/21672-1 (D) e 2014/14249-3 (BEPE)



Projeto regulamentado pela Agência Nacional de Energia Elétrica - ANEEL e desenvolvido no âmbito do Programa P&D da Energia Sustentável do Brasil S.A.

P&D: 6631-0001/2012

Contrato Jirau 004/13



FUNDIBIO – Fundação do Instituto de Biociências



PROPG – Pró-Reitoria de Pós-Graduação



AGRADECIMENTOS

Querido orientador Pedro de Magalhães Padilha, só tenho a agradecer por todo o apoio e confiança que você depositou em mim durante esses quatro anos de muito trabalho. Agradeço por você ter me deixado participar desse grupo que tanto contribuiu para meu amadurecimento científico e profissional.

Agradeço imensamente à minha família, especialmente meus pais e marido, por todo apoio, amor e paciência.

Agradeço a todos os meus amigos que contribuíram diretamente ou indiretamente me incentivando na concretização desse trabalho.

Agradeço aos meus amigos e também companheiros de laboratório por toda ajuda e também pela amizade.

Agradeço todos os professores e colaboradores que contribuíram para a realização deste trabalho, em especial Aline de Lima Leite, Marília Afonso Rabelo Buzalaf, Ana Angélica Henrique Fernandes e Jiri Adamec.

Agradeço a seção de Pós-graduação e coordenação do Programa pelo suporte acadêmico.

Agradeço a FAPESP pelo apoio financeiro ao conceder a bolsa de doutorado e estágio de doutorado em Lincoln, que foi fundamental para o meu desenvolvimento profissional.

SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Camila Pereira Braga

Data de nascimento: 28 de junho de 1986

Naturalidade: Osasco/SP

E-mail: braga_ca@yahoo.com.br

FORMAÇÃO ACADÊMICA

- 2012-2016 Doutorado em Biologia Geral e Aplicada
 UNESP – Instituto de Biociências de Botucatu
- 2014-2015 Doutorado sanduíche
 UNL – University of Nebraska - Lincoln
- 2010 – 2012 Mestrado em Ciências Biológicas (Farmacologia)
 UNESP – Instituto de Biociências de Botucatu
- 2005 – 2009 Graduação em Nutrição
 UNESP – Instituto de Biociências de Botucatu

PRODUÇÃO CIENTÍFICA

Artigos Publicados

1. BOONE, C. B.; GROVE, R.; ADAMCOVA, D.; **BRAGA, C.**; ADAMEC, J. Revealing oxidative damage to enzymes of carbohydrate metabolism in yeast: An integration of 2D DIGE quantitative proteomics and bioinformatics. *Proteomics*, v. xx, p. xx-xx, 2016.
2. POZZI, C. M. C.; **BRAGA, C. P.**; VIEIRA, J. C. S.; CAVECCI, B.; QUEIROZ, J. V.; BARBOSA, H.; ARRUDA, M. A. Z.; GOZZO, F. C.; PADILHA, P. M. Metal ions bound to the human milk immunoglobulin A: Metalloproteomic approach. *Food Chemistry*, v. 166, p. 492-497, 2015.
3. BALDASSINI, W. A.; **BRAGA, C. P.**; CHARDULO, L. A. L.; SILVA, J. A. V.; MALHEIROS, J. M.; DE ALBUQUERQUE, L. G.; FERNANDES, T. T.; PADILHA, P. 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*, v. 169, p. 65-72, 2015.

4. VIEIRA, J.C. S.; CAVECCI, B.; QUEIROZ, J. V.; **BRAGA, C. P.**; PADILHA, C. C. F.; LEITE, A. L.; FIGUEIREDO, W. S.; BUZALAF, M. A. R.; ZARA, L. F.; PADILHA, P. M. Determination of the Mercury Fraction Linked to Protein of Muscle and Liver Tissue of Tucunaré (*Cichla* spp.) from the Amazon Region of Brazil. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology (Print)*, v. 69, p.422-430, 2015.
5. CAVECCI, B.; LIMA, P. M.; VIEIRA, J. C. S.; **BRAGA, C. P.**; QUEIROZ, J. V.; BITTARELLO, A. C.; PADILHA, P. M.. Use of ultrasonic extraction in determining apparent digestibility in fish feed. *Journal of Food Measurement and Characterization*, v. 9, p. 299-603, 2015.
6. LIMA, P. M.; CAVECCI, B.; ROLDAN, P. S.; **BRAGA, C. P.**; PADILHA, C. C. F.; PEZZATO, L. E.; PADILHA, P. M.. Zinc determination in samples fish by GFAAS using acid digestion in an ultrasound bath. *Journal of Food Measurement and Characterization*, v.10, p.113-118, 2015.
7. SANTOS, K. C.; **BRAGA, C. P.**; BARBANERA, P. O.; SEIVA, F.R.F; JUNIOR, A. F.; FERNANDES, A. A. H.. Cardiac Energy Metabolism and Oxidative Stress Biomarkers in Diabetic Rat Treated with Resveratrol. *Plos One*, v. 9, p. e102775, 2014.
8. ANDRADE, B. F. M. T.; **BRAGA, C. P.**; SANTOS, K. C.; BARBOSA, L. N.; RALL, V. L. M.; SFORCIN, J. M.; FERNANDES, A. A. H.; JÚNIOR, A. F. Effect of Inhaling “*Cymbopogon martini*” Essential Oil and Geraniol on Serum Biochemistry Parameters and Oxidative Stress in Rats. *Biochemistry Research International*, v. 2014, p. 1-7, 2014.
9. KAWAHARA, E. I.; MAÚES, N. H. P. B.; SANTOS, K. C.; BARBANEIRA, P. O.; **BRAGA, C. P.**; FERNANDES, A. A. H. Energy restriction and impact on indirect calorimetry and oxidative stress in cardiac tissue in rat. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics (Print)*, v. 51, p. 365-371, 2014.
10. **BRAGA, C. P.**; BITTARELLO, A. C.; Padilha, C. C. F.; LEITE, A. L.; MORAES, P. M.; BUZALAF, M. A. R.; ZARA, L. F.; PADILHA, P. M. Mercury fractionation in dourada (*Brachyplatystoma rousseauxii*) of the Madeira River in Brazil using metalloproteomic strategies. *Talanta (Oxford)*, v. 132, p. 239-244, 2014.
11. CAVECCI, B.; LIMA, P. M.; QUEIROZ, J. V.; **BRAGA, C.P.**; PADILHA, C. C. F.; LEITE, A. L.; BUZALAF, M. A. R.; PEZZATO, L. E.; PADILHA, P.M. Metalloproteomic Profile Determination of Muscle Samples from Nile Tilapia Using AAS and ESI-MS/MS after 2D-

- PAGE Separation. *Journal of the Brazilian Chemical Society (Impresso)*, v. 26, p. 239-246, 2014.
12. CHUFFA, L. G. A.; FIORUCI-FONTANEL, B. A.; BORDON, J. G.; PIRES, R. B.; **BRAGA, C. P.**; SEIVA, F. R. F.; FERNANDES, A. A. H. Rutin ameliorates glycemic index, lipid profile and enzymatic activities in serum, heart and liver tissues of rats fed with combination of hypercaloric diet and chronic ethanol consumption. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics (Print)*, v. 51, p. 215-222, 2014.
 13. OLIVEIRA, G. O.; **BRAGA, C. P.**; FERNANDES, A. A. H. Improvement of biochemical parameters in type 1 diabetic rats after the roots aqueous extract of yacon [*Smallanthus sonchifolius* (Poepp.& Endl.)] treatment. *Food and Chemical Toxicology*, v. 59, p. 256 - 260, 2013.
 14. **BRAGA, C. P.**; MOMENTTI, A. C.; PEIXOTO, F. B.; BAPTISTA, R. F. F.; SANTOS, F. A.; FAVA, F. H.; FERNANDES, A. A. H. Influence of treatment with quercetin on lipid parameters and oxidative stress of pregnant diabetic rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology (Online)*, v. 91, p. 1-7, 2013.
 15. **BRAGA, C. P.**; BAPTISTA, R. F. F.; PEIXOTO, F. B.; MOMENTTI, A. C.; FAVA, F. H.; FERNANDES, A. A. H. Effects of Quercetin Administration on the Pregnancy Outcome of Diabetic Rats. *Journal of Diabetes & Metabolism*, v. 3, p. 1-4, 2012.
 16. ALMEIDA, D. A. T.; **BRAGA, C. P.**; NOVELLI, E. L. B.; FERNANDES, A. A. H. Evaluation of Lipid Profile and Oxidative Stress in STZInduced Rats Treated with Antioxidant Vitamin. *Brazilian Archives of Biology and Technology (Impresso)*, v. 55, p. 527-536, 2012.
 17. MANI, F.; **BRAGA, C. P.**; NOVELLI, E. L. B.; SFORCIN, J. M. Influence of Clove Tea (*Syzygium Aromaticum*) on Body Weight and Biochemical Parameters of Rats Subjected to Ethanol Consumption and Abstinence. *Medicinal Chemistry*, v. 4, p. 81-85, 2012.
 18. SEIVA, F. R. F.; CHUFFA, L. G. A.; **BRAGA, C. P.**; JÚNIOR, A.F; FERNANDES, A. A. H. Quercetin ameliorates glucose and lipid metabolism and improves antioxidant status in postnatally monosodium glutamate-induced metabolic alterations. *Food and Chemical Toxicology*, v. 50. p. 3556-3561, 2012.

19. ALMEIDA, F. Q. A; **BRAGA, C. P.**; SEIVA, F. R. F.; FERNANDES, A. A. H. Suplementação da vitamina C sobre a dislipidemia e lesão tecidual no diabetes mellitus tipo 1: estudo experimental. *Endocrinologia & Diabetes Clínica e Experimental*, v.1 3, p. 1416-1421, 2012.
20. FERNANDES, A. A. H; VALERINI, F. G.; NAKATANI, B. T.; NAKATANI, B. T.; NAKAO, H. C.; **BRAGA, C. P.**; MENDES, A. L. Análise dos parâmetros séricos em ratos diabéticos suplementados com óxido de magnésio. *Endocrinologia & Diabetes Clínica e Experimental*, v. 11, p. 1342-1346, 2011.
21. **BRAGA, C. P.**; SANTOS, F. A.; SILVA, E. G.; HIRAKAWA, H. S.; FERNANDES, A. A. H.; CALDERON, I. M. P. Relação do ganho de peso, antes e durante a gravidez, com a macrosomia fetal em gestações complicadas pelo diabetes gestacional e hiperglicemia leve. *Nutrire (São Paulo)*, v. 36, p. 85-98, 2011.
22. **BRAGA, C. P.**; BOLIANI, E; BIANCHI, A. C.; GUERRERO, J. B.; AKIBA, M.; PEREIRA, T. A.; MAESTÁ N. Classificação da adiposidade, massa muscular e consumo alimentar em mulheres adultas participantes de um programa de atividade física. *Nutrição Brasil*, v. 9, p. 218-224, 2010.
23. BOLIANI, E.; **BRAGA, C. P.**; BIANCHI, A. C.; GUERRERO, J. B.; AKIBA, M.; PEREIRA, T. A.; MAESTÁ N. Mudança na composição corporal e consumo alimentar no período pré-competição da equipe campeã paulista de futebol feminino de campo. *Revista Brasileira de Fisiologia do Exercício*, v. 9, p. 162-166, 2010.
24. LOPES, A. F.; **BRAGA, C. P.**; BOLIANI, E.; ALMEIDA, F. Q. A. Perfil antropométrico e alimentar dos participantes do programa universidade aberta à terceira idade (UNATI) do instituto de biociências de Botucatu/SP. *Revista Ciência em Extensão*, v. 6, p. 1-13, 2010.
25. **BRAGA, C. P.**; LOPES, A. F.; BOLIANI, E.; ALMEIDA, F. Q. A. Avaliação antropométrica e nutricional de idosas participantes do Programa Universidade Aberta à Terceira Idade (UNATI) de 2008. *Simbio-Logias (Botucatu)*, v. 2, p. 9-20, 2009.
26. FRANCISQUETI, F. V; **BRAGA, C. P.**; GOMES, M. I. F. V. Diferenças nutricionais entre queijo cottage produzido por método tradicional e enzimático, avaliação da preferência e ingestão média de leite e derivados por parcela da população. *Simbio-Logias (Botucatu)*, v. 2, p. 102-113, 2009.

Indicadores Quantitativos

Publicações em periódicos: 26

Capítulos de livro publicados: 2

Trabalhos apresentados em Congressos: 97

Participações em Congressos: 15

Outras informações relevantes

- Número total de citações: na *Web of Science*: 23 (Índice h=3); no *Scopus*: 32 (Índice h=3); no *Google Scholar*: 91 (Índice h=5).

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xvii
RESUMO.....	xxi
ABSTRACT.....	xxiii
1. Introdução.....	1
2. Justificativas.....	14
3. Hipótese e Objetivo.....	14
Referências bibliográficas	15
Capítulo I	
<i>Metalloproteomic and differential expression in plasma in a rat model of type 1 diabetes.....</i>	<i>23</i>
Capítulo II	
<i>Insulin dependent and independent changes in liver proteome of diabetes type 1 rat model.....</i>	<i>51</i>
Capítulo III	
<i>Alterations in oxidative damage of proteins in type 1 diabetes using a novel 2D-DIGE method: Oxi-Proteome.....</i>	<i>125</i>
Capítulo IV	
<i>Using the proteomic approach to identify metalloproteins and proteins that are metal-binding with copper, magnesium, selenium and zinc in spots of liver samples from diabetic rats.....</i>	<i>201</i>
Conclusões.....	243
Anexo.....	247

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Introdução

α	alfa
β	beta
δ	delta
2D-DIGE	eletroforese em gel diferencial
2D-PAGE	eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida
μg	micrograma
μL	microlitro
1D	uma dimensão
2D	duas dimensões
AAS	espectrometria de absorção atômica
ATP	adenosina trifosfato
Ca	cálcio
CAT	catalase
Cu	cobre
DM1	diabetes mellitus tipo 1
EO	estresse oxidativo
ERO	espécies reativas de oxigênio
ESI MS MS	espectrometria de massas em sequência com ionização por eletrospray
FAAS	espectrometria de absorção atômica com atomização por chama
GSH-Px	glutathione peroxidase
Hz	hidrazida
HLA	antígeno lancocitário humano
ICP-MS	espectrometria de massas com fonte de plasma indutivamente acoplado
IDF	<i>internacional diabetes federation</i>
IEF	focalização isoeletrica
K	potássio
LC	cromatografia líquida
Mg	magnésio
mg	miligrama
mL	mililitro
Mm	massa molecular
MS	espectrometria de massas
NHS	N-hidroxi-succinimidil
pI	ponto isoeletrico
PP	polipeptídeo pancreático
SDS	dodecil-sulfato de sódio

SDS PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida em uma dimensão
Spot	banda 2D de proteínas
SR-XRF	fluorescência de raios-X com radiação Síncrotron
Se	selênio
SOD	superóxido dismutase
STZ	estreptozotocina
TCA	ácido tricloroacético
Zn	zinco
Capítulos	
°C	degree celsius
%V	volume normalized
µg	microgram
µL	microliter
2D-PAGE	two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis
2D-DIGE	two-dimensional differential in-gel electrophoresis
ABC	ammonium bicarbonate
ACN	acetonitrile
AGEs	advanced glycation end-products
ANOVA	analysis of variance
B2G	blast2GO program
BCA	bichinchoninic acid assay
Ca	calcium
CEUA	ethics committee on the use of animals
CHAPS	sulphate 3-[(3-cloroaminopropil)-dimethylammonio]-1-propane
Cu	copper
Da	dalton
dL	deciliter
DM1	diabetes mellitus type 1
DMSO	dimethyl sulfoxide
DTT	1,4 Dithiothreitol
EDTA	ethylenediamine tetraacetic acid
ELISA	enzyme linked immunosorbent assays
ESI-MS/MS	electrospray ionization-tandem mass spectrometry
FA	formic acid
FDR	false discovery rate
Fe	iron
FFAs	free fatty acids
FI	functional Interaction

FAAS	furnace atomic absorption spectrometry
GFAAS	graphite furnace atomic absorption spectrometry
g	gram
h	hour
IAA	iodoacetamide
IEF	isoelectric focusing
L	liter
LC	liquid chromatography
LOQ	limit of quantification
kg	kilogram
m/m	relation mass /mass
m/v	relation mass /volume
m/z	relation mass /charge
min	minutes
Mg	magnesium
mg	milligram
mL	milliliter
mm	millimeter
mmol	milimol
Mn	manganese
MS	mass spectrometry
Ni	nickel
nL	nanoliter
nm	nanometer
NPH	neutral protamine hagedorn
pH	potential of hydrogen
pI	isoelectric point
PCA	principal component analysis
ROS	reactive oxygen species
SDC	sodium deoxycholate
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
Se	selenium
STZ	streptozotocin
TCA	trichloroacetic acid
TCEP	tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
UniProt	universal protein resource
VLDL	very low density lipoproteins

V	volt
Vh	volt-hour
Z	charge
Zn	zinc

RESUMO

APLICAÇÃO DE FERRAMENTAS PROTEÔMICAS E METALOPROTEÔMICAS NA CARACTERIZAÇÃO DE BIOMARCADORES PLASMÁTICOS E HEPÁTICOS DE RATOS SUBMETIDOS AO DIABETES TIPO 1

Diabetes mellitus tipo 1 é caracterizado pelo aumento significativo de glicose circulante no sangue, resultado da deficiência na secreção e/ou ação de insulina. O quadro hiperglicêmico, quando cronicamente instalado, leva a anormalidades no metabolismo de lipídios, proteínas e carboidratos, além de alterar o balanço entre pró-oxidantes e antioxidantes. É um importante problema de saúde pública, pois compromete a qualidade de vida e sobrevida dos indivíduos, além de envolver elevados custos no seu tratamento. Quando se consegue identificar os fatores determinantes para o desenvolvimento do diabetes, novas estratégias de prevenção e tratamento são necessárias. Nesse contexto, as proteínas e os minerais apresentam fundamental importância como componentes estruturais e funcionais dos seres vivos. Estudos proteômicos e metaloproteômicos, auxiliam na compreensão da variabilidade do diabetes, contribuindo assim na elucidação dos aspectos fisiológicos e funcionais das biomoléculas presentes em amostras biológicas, como plasma e tecido animal, além disso, a possível identificação de biomarcadores relacionados ao desenvolvimento de doenças crônicas degenerativas, como o diabetes. O objetivo geral do trabalho foi utilizar ferramentas proteômicas e metaloproteômicas na identificação de possíveis biomarcadores presentes no plasma e fígado de ratos diabéticos tipo 1 induzido experimentalmente com estreptozotocina. Foram utilizados 24 ratos *Wistar*, distribuídos em 3 grupos experimentais ($n= 8$): C (controle); DM1 (diabéticos tipo 1); DM1 + I (diabéticos tipo 1, tratadas com insulina). O diabetes mellitus tipo 1 foi induzido com estreptozotocina (60mg/kg, i.p., dose única) e os animais do grupo DM1 + I receberam reposição insulínica (Humulin N100^{UI} Protamina Neutra de Hagedorn - NPH, marca Lilly), com dose inicial de 3U/animal (administrada diariamente, via subcutânea, período vespertino) e de acordo com os valores obtidos de glicemia a dose inicial foi reajustada/mantida para que se atingissem os níveis séricos de euglicemia. No plasma, foi realizado estudo metaloproteômico para as proteínas que apresentaram diferença de expressão entre os grupos experimentais, utilizando-se a 2D-PAGE no processo de fracionamento de proteínas das amostras de plasma, GFAAS e FAAS na determinação quantitativa de Cu, Mg, Se e Zn nos *spots* que apresentaram diferença de expressão e ESI/MS-MS na caracterização dessas proteínas. Trinta e cinco proteínas apresentaram diferença de

expressão no plasma, indicando a alpha-1-macroglobulina e haptoglobulina como possíveis biomarcadoras do diabetes tipo 1 controlado (tratado com insulina); e as proteínas 2'-desoxinucleósido-5'-fosfato de N-hidrolase 1, proteína transmembranar 1, soro amilóide P-componente, vitamina D de ligação e biliverdina como possíveis candidatas a biomarcadoras do diabetes tipo 1 não controlado. Já a quantificação de Cu, Mg, Se e Zn nos *spots* revelaram como esses minerais poderiam estar ligados nessas proteínas e como estariam envolvidos na expressão proteica, progressão e complicações do diabetes tipo 1. No fígado, primeiramente foi realizado estudo proteômico, onde as proteínas foram caracterizadas pela técnica de *gel-free* e classificadas como dependentes ou independentes de insulina (tratamento), em relação aos dados obtidos para abundância e diferença de expressão. Esse estudo identificou 305 proteínas com diferença de expressão entre os grupos experimentais, entre elas 147 foram classificadas como dependentes de insulina e 152 como independentes de insulina. O controle dos níveis de glicose sanguínea pelo tratamento com insulina, restaurou os níveis da enzima frutose-1,6 bifosfatase indicando controle da gliconeogênese, e afetou a abundância das enzimas que funcionam na desintoxicação de EROs, restaurando o equilíbrio redox e a função mitocondrial. No fígado também foi feito o estudo das proteínas diferencialmente expressas pelo Oxi-proteoma, utilizando a 2D-DIGE com os fluoróforos Cy3 e Cy-5-hidrazida no processo de fracionamento e caracterização dos *spots* proteicos por ESI-MS/MS. A identificação das proteínas carboniladas indicou que o tratamento com insulina está associado com a diminuição do estresse oxidativo por meio da regulação positiva das enzimas antioxidantes e diminuição da produção de EROs, controle das vias metabólicas envolvidas com o metabolismo de carboidratos (glicólise e gliconeogênese) e metabolismo energético. Estudo metaloproteômico também foi realizado no fígado, utilizando a 2D-PAGE no processo de fracionamento de proteínas, GFAAS e FAAS na determinação quantitativa de Cu, Mg, Se e Zn nos *spots* obtidos no fracionamento das proteína e caracterização das proteínas por ESI/MS-MS. Os resultados obtidos nesse estudo sugeriram diferentes interações entre os minerais estudados e as proteínas entre os grupos experimentais. Essas interações podem estar associadas com alterações funcionais nessas proteínas e envolvimento na progressão e complicações do diabetes tipo 1. Assim, as informações obtidas no presente trabalho fornecem subsídios técnico-científicos na área de saúde de extrema importância, possibilitando o entendimento dos dados proteômicos e metaloproteômicos gerados relacionados com suas respectivas vias metabólicas, função molecular, processo biológico e componente celular. O caráter inédito da proposta proporcionou a elucidação de aspectos fisiológicos e funcionais das biomoléculas presentes em amostras biológicas, como plasma e tecido hepático.

ABSTRACT

PROTEOMICS AND METALLOPROTEOMICS TOOLS IN THE CHARACTERIZATION OF PLASMATIC AND HEPATIC BIOMARKERS FROM RATS SUBMITTED TO DIABETES TYPE 1

Type 1 diabetes mellitus is characterized by the significant increase in circulating glucose in the blood as a result of deficiency in the secretion and/or insulin action. The hyperglycemic state, when chronically installed, leads to abnormalities in the metabolism of lipids, proteins and carbohydrates, in addition to changing the balance between pro-oxidants and antioxidants. This is an important public health problem because it affects the quality of life and the survival of individuals, often necessitating high-cost treatment. When one can identify the determining factors for the development of diabetes, new strategies for prevention and treatment are needed. In this context, our results reflect the fundamental importance of protein and minerals such as structural and functional components of living things, proteomic and metalloproteomic studies that can assist in the understanding of diabetes variability, thus helping to elucidate the physiological and functional aspects of biomolecules in biological samples such as plasma and animal tissue. In addition, the possible identification of biomarkers related to the development of chronic degenerative diseases like diabetes. The overall objective of the study was to use proteomics and metalloproteomic in identifying potential biomarkers present in the plasma and liver of diabetic rats type 1 experimentally induced with streptozotocin. The total of 24 rats, Wistar, were divided into 3 groups (n = 8): C (control); DM1 (type 1 diabetes); DM1 + I (type 1 diabetes treated with insulin). The type 1 diabetes mellitus was induced with streptozotocin (60 mg/kg, i.p., single dose) and animals of DM1 + I group received insulin replacement (Humulin N100UI Neutral Protamine Hagedorn - NPH, brand Lilly), with an initial dose of 3U/animal (daily administered subcutaneously evening period) and in accordance with the values obtained from the initial dose of glucose was readjusted/kept so that it reached serum euglycemia. In plasma was performed metalloproteomic study for proteins that showed differences in expression between the experimental groups, 2D-PAGE was used in protein fractionation process of plasma samples, GFAAS and FAAS for quantitative determination of Cu, Mg, Se and Zn in the spots that showed differences of expression and the proteins were characterized by ESI/MS-MS. Thirty-five proteins present in the plasma had difference of expression, indicating the alpha-1-macroglobulin and haptoglobulin as potential biomarkers of type 1 diabetes controlled (insulin

treated); and 2'-deoxynucleoside 5'-phosphate N-hydrolase 1, transmembrane protein 11, serum amyloid P-component, vitamin D-binding protein and biliverdin as possible candidates for biomarkers of type 1 diabetes not controlled. The quantification of Cu, Mg, Se and Zn in spots revealed how these minerals could be linked these proteins and how they would be involved in protein expression, progression and complications of type 1 diabetes. In the liver, was first conducted the proteomic study where proteins were characterized by gel-free technique and classified as insulin dependent or independent (treatment), compared to the data obtained for abundance and difference in expression. This study identified 305 proteins with differential expression between experimental groups, among which 147 were classified as insulin-dependent and 152 as insulin-independent. The restoration of glucose levels in the blood by insulin treatment restored levels of the enzyme fructose-1,6 bisphosphatase indicating control of gluconeogenesis, and affected the abundance of enzymes that function in the detoxification of ROS, restoring redox balance and mitochondrial function. In the liver it has also been a study of the proteins differentially expressed by Oxi-proteome, using the 2D-DIGE with the fluorophores Cy3 and Cy-5-hydrazide in the fractionation process and characterization of protein spots by ESI-MS/MS. The identification of the carbonyl proteins indicated that treatment with insulin was associated with decreased oxidative stress by upregulating the antioxidant enzymes and decreased production of ROS, controlling the metabolic pathways involved in carbohydrate metabolism (glycolysis and gluconeogenesis) and energy metabolism. The metalloproteomic study was also performed on liver, using 2D-PAGE for the protein fractionation process, GFAAS and FAAS for quantitative determination of Cu, Mg, Se and Zn in the spots obtained in the fractionation of the protein and characterization of proteins by ESI/MS-MS. The results suggested different interactions between minerals and proteins between experimental groups, and may be associated with functional alterations in these proteins and involvement in progression and complications of diabetes type 1. However, the work provides technical and scientific support in extreme health importance, enabling the understanding of proteomic and metalloproteomic data generated in relation to their respective metabolic pathways, molecular function, biological process and cellular component. The unprecedented of the proposal provided the elucidation of physiological and functional aspects of biomolecules present in biological samples, such as plasma and hepatic tissue.

Introdução

1. Introdução

1.1. Diabetes mellitus tipo 1

Dados epidemiológicos indicam que a prevalência do diabetes mellitus tipo 1 (DM1) aumenta anualmente cerca de 3% em todo mundo (1). Segundo o último Atlas publicado pela *Internacional Diabetes Federation* (IDF), 79.000 crianças são acometidas pelo DM1 por ano, sendo que os Estados Unidos, Índia e Brasil são os países com as maiores estimativas de novos casos por ano (2). A frequência crescente pode não estar relacionada apenas aos fatores genéticos, a variabilidade geográfica tem influenciado na incidência do DM1. Neste sentido, um estudo publicado em 2012, relatou que ter nascido em países com alta incidência de diabetes, aumenta o risco para o desenvolvimento do DM1 em crianças originárias de países cujo fator genético é baixo (3); apontando para a importância dos fatores ambientais sobre o desenvolvimento do DM1.

A etiologia desta doença é multifatorial, e resulta da interação entre predisposição genética e fatores ambientais (1). Os genes do sistema de histocompatibilidade humano (HLA), principalmente os da classe II (DR3, DR4 e DQ) são os responsáveis por 40% do componente genético desta doença que associados aos fatores ambientais levariam ao início do desenvolvimento do DM1 (4). Estudos epidemiológicos divulgaram alguns fatores de risco como ambiente frio, alta taxa de crescimento populacional, infecções e estresse, podem acelerar o processo patológico do desenvolvimento do DM1 (1). Enquanto outros fatores de risco que podem iniciar o processo autoimune, incluem a exposição precoce às proteínas do leite de vaca, nitrosaminas ou eventos fetais precoces, tais como infecções virais (5).

DM1 é considerado uma das principais causas de elevadas taxas de mortalidade em decorrência de seus efeitos sobre os distúrbios cardiovasculares, principalmente aterosclerose, além de outras complicações, tais como retinopatias e insuficiência renal (6). Dessa forma, o DM1 passa ser um importante problema de saúde pública, pois compromete a qualidade de vida e sobrevida dos indivíduos, além de envolver elevados custos no seu tratamento (7). No Brasil, o custo médio anual com o tratamento médico direto (consultas, tratamento ambulatorial, fornecimento de insulina, medicamentos orais, glicosímetro, bomba de insulina, procedimentos médicos, hemodiálise e hospitalizações) do DM1 por paciente é de 1.466,36; 1.252,83; 1.148,09 e 1.396,30 dólares nas regiões sudeste, sul, norte/nordeste e centro-oeste, respectivamente (7); totalizando um custo anual de aproximadamente 4 milhões de dólares (8).

Sabe-se que o pâncreas, especialmente as ilhotas de Langerhans, é o órgão diretamente implicado na causa do DM1 (9). As ilhotas pancreáticas são constituídas por cinco tipos de células: alfa (α), beta (β), delta (δ), célula que produz o polipeptídeo pancreático (PP) e células G. Em ação conjunta secretam mais de 20 hormônios, sendo o glucagon, a insulina, a somatostatina e o polipeptídeo pancreático os principais; em destaque para as células β que são responsáveis pela síntese e secreção de insulina (9).

A secreção de insulina é desencadeada pelo aumento dos níveis glicêmicos e concomitante aumento dos níveis intracelulares de ATP, que levam ao fechamento dos canais de potássio (K), dependentes de ATP, com consequente diminuição da entrada de K resultando em despolarização das células β -pancreáticas e abertura dos canais de cálcio (Ca). O aumento do Ca intracelular, por sua vez desencadeia a secreção desse hormônio (10).

Enquanto a ação da insulina é baseada em seus efeitos fisiológicos que são exercidos através da fosforilação de proteínas (mecanismo que ativa segundos mensageiros e modula as respostas biológicas), que aumenta o transporte de glicose e regulação de vias enzimáticas (11,12). A insulina é responsável pela regulação dos níveis glicêmicos, e utilização da glicose pelos tecidos periféricos e hepático, diminuindo a concentração de glicose no sangue através da inibição da produção hepática, captação e metabolização da glicose pelo músculo e tecido adiposo (13). Portanto, qualquer defeito na ação ou secreção de insulina resultará em aumento dos níveis glicêmicos e diminuição da captação da glicose pelos tecidos periféricos (13).

DM1 é caracterizado pelo aumento significativo de glicose circulante no sangue, resultado da deficiência na secreção e/ou ação de insulina (14). O quadro hiperglicêmico, quando cronicamente instalado, leva a anormalidades no metabolismo de lipídios, proteínas e carboidratos, além de alterar o balanço entre pró-oxidantes e antioxidantes (14,15).

A explicação viável para a ocorrência dessas anormalidades metabólicas é que, o papel anabólico da insulina está comprometido e, na maioria das vezes, o glucagon opõe-se ao efeito da insulina sobre o fígado, estimulando a glicogenólise e a gliconeogênese, porém com efeito reduzido sobre a utilização periférica da glicose (16). Assim, há aumento na produção hepática de glicose e baixa captação pelos tecidos periféricos, além de diminuir a conversão de glicose em glicogênio pelo fígado, e isto resulta em acentuada hiperglicemia. A cetoacidose resulta do aumento da taxa lipolítica no tecido adiposo e, consequentemente maiores concentrações de ácidos graxos livres (AGL) no plasma, que servem como substratos para síntese de corpos cetônicos (17). A hipertrigliceridemia é devido à maior produção de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), através da síntese de triacilgliceróis promovida pelos AGL que derivam do

tecido adiposo (18). Além do fato, nos indivíduos diabéticos, ocorre menor degradação de lipoproteínas pela menor atividade da enzima lipase (insulina estimula síntese e ação desta enzima) (19). Ainda, a inibição da proteólise e a maior captação de aminoácidos estimulada pela insulina estão comprometidas no diabetes, resultando no aumento das concentrações plasmáticas de dois importantes aminoácidos, alanina e glutamina, que são utilizados como substratos para a gliconeogênese hepática e renal, respectivamente (13).

Evidências demonstram que o DM1 está associado à produção aumentada de radicais livres derivados do oxigênio molecular, denominadas de espécies reativas de oxigênio (ERO) (20). A primeira linha de defesa contra o dano oxidativo são os antioxidantes endógenos enzimáticos, como as metaloproteínas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GSH-Px) (21,22). Há também os antioxidantes não enzimáticos, como os lipossolúveis (carotenos, tocoferóis, quinonas e bilirrubinas) e os hidrossolúveis (ácido ascórbico, ácido úrico e proteínas ligadas a metais) (21,22).

O estresse oxidativo (EO) é estabelecido pelo desequilíbrio entre a produção de ERO e a capacidade antioxidante endógena e o seu papel como determinante principal do início e da progressão das complicações associadas ao DM1 (23). A disfunção endotelial tem sido observada no DM1 mesmo quando a normoglicemia é alcançada, sugerindo que o estresse oxidativo tenha papel central na patogênese das complicações do DM1 (23).

Modificações oxidativas nas proteínas podem causar mudanças estruturais, perda parcial ou total de sua função e o dano oxidativo às proteínas tem um importante papel em várias doenças (24). Estudos estão sendo desenvolvidos para entender como as ERO são capazes de mediar a oxidação de proteínas em diferentes doenças (25). O tipo mais comum de oxidação é a carbonilação, que resulta na formação de grupos carbonil reativos (aldeídos) que podem ser introduzidos nas proteínas em diferentes sítios e mecanismos, causando danos irreversíveis e irreparáveis às proteínas (12).

Neste sentido, a fim de se compreender os mecanismos da patogênese e complicações do DM1, modelos animais têm sido extensivamente utilizados. Métodos eficientes para indução do diabetes experimental, tais como, a administração de agentes químicos β -citotóxicos como a estreptozotocina (STZ) consiste numa maneira eficaz para promover o DM1 em animais (26). A STZ é um antibiótico, de natureza glicosamina-nitrosuréia, com propriedades tóxicas, isolada de *Streptomyces achromogenes* e é captada pelas células β - pancreáticas através de transportadores de glicose GLUT-2 (27). Sugere-se que a STZ atue estimulando a produção de ERO, com elevação na peroxidação lipídica e diminuição da atividade das enzimas (27). Além disso, um

dos principais efeitos tóxicos da STZ envolve a alteração da estrutura do DNA, o qual é fragmentado pelas ERO, comprometendo, desta forma, a biossíntese e secreção de insulina (26,27).

Quando se consegue identificar os fatores determinantes para o desenvolvimento do diabetes, novas estratégias de prevenção e tratamento são necessárias. Nesse contexto, insere-se a fundamental importância das proteínas e minerais como componentes estruturais e funcionais dos seres vivos, a proteômica e metaloproteômica, áreas de estudo propostas recentemente, permitem a integração de estudos tradicionalmente analíticos com estudos inorgânicos e bioquímicos. E podem ser utilizadas como uma metodologia robusta para auxiliar na compreensão da variabilidade do diabetes, contribuindo assim na elucidação dos aspectos fisiológicos e funcionais das biomoléculas presentes em amostras biológicas, como plasma e tecido animal. Dessa forma, estudos proteômicos e metaloproteômicos permitem estudar proteínas e o envolvimento dessas biomoléculas em estados patológicos em larga escala e, além disso, a possível identificação de biomarcadores relacionados ao desenvolvimento de doenças crônicas degenerativas, como o diabetes.

1.2. Biomarcadores

A interação entre um agente causador e o organismo pode alterar diversos parâmetros biológicos. Estudos sobre biomarcadores envolvem a comparação do padrão de proteínas presentes em uma amostra saudável com o de uma amostra afetada, isto porque as proteínas desempenham papéis fundamentais nos sistemas biológicos (atividades específicas, associação com outras biomoléculas, seus níveis de expressão são essenciais para o desempenho ideal das funções celulares) (28). Uma vez que diferenças não só nos níveis de expressão, mas também na estrutura proteica geralmente indicam um quadro patológico, as proteínas são moléculas de grande interesse na busca por biomarcadores confiáveis (28).

Biomarcadores são relacionados com uma característica que é medida e avaliada como indicador de um processo biológico normal, patológico ou respostas farmacológicas a uma intervenção terapêutica (29). Contudo, estudos envolvendo biomarcadores são de extrema importância, pois auxiliam na detecção precoce de doenças, bem como a monitorá-las perante um tratamento (28).

O plasma é a amostra mais variada do proteoma presente no corpo, sendo que o perfil de proteínas pode variar com as condições fisiológicas e patológicas (6). Os objetivos da utilização do plasma para a investigação de biomarcadores é a eliminação da necessidade de biópsia,

diagnóstico de doenças específicas (utilizando proteínas como biomarcadores), compreensão da patogênese da doença, e monitoramento do progresso da intervenção terapêutica (6).

O fígado pode ser considerado como a maior glândula do organismo, cumpre importantes e complexas funções (30). Entre as funções hepáticas fundamentais estão: formação e excreção de bile, síntese de fatores de coagulação, armazenamento de vitaminas, estocagem de minerais, controle da glicemia pela glicogenólise e gliconeogênese, síntese de proteínas, formação de corpos cetônicos, participação no metabolismo de lipoproteínas e do colesterol, transformação e catabolismo de hormônios, e transformação e excreção de drogas (31). No DM1, o fígado pode desenvolver anormalidades estruturais e/ou funcionais que podem perturbar qualquer um destes processos, particularmente a regulação do metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas (32).

Estudos proteômicos e metaloproteômicos investigam a presença de biomarcadores relacionados com a comparação do padrão de proteínas presentes em uma amostra saudável com o de uma amostra afetada, podendo levar a compreensão e prevenção das complicações primárias e secundárias de certas patologias como no caso do DM1 e, conseqüentemente, diminuir a gravidade da doença.

1.3. Proteômica

Uma análise abrangente em alta-escala das proteínas é o objetivo da ciência do proteoma, a proteômica. Sua área de atuação é ampla; e engloba a identificação e quantificação de proteínas nas células, tecidos e fluidos biológicos; análise de mudanças na expressão das proteínas; caracterização de modificações pós-traducionais; e estudos de interações proteína-proteína (33).

As técnicas mais empregadas para o estudo proteômico na etapa de fracionamento/purificação das biomoléculas são: a eletroforese em gel de poliacrilamida em uma ou duas dimensões (PAGE, 2D-PAGE) e a cromatografia líquida (LC) multidimensionais.

1.3.1. Métodos para o estudo proteômico

O'Farrell introduziu em 1995 a eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D-PAGE) para separar proteínas celulares sob condições desnaturantes e permitiu a resolução de centenas de proteínas (34). A técnica por 2D-PAGE resulta da combinação da focalização isoeletrica e da eletroforese em gel de poliacrilamida. Na primeira etapa as proteínas são separadas de acordo com seu ponto isoeletrico (pI), e na segunda etapa de acordo com suas massas moleculares (Mm) (35). Contudo a 2D-PAGE consiste em 5 etapas principais: preparo da amostra, primeira dimensão, segunda dimensão, detecção das proteínas, digitalização e tratamento das imagens (36).

O preparo da amostra é uma etapa essencial no processo de separação das proteínas, e este deve ser o mais simples possível e modificações na proteína devem ser evitadas (37). O melhor método de extração, precipitação e solubilização das proteínas varia de amostra para amostra, e cada caso particular deve ser analisado (36). Apesar disso, as proteínas da amostra precisam ser desnaturadas, desagregadas, reduzidas e solubilizadas para que atinjam um completo rompimento das interações molares e garantam que cada *spot* presente no gel represente uma proteína individual (38).

Para amostras biológicas como tecidos (como por exemplo o tecido hepático), devemos romper as células do material biológico, o rompimento celular pode ser de dois tipos: mecânico (maceração ou sonicação) ou químico (enzimático ou na presença de detergentes), esses processos são feitos a fim de se extrair as proteínas (39). O rompimento deve ser feito rapidamente e em baixas temperaturas, visto que as proteínas ficam expostas a muitos agentes que podem danificá-las de maneira irreversível (40). Além disso, alguns compostos interferentes (proteases, sais, lipídeos, ácidos nucleicos, polissacarídeos, pigmentos fenólicos e/ou proteínas muito abundantes), afetam a solubilização e o processo eletroforético, portanto devem ser removidos ou inativados durante ou após o rompimento celular, e são separados seletivamente por meio do processo de precipitação das proteínas (37). A precipitação com solução de acetato de amônio em metanol, acetona ou solução de ácido tricloroacético (TCA) em acetona, geralmente são os métodos mais utilizados para esta etapa (37).

A primeira dimensão é a focalização isoeletrica (IEF). Nela, as proteínas são separadas de acordo com o seu ponto isoeletrico (pI) em fitas contendo géis com um gradiente de pH. Uma vez submetidas a um campo elétrico, as proteínas migrarão até encontrar uma faixa de pH referente ao seu ponto isoeletrico (pI) e neste ponto ficarão com carga total neutra, interrompendo a migração no gel (35,41,42). Existem diferentes faixas de pH, as faixas amplas permitem uma visão geral das proteínas expressas, porém pode ocorrer uma comigração e sobreposição das proteínas com propriedades eletroforéticas similares, uma solução para esse problema pode ser o uso de gradientes de pH mais “estreitos” (33,43).

A segunda dimensão, é a eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), as proteínas são separadas com base na sua Mm (33,43). A mobilidade das proteínas no gel é dependente do tamanho dos poros do gel e da Mm das proteínas. O percentual de acrilamida do gel é que determina o tamanho do poro, sendo assim, deve ser escolhido levando-se em consideração a faixa de Mm das proteínas a serem identificadas, ou seja se o objetivo é identificar proteínas com alta Mm, um gel com concentração mais baixa deve ser

escolhido (por exemplo um gel de 10%), se objetivo é identificar metalotineínas deve ser utilizado um gel mais concentrado (por exemplo um gel de 15%) (44). Cada “ponto/mancha” (*spot*) visualizado no gel pode ser considerado como uma coordenada ortogonal de uma proteína que migrou especificamente em função de seu pI e sua Mm. O aparecimento ou desaparecimento de *spots* fornecem informações acerca de proteínas estágio-específicas, enquanto a intensidade dos *spots* fornece informações quantitativas a respeito da expressão diferencial de proteínas.

Geralmente o azul brilhante de Coomassie e o nitrato de prata são os mais utilizados como métodos gerais de coloração. A coloração com azul de Coomassie é menos sensível que por nitrato de prata, sendo assim, exige maior quantidade de amostra para que as proteínas sejam visualizadas. Porém o azul de Coomassie tem a vantagem de permitir melhor quantificação da abundância relativa de cada proteína (devido à reduzida gama dinâmica - gama de linearidade entre a intensidade do *spot* e concentração de proteína) em comparação com a coloração com a prata, o que garante a existência de quantidade suficiente de proteína para a sua subsequente identificação (45,46).

Após a coloração, os géis são digitalizados com o auxílio de um *scanner* específico e registra-se a intensidade de cada *spot* sob a forma de imagem. A análise das imagens dos géis por um *software* permite saber o número de *spots* presentes no gel, valores de pI e Mm, e é fundamental para a comparação das diferenças nas expressões das proteínas geradas por múltiplas corridas eletroforéticas. Proteínas podem ser quantificadas e os *spots* em múltiplos géis podem ser combinados e comparados; pode ser feita análise estatística em grupos de *spots* em conjuntos de géis, e variações, diferenças e similaridades podem ser avaliadas (42).

A identificação de diferenças estatisticamente significativas entre os géis de 2D-PAGE exige a corrida e análise de um grande número de géis dentro dos mesmos grupos experimentais, e entre os grupos experimentais que se deseja estudar, porém pode ocorrer diminuição da reprodutibilidade na comparação dos proteomas, relacionado com a variação no preparo de amostras e corridas eletroforética (47).

Neste sentido, uma forma eficaz para eliminar as possíveis variações entre os géis, é a utilização da técnica de eletroforese em gel diferencial (2D-DIGE), a qual permite a análise de até três grupos experimentais em um único gel, sendo um padrão interno comum a todos os géis, e duas amostras referentes a grupos experimentais distintos que são marcadas com diferentes fluoróforos (48). A 2D-DIGE utiliza a marcação das proteínas com corantes fluorescentes conhecidos como *CyDyes* (sendo eles: Cy2, Cy3 e Cy5) antes da IEF (49). Estes corantes possuem um grupo reativo de éster N-hidroxi-succinimidil (NHS) que se liga covalentemente aos

grupos ϵ -amino dos resíduos de lisina nas proteínas (49). As concentrações de corante são mantidas baixas, para que aproximadamente uma molécula de corante seja adicionado por proteína (50).

Outro método utilizado envolvendo a 2D-DIGE, para o estudo comparativo de proteínas carboniladas é o Oxi-DIGE, que está relacionado diretamente ao estresse oxidativo (51). Nesse caso, não é utilizado o éster de NHS, mas sim corantes derivados de hidrazina (Cy3- e Cy5-Hz) que marcam aldeídos de proteínas que são induzidos oxidativamente nas cadeias laterais de resíduos de lisina ou argininas das proteínas (51,52). Esse método proporciona uma melhora significativa em termos de reprodutibilidade para a análise de proteínas carboniladas, que é essencial para a identificação robusta dessa modificação, e pode ser aplicado para a identificação de proteínas carboniladas em qualquer amostra biológica (53).

No momento os esforços têm sido focados em abordagens alternativas para o estudo proteômico, como a proteômica “livre de gel” (*gel-free*), também conhecido como *shotgun* (estratégia *bottom-up*), onde frações peptídicas complexas que são geradas após a digestão da proteína são reveladas, e as vantagens da abordagem *bottom-up* são a sensibilidade e reprodutibilidade, mesmo quando trata-se de proteomas complexos como os do soro e lisados celulares (50,54).

1.4. Metaloproteoma

1.4.1. Minerais

Embora os minerais constituam uma pequena porção do tecido corporal (4%), são essenciais como componentes estruturais e funcionais em muitos processos vitais (55). No aspecto funcional, podemos destacar seu papel catalisador nos sistemas enzimáticos, por meio da ligação desses íons a substratos, orientando assim a reação e a mediação nas reações de óxido-redução devido a mudanças reversíveis no estado de oxidação do íon metálico (55).

O cobre (Cu) é necessário na respiração celular, formação óssea, função cardíaca, desenvolvimento do tecido conjuntivo, mielinização do sistema nervoso central, queratinização e pigmentação de tecidos (32,56). É componente essencial de diversas metaloenzimas incluindo a citocromo-oxidase, a lisil-oxidase, a superóxido dismutase, a dopamina- β -hidroxilase e a tirosinase (56).

Aproximadamente 30 a 40% do zinco (Zn) presente no sistema hepático é liberado para o sangue (57). As bases bioquímicas que explicam a deficiência de Zn e a inter-relação com determinadas doenças, tornam evidentes que no caso do diabetes, as alterações metabólicas

observadas nos tipos 1 e 2 poderiam ser agravadas pela deficiência deste mineral, ou por outro lado, esta doença favoreceria os distúrbios metabólicos do Zn (58). O Zn é componente de metaloenzimas e também participa de vias metabólicas que estão envolvidas na síntese proteica, metabolismo de carboidratos, lipídeos, ácidos nucleicos, embriogênese e apoptose (59). Segundo relatos da literatura, as medidas de Zn no soro e plasma em pacientes diabéticos apresentam níveis variados, podendo estar altas, baixas ou não diferentes dos grupos controles (60,61).

O selênio (Se) ocorre nos tecidos em níveis que variam com a espécie, o órgão e a condição do animal, sendo que o fígado é o tecido com maior concentração deste elemento (62). É um micronutriente essencial para a síntese de selenoproteínas que exercem papel importante na síntese, metabolismo e ação dos hormônios tireoidianos; além disso, modifica a expressão de pelo menos 30 selenoproteínas, entre as quais, as famílias das selenoenzimas glutathiona-peroxidases, tioredoxina-peroxidases e desidases tireoidianas (62).

O magnésio (Mg) está distribuído praticamente em três compartimentos: 65% na fase mineral óssea; 34% no espaço intracelular e somente 1% no fluído extra-celular (63). Dados experimentais mostram que o Mg é um cofator importante em muitas reações enzimáticas com ação expressiva no metabolismo glicídico, especialmente aquelas envolvidas em reações de fosforilação (64). É essencial praticamente em todos os sistemas de transdução de energia, na via glicolítica, no metabolismo energético oxidativo, é requerido na biossíntese tanto de ácidos graxos como de proteínas, contração muscular e atividade da ATPase (65). Além disso, o Mg participa de sistema de sinalização intracelular, em reações de fosforilação e desfosforilação que a ativa ou inibe determinadas enzimas (66).

1.4.2. Metaloproteínas

Os íons metálicos ligados às proteínas e metaloproteínas representam uma grande porção do número total de proteínas (67). As metaloproteínas são consideradas diferentes das proteínas ligadas a metais. A primeira caracteriza-se pela alta afinidade da interação metal-proteína, enquanto que na segunda a interação metal-proteína é de baixa afinidade, com isso essa ligação é facilmente quebrada (68). Fracamente ligados às proteínas, estão os íons monovalentes como o sódio e o potássio; de intensidade moderada temos o magnésio e o cálcio; e fortemente ligados estão os metais de transição, tais como o ferro, o cobre, o zinco, o manganês, o molibdênio e o cobalto; o grau de ligação tem relação direta com suas propriedades químicas (densidade, pequeno raio atômico e forças eletrostáticas) é facilitada (69,70).

A investigação das metaloproteínas e/ou proteínas metal ligante presentes no sangue e em tecidos é de fundamental importância, tanto no aspecto estrutural como funcional. A metalômica,

nova área científica proposta recentemente, permitiu a integração de estudos tradicionalmente analíticos com estudos inorgânicos e bioquímicos. O estudo da metalômica nos organismos vivos permite obter informações sobre como o íon metálico está distribuído e coordenado às proteínas, da essencialidade e/ou toxicidade, como também da concentração individual da espécie metálica, contribuindo assim na elucidação dos aspectos fisiológicos e funcionais dessas biomoléculas (67).

Nesse contexto, várias linhas de pesquisa têm surgido na literatura com diferentes termos e abordagens. Pode-se citar, por exemplo, o metaloma – que trata da caracterização do total de espécies metálicas/metalóides presentes nos organismos; a metaloproteômica – que trata da caracterização do total de elementos presentes em um local específico dos organismos (comportamento celular, proteína, metaloproteína); a metalômica – que trata de um estudo mais aprofundado do metaloma. Nesta área buscam-se informações sobre as interações e conexões funcionais de espécies metálicas/metalóides com genes, proteínas, metabólitos e outras biomoléculas do organismo e, portanto, a elucidação do papel biológico exercido pelos íons metálicos ligados às biomoléculas (71).

Os estudos metaloproteômicos são desenvolvidos utilizando: (i) a técnica de separação das proteínas (2D- PAGE); (ii) a técnica analítica para a quantificação dos elementos (espectrometria de absorção atômica - AAS); e (iii) o detector específico para moléculas (espectrometria de massas – MS) I [51-53].

1.4.3. Espectrometria de Absorção Atômica

A AAS é utilizada para determinações quantitativas tanto de elementos metálicos e semimetálicos, quanto de alguns elementos não metálicos. Além disso, pode ser aplicada a uma grande variedade de amostras, tais como, materiais biológicos (tecidos e fluídos), ambientais (águas, solos e sedimentos), alimentares, entre outras (72). Antes das amostras serem submetidas a AAS, o procedimento comumente realizado é a digestão/mineralização úmida da porção orgânica da amostra com ácidos fortes, que visa minimizar interferências na análise de amostras biológicas (como o analito estar presente em diferentes estados de oxidação, combinado com diferentes ânions ou ligados a proteínas ou outros ligantes orgânicos) (72).

A medida da absorção da intensidade da radiação eletromagnética proveniente de uma fonte de radiação primária emitida por átomos gasosos no estado fundamental é o princípio fundamental da AAS (72). Os seis principais constituintes da espectrometria de absorção atômica são: 1) a fonte de radiação; 2) o sistema de introdução de amostras; 3) o sistema de atomização; 4) o

monocromador; 5) o sistema de detecção; e 6) a leitura. Estes componentes são conectados à sistemas computadorizados para o controle do equipamento e tratamento dos dados (73).

Os tipos de atomizadores mais usados em AAS são chama (FAAS) e forno de grafite (GFAAS) (74). A GFAAS é utilizada para determinações de baixas concentrações ($\mu\text{g L}^{-1}$), é uma técnica mais sensível do que a FAAS devido a maior parte do analito ser introduzido no tubo de grafite e atomizado no caminho óptico, além de condensar a nuvem atômica mais eficientemente por ser um sistema fechado (75,76). Já a FAAS é mais utilizada para análises elementares em níveis de mg L^{-1} , e é um sistema onde a maior parte da amostra é descartada pelo dreno do nebulizador (95%) e a parte da amostra que alcança a chama é diluída pelos gases desta, diminuindo sua sensibilidade (75,76). Outra vantagem na GFAAS quando comparada com a FAAS é a pequena quantidade de amostra utilizada, da ordem de microlitros (μL) na GFAAS, enquanto que a FAAS trabalha com amostra de alguns mililitros (mL) (74).

1.5. Caracterização das proteínas - Estudos proteômicos e metaloproteômicos

MS é um instrumento que contém uma fonte de ionização, um analisador de massas - razão massa/carga (m/z) e um detector (77). Através da técnica de MS podemos avaliar a Mm dos compostos e quantificá-los, identificar compostos desconhecidos, revelar a estrutura de moléculas e determinar as modificações pós-traducionais, ou seja, aplicada à análise de biomoléculas ela fornece uma informação precisa da Mm, identifica proteínas usando a Mm de peptídeos tripticos, sequência peptídeos e identifica modificações pós-traducionais (77,78).

As proteínas a serem analisadas nos estudos proteômicos e/ou metaloproteômicos após serem devidamente extraídas e fracionadas devem passar pelo processo de “digestão” com enzimas proteolíticas, sendo a mais utilizada a enzima tripsina para produzir peptídeos (79). No caso de estudos que utilizam o fracionamento de proteínas por 2D-PAGE, a digestão em gel é aplicada, ou seja a proteína é processada e digerida enquanto está contida em um *spot* de gel de poliacrilamida (80). A tripsina cliva as ligações peptídicas de proteínas após os grupos carboxila 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 (81). Os peptídeos obtidos na etapa de digestão triptica podem então ser caracterizados utilizando-se a MS, entre elas a espectrometria de massas em sequência com ionização por eletrospray (ESI/MS-MS) é uma das mais utilizadas (81).

ESI/MS-MS é uma técnica de ionização branda que realiza a transferência de íons da solução para a fase gasosa, é extremamente útil para a análise de moléculas grandes, não-voláteis e que podem adquirir carga, como proteínas e ácidos nucleicos (82). A produção de íons pelo

processo eletrospray requer, essencialmente, dois passos: 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 (82). 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 (82). 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 (82). Como resultado final, os íons tornam-se completamente dessolvatados (82).

Referências

1. Karvonen M. Incidence and trends of childhood Type 1 diabetes worldwide 1990-1999. *Diabet Med.* 2006;23(8):857–66.
2. Patterson C, Guariguata L, Dahlquist G, Solt?sz G, Ogle G, Silink M. Diabetes in the young - a global view and worldwide estimates of numbers of children with type 1 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract.* 2014;103(2):161–75.
3. Soderstrom U, Amam J, Hjern A. Being born in Sweden increases the risk for type 1 diabetes - A study of migration of children to Sweden as a natural experiment. *Acta Paediatr.* 2012;101(1):73-7
4. Todd JA, Bell JI, McDevitt HO. HLA-DQ beta gene contributes to susceptibility and resistance to insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature.* 1987;329(6140):599–604.
5. Dahlquist G, Mustonen L. Childhood onset diabetes—time trends and climatological

- factors. *Int J Epidemiol*. 1994;23(6):1234–41.
6. Atkinson MA, Eisenbarth GS, Michels AW. Type 1 diabetes. *Lancet*. 2014;383(9911):69–82.
 7. Cobas RA, Bosi Ferraz M, Matheus ASDM, Tannus LRM, Silva ATK, de Araujo LA, et al. Heterogeneity in the costs of type 1 diabetes in a developing country: what are the determining factors? *Diabetol Metab Syndr*. 2013;5(1):83.
 8. Cobas RA, Bosi Ferraz M, de Mattos Matheus AS, Monteiro Tannus LR, Antonio Negrato C, de Araujo LA, et al. The cost of type 1 diabetes: A nationwide multicentre study in Brazil. *Bull World Health Organ*. 2013;91(6):434–40.
 9. Guyton A, Hall J. Guyton y Hall Tratado de Fisiología Médica. Vol. 12, ELSEVIER. 2010. 1092 p.
 10. Gribble FM, Reimann F. Differential selectivity of insulin secretagogues: Mechanisms, clinical implications, and drug interactions. In: *Journal of Diabetes and its Complications*. 2003. p. 11–5.
 11. Browning MD, Huganir R, Greengard P. Protein phosphorylation and neuronal function. *J Neurochem*. 1985;45(1):11–23.
 12. Nystrom FH, Quon M. Insulin signalling: Metabolic pathways and mechanisms for specificity. Vol. 11, *Cellular Signalling*. 1999. p. 563–74.
 13. Beardsall K, Yuen K, Williams R, Dunger D. Applied physiology of glucose control. *Curr Paediatr*. 2006;16(6):434–8.
 14. Sandholzer H, Frese T. *The Epidemiology of Type 1 Diabetes Mellitus*. 1th ed. 2013.
 15. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Vol. 10, *Free Radical Biology and Medicine*. 2007. 449–450 p.
 16. Barth E, Albuszies G, Baumgart K, Matejovic M, Wachter U, Vogt J, et al. Glucose metabolism and catecholamines. *Crit Care Med*. 2007;35(9 Suppl):S508–18.
 17. Newton CA, Raskin P. Diabetic ketoacidosis in type 1 and type 2 diabetes mellitus: clinical and biochemical differences. *Arch Intern Med*. 2004;164(17):1925–31. 18. Matheus ASDM, Cobas RA, Gomes MB. [Dyslipidemias in type 1 diabetes: a current approach]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2008;52(2):334–9. A
 19. Sibley SD, Palmer JP, Hirsch IB, Brunzell JD. Visceral obesity, hepatic lipase activity, and dyslipidemia in type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(0021-972X):3379–84.
 20. Bonnefont-Rousselot D. The Role of Antioxidant Micronutrients in the Prevention of

- Diabetic Complications. Vol. 3, Treatments in Endocrinology. 2004. p. 41–52.
21. Krinsky NI. Mechanism of action of biological antioxidants. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1992;200:248–54.
 22. Yamada T, Grisham MB. Role of neutrophil-derived oxidants in the pathogenesis of intestinal inflammation. *Klin Wochenschr*. 1991;69(21-23):988–94.
 23. Reis JS, Veloso CA, Mattos RT, Purish S, Nogueira-Machado JA. Oxidative stress: a review on metabolic signaling in type 1 diabetes. *Arq Bras Endocrinol Metab [Internet]*. 2008;52(7):1096–105.
 24. Stadtman ER, Berlett BS. Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. Vol. 10, *Chemical Research in Toxicology*. 1997. p. 485–94.
 25. Madian AG, Regnier FE. Proteomic identification of carbonylated proteins and their oxidation sites. *J Proteome Res*. 2010;9(8):3766–80.
 26. Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. Vol. 51, *Diabetologia*. 2008. p. 216–26.
 27. Wu KK, Huan Y. Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats. *Current Protocols in Pharmacology*. 2008.
 28. Vlahou A, Fountoulakis M. Proteomic approaches in the search for disease biomarkers. Vol. 814, *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 2005. p. 11–9.
 29. Atkinson A.J. J, Colburn WA, DeGruttola VG, DeMets DL, Downing GJ, Hoth DF, et al. Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. Vol. 69, *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 2001. p. 89–95.
 30. Meschel AL. Histologi Dasar JUNQUEIRA Teks & Atlas. In: *Histologi Dasar JUNQUEIRA Teks & Atlas*. 2012. p. 396–8.
 31. Ahmadi H, Azar ST. Liver disease and diabetes: Association, pathophysiology, and management. Vol. 104, *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2014. p. 53–62.
 32. Bechmann LP, Hannivoort RA, Gerken G, Hotamisligil GS, Trauner M, Canbay A. The interaction of hepatic lipid and glucose metabolism in liver diseases. *J Hepatol*. 2012;56(4):952–64.
 33. Beranova-Giorgianni S. Proteome analysis by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry: Strengths and limitations. Vol. 22, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. 2003. p. 273–81.
 34. O’Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem*

- [Internet]. 1975;250(10):4007–21.
35. Bezerra RQ, Martins GR, Barroso IC, Marinho RC, De Freitas Aguiar TD ávila, Da Silva Teixeira MF. Eletroforese bidimensional e espectrometria de massa como ferramentas proteômicas aplicadas à definição de marcadores proteicos associados à eficiência reprodutiva de caprinos. *Acta Vet Bras.* 2013;7(2):100–12.
 36. Rocha TL, Costa PHA, Magalhães JCC, Evaristo RGS, Vasconcelos EAR, Coutinho M V., et al. Eletroforese bidimensional e análise de proteomas. *Embrapa.* 2005;(ISSN 9192-0099):1–12.
 37. Görg A, Weiss W, Dunn MJ. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. Vol. 4, *Proteomics.* 2004. p. 3665–85.
 38. Berth M, Moser FM, Kolbe M, Bernhardt J. The state of the art in the analysis of two-dimensional gel electrophoresis images. Vol. 76, *Applied Microbiology and Biotechnology.* 2007. p. 1223–43.
 39. Flack CP, Woollen JW. Prevention of interference by dextran with biuret-type assay of serum proteins. *Clin Chem.* 1984;30(4):559–61.
 40. Choe LH, Lee KH. Quantitative and qualitative measure of intralaboratory two-dimensional protein gel reproducibility and the effects of sample preparation, sample load, and image analysis. *Electrophoresis.* 2003;24(19-20):3500–7.
 41. Issaq HJ, Veenstra TD. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE): Advances and perspectives. *Biotechniques.* 2008;44(5):697–700.
 42. Rabilloud T, Lelong C. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: A tutorial. Vol. 74, *Journal of Proteomics.* 2011. p. 1829–41.
 43. Ong SE, Pandey a. An evaluation of the use of two-dimensional gel electrophoresis in proteomics. *Biomol Eng.* 2001;18:195–205.
 44. Williams RAD. Gel electrophoresis of proteins: A practical approach. Vol. 18, *Gel electrophoresis of proteins: A practical approach.* 1986. 142-142 p.
 45. Schleicher M, Watterson DM. Analysis of differences between Coomassie blue stain and silver stain procedures in polyacrylamide gels: Conditions for the detection of calmodulin and troponin C. *Anal Biochem.* 1983;131(2):312–7.
 46. Santos PM, Teixeira MC, Sá-correia I. A Análise Proteômica Quantitativa na Revelação de Mecanismos de Resposta a stresse químico em microrganismos. *Bol Biotecnol.* 2004;6:1–17.
 47. Knowles MR, Cervino S, Skynner HA, Hunt SP, De Felipe C, Salim K, et al. Multiplex

- proteomic analysis by two-dimensional differential in-gel electrophoresis. *Proteomics*. 2003;3(7):1162–71.
48. Unlü M, Morgan ME, Minden JS. Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis*. 1997;18(11):2071–7.
 49. Alban A, David SO, Bjorkesten L, Andersson C, Sloge E, Lewis S, et al. A novel experimental design for comparative two-dimensional gel analysis: Two-dimensional difference gel electrophoresis incorporating a pooled internal standard. *Proteomics*. 2003;3(1):36–44.
 50. Abdallah C, Dumas-Gaudot E, Renaut J, Sergeant K. Gel-based and gel-free quantitative proteomics approaches at a glance. *Int J Plant Genomics*. 2012;2012.
 51. Sawada A, Ueno T, Kawashima Y, Haruta-Satoh E, Oh-Ishi M, Kodera Y, et al. Protein carbonyl detection by two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis. *J Electrophor*. 2008;52(1):9–17.
 52. Baraibar M, Ladouce R, Friguet B. Oxi-DIGE: A novel proteomic approach for detecting and quantifying carbonylated proteins. *Free Radic Biol Med*. 2014;75 Suppl 1:S23.
 53. Baraibar MA, Ladouce R, Friguet B. Proteomic quantification and identification of carbonylated proteins upon oxidative stress and during cellular aging. *J Proteomics*. 2013;92:63–70.
 54. Barbosa EB, Vidotto A, Polachini GM, Henrique T, Marqui ABT De, Tajara EH. Proteômica: metodologias e aplicações no estudo de doenças humanas. *Rev Assoc Med Bras*. 2012;58(3):366–75.
 55. Bresolin ITL, Miranda EA, Bueno SMA. Cromatografia de Afinidade Por íons metálicos imobilizados (IMAC) de biomoléculas: Aspectos fundamentais e aplicações tecnológicas. *Quim Nova*. 2009;32(5):1288–96.
 56. McDowell LR. Minerals in animal and human nutrition. *Minerals in animal and human nutrition*. 2003.
 57. Bettger WJ, O'Dell BL. Physiological roles of zinc in the plasma membrane of mammalian cells. *J Nutr Biochem*. 1993;4(4):194–207.
 58. Hambidge KM, Miller L V., Westcott JE, Sheng X, Krebs NF. Zinc bioavailability and homeostasis. Vol. 91, *American Journal of Clinical Nutrition*. 2010.
 59. Chasapis CT, Spiliopoulou CA, Loutsidou AC, Stefanidou ME. Zinc and human health: An update. *Arch of Toxicol*. 2012;86:521–34.
 60. Pidduck HG, Sc B, Wren PJJ, Evans DAP, Ph D, Sc M. Hyperzincuria of Diabetes Mellitus

- and Possible Genetical Implications of This Observation. *Diabetes*. 1970;19(4):240-7.
61. Al-Maroof RA, Al-Sharbatti SS. Serum zinc levels in diabetic patients and effect of zinc supplementation on glycemic control of type 2 diabetics. *Saudi Med J*. 2006;27(3):344–50.
 62. Volp ACP, Bressan J, Hermsdorff HHM, Zulet MÁ, Martínez JA. Efeitos antioxidantes do selênio e seu elo com a inflamação e síndrome metabólica. *Rev Nutr*. 2010;23(4):581–90.
 63. Barbagallo M, Dominguez LJ, Galioto A, Ferlisi A, Cani C, Malfa L, et al. Role of magnesium in insulin action, diabetes and cardio-metabolic syndrome X. *Mol Aspects Med*. 2003;24(1-3):39–52.
 64. Saris NEL, Mervaala E, Karppanen H, Khawaja JA, Lewenstam A. Magnesium: An update on physiological, clinical and analytical aspects. *Clin Chim Acta*. 2000;294(1-2):1–26.
 65. Dacey MJ. Hypomagnesemic disorders. *Crit Care Clin*. 2001;17(1):155–73.
 66. Bo S, Pisu E. Role of dietary magnesium in cardiovascular disease prevention, insulin sensitivity and diabetes. *Curr Opin Lipidol*. 2008;19(1):50–6.
 67. Garcia JS, De Magalhães CS, Arruda MAZ. Trends in metal-binding and metalloprotein analysis. *Talanta*. 2006;69(1):1–15.
 68. 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 sulphate polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Chim Acta*. 2003;485(1):131–7.
 69. Arnesano F, Banci L, Bertini I, Capozzi F, Ciofi-Baffoni S, Ciurli S, et al. An Italian contribution to structural genomics: Understanding metalloproteins. *Coord Chem Rev*. 2006;250(11-12):1419–50.
 70. D. Voet JGV& CWP. Principles of Biochemistry. John Wiley Sons, Inc [Internet]. 2010;4:50–2.
 71. Mounicou S, Szpunar J, Lobinski R. Metallomics: the concept and methodology. *Chem Soc Rev*. 2009;38(September 2008):1119–38.
 72. Marshall WD. Atomic absorption, emission and fluorescence spectrometry: principles and applications. *Tech Instrum Anal Chem*. 1997;18:141–78.
 73. Jenniss S, Katz S, Lynch R. Applications of Atomic Spectrometry to Regulatory Compliance Monitoring. Ed. 2. New York: Wiley-VCH; 1997.
 74. Garcia R, Baez AP. Atomic absorption spectrometry (AAS). In: *At Absorpt Spectrosc*.

2012. p. 1–12.
75. Hill SJ, Fisher AS. Atomic Absorption, Methods and Instrumentation. In: Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry. 2010. p. 46–53.
 76. Boss CB, Fredeen KJ. Concepts, Instrumentation and Techniques in Atomic Absorption Spectrophotometry. North. 1997;2–12.
 77. Moraes MCB, Do Lago CL. Espectrometria de massas com ionização por “electrospray” aplicada ao estudo de espécies inorgânicas e organometálicas. Quim Nova. 2003;26(4):556–63.
 78. Chiaradia MC, Collins CH, Jardim ICSF. O estado da arte da cromatografia associada de espectrometria de massas acoplada: espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. Quim Nova. 2008;31(3):623–36.
 79. Cunsolo V, Muccilli V, Saletti R, Foti S. Applications of mass spectrometry techniques in the investigation of milk proteome. Eur J Mass Spectrom. 2011;17(4):305–20.
 80. Shevchenko A, Tomas H, Havlis J, Olsen J V, Mann M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. Nat Protoc. 2006;1(6):2856–60.
 81. Nagele E, Martin V, Horth P, Vad C. 2D-LC/MS techniques for the identification of proteins in highly complex mixtures. Expert Rev Proteomics. 2014;1(1):37–46.
 82. Gross JH. Mass spectrometry - A textbook. Anal Bioanal Chem. 2011;401:3033-34.

Conclusões

Conclusões

- 35 proteínas apresentaram diferença de expressão no plasma, indicando a alpha-1-macroglobulina e haptoglobulina como possíveis biomarcadoras do DM1 controlado (tratado com insulina); e as proteínas 2'-desoxinucleósido-5'-fosfato de N-hidrolase 1, proteína transmembranar 1, soro amilóide P-componente, vitamina D de ligação e biliverdina como possíveis candidatas a biomarcadoras do diabetes tipo 1 não controlado.
- O estudo metaloproteômico no plasma revelou diferentes interações entre as proteínas com o cobre, magnésio, selênio e zinco nos grupos experimentais; sugerindo como esses minerais poderiam estar ligados nas proteínas que apresentaram diferença de expressão e estarem envolvidos na expressão proteica, progressão e complicações do diabetes tipo 1.
- O tratamento com insulina em animais diabéticos foi capaz de restaurar os níveis da enzima frutose-1,6 bifosfatase indicando controle na produção de glicose hepática pela possível inibição da gliconeogênese nesses animais. Enquanto a piruvato carboxilase foi classificada como independente de insulina, como essa enzima está envolvida nas etapas iniciais da gliconeogênese, esta resposta pode ter relação com a geração de oxalatoacetato, mantendo, desta forma a concentração dos intermediários do ciclo do ácido cítrico.
- A maioria das enzimas do ciclo do ácido cítrico foram classificadas como dependentes de insulina, apresentando uma resposta anapleurótica para manter os intermediários do ciclo ácido cítrico à resposta insulínica.
- A restauração da glicemia, pelo tratamento com insulina afetou a abundância das enzimas que funcionam na desintoxicação de EROs, restabelecendo o equilíbrio redox e a função mitocondrial.
- A carbonilação de proteínas está diretamente associada a danos proteicos sob condições de estresse oxidativo. A análise do Oxi-proteoma identificou 105 proteínas com diferença de expressão que foram classificadas como dependentes de insulina e 62 como independentes de insulina; essas proteínas carboniladas podem estar relacionadas às disfunções celulares descritas na progressão do DM1.
- A identificação das proteínas carboniladas indicou potenciais biomarcadores pré-sintomáticos para o DM1. O tratamento com insulina atenuou o estresse oxidativo por favorecer as enzimas antioxidantes e diminuir a produção de EROs, controlou o metabolismo de carboidratos e metabolismo energético.

- O estudo metaloproteômico no fígado sugeriu diferentes interações entre os minerais (cobre, magnésio, selênio e zinco) e as proteínas entre os grupos experimentais, podendo associar com as alterações funcionais dessas proteínas e envolvimento na progressão e complicações do DM1.