

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 nº 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 hidroxicloretos 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 hidroxicloreto) 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 hidroxicloreto. 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, hidroxicloretos, 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 isoelétrica (*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 (<i>shotgun</i>). Fonte: Passaglia e Zaha (2014).....	31

CAPÍTULO 2

Figura 1. Representação dos géis de poliacrilamida obtidos por <i>2D-PAGE</i> do <i>pool</i> 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 <i>spots</i> proteicos associados ao cobre e manganês (<i>2D-PAGE/GFAAS</i>), utilizando o banco de dados online <i>String</i>	57
Figura S1. Representação dos géis de poliacrilamida obtidos por <i>2D-PAGE</i> do <i>pool</i> 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 <i>spots</i> proteicos associados ao cobre e manganês (<i>2D-PAGE/GFAAS</i>) utilizando o <i>software</i> Blast2GO	71

CAPÍTULO 3

Figura 1. Representação dos géis de poliacrilamida obtidos por <i>2D-PAGE</i> do <i>pool</i> 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 <i>spots</i> 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</i> Cytoscape 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>	<i>39</i>
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 (2D-PAGE) 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; APPLEGATE, 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 isoeletrico (pI) por meio da focalização isoeletrica (*IEF*), processo denominado de primeira dimensão. Na focalização isoeletrica 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).

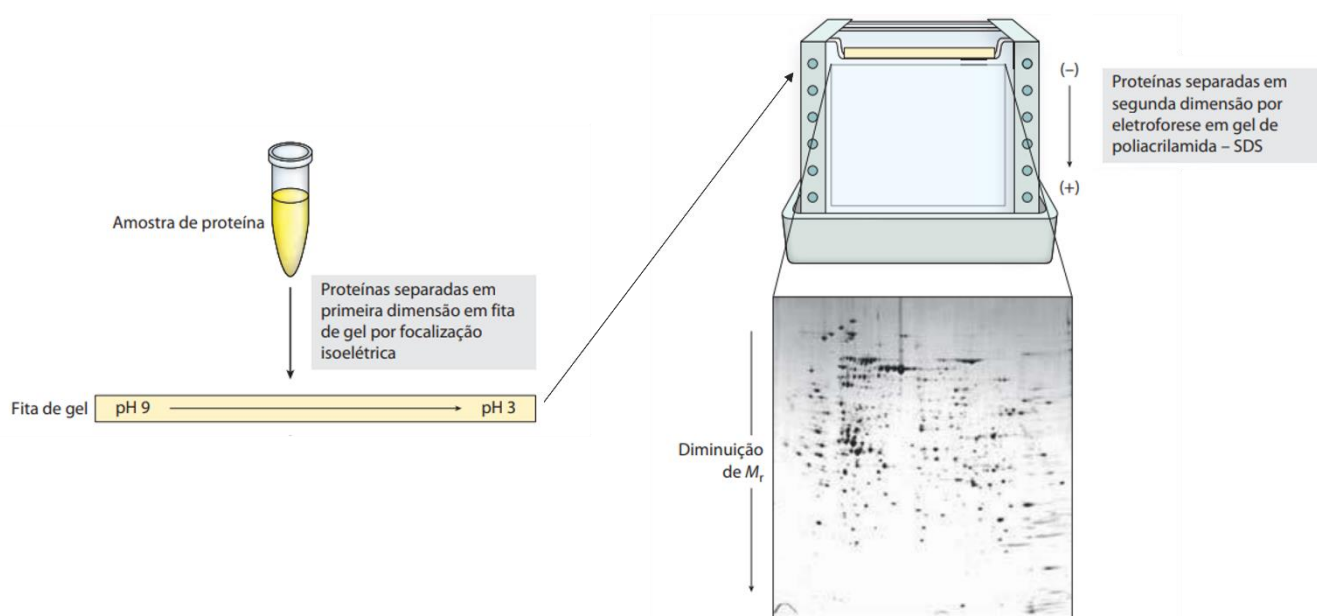


Figura 1 - Representação esquemática da eletroforese bidimensional. Adaptado de Nelson e Cox (2019).

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).

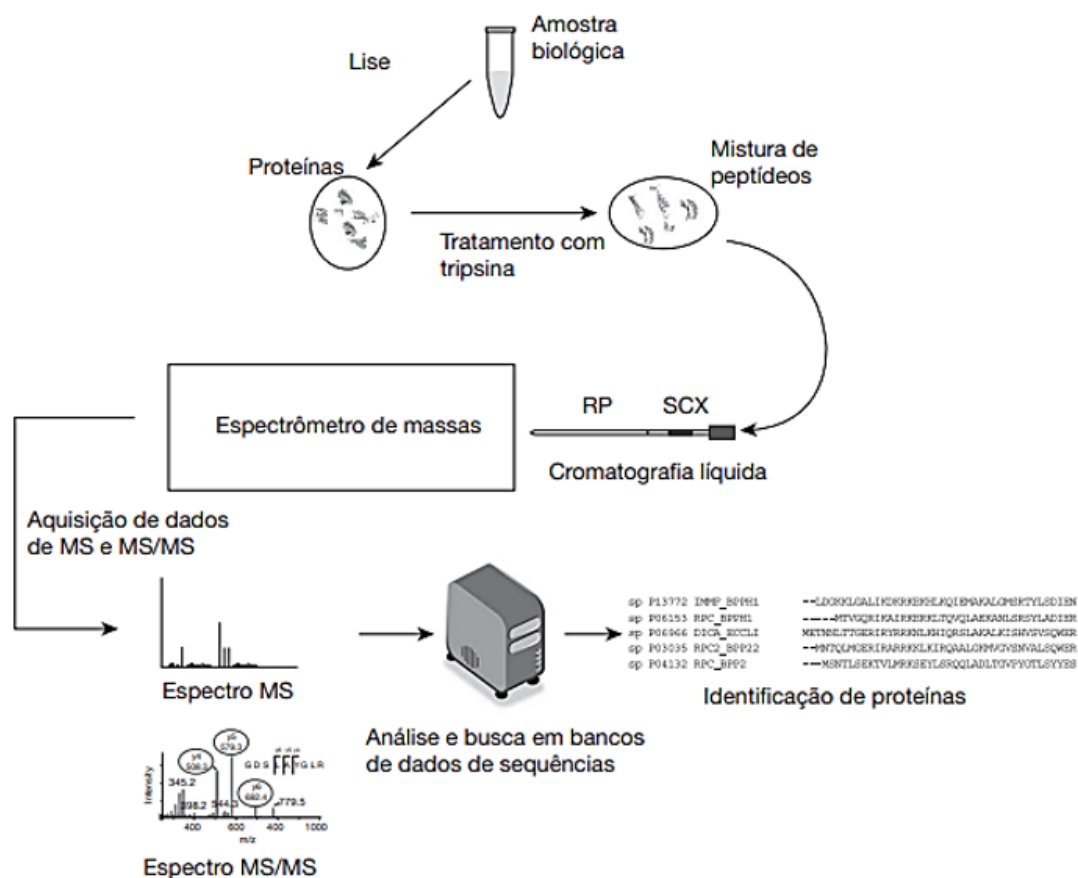


Figura 2 - Representação esquemática da proteômica livre de gel (*shotgun*). Fonte: Passaglia e Zaha (2014).

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.; BHIH, 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. Simonkolleite, $\text{Zn}_5(\text{OH})_8\text{Cl}_2(\text{H}_2\text{O})$, a decorated interrupted-sheet structure of the form $[\text{m}^2]_4$. **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.

OSKOEIAN, 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 biologia molecular. In: ZAHA, A.; FERREIRA, H. B.; PASSAGLIA, L. M. P. (Eds.). **Biologia 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.

CAPÍTULO 2

Abordagem metaloproteômica do tecido hepático de frangos de corte suplementados com diferentes fontes e níveis de cobre e manganês

RESUMO

O objetivo com o estudo foi avaliar os efeitos da suplementação de duas fontes (sulfato e hidroxiclreto) e dois níveis de cobre (15 e 150 mg kg⁻¹) e manganês (80 e 120 mg kg⁻¹) sobre o proteoma hepático de frangos de corte utilizando ferramentas metaloproteômicas. Para o estudo, foram avaliados quatro grupos experimentais: 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). A partir das amostras de fígado foram feitos quatro *pools*, sendo considerado 10 aves/tratamento. O fracionamento do proteoma foi realizado por eletroforese bidimensional (2D-PAGE). Por meio dos géis obtidos foi realizada a análise de expressão dos *spots* proteicos utilizando o *software ImageMaster Platinum v.7.0*. Os *spots* diferencialmente expressos foram extraídos dos géis e digeridos para mapeamento do Cu e Mn por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS). A determinação das concentrações de Cu e Mn nas amostras de tecido hepático e *pellets* proteicos foi realizada por espectrometria de absorção atômica em chama (FAAS). As proteínas dos *spots* proteicos associados ao Cu e Mn foram caracterizadas por espectrometria de massas em sequência acoplada com cromatografia líquida (LC-MS/MS) e identificadas utilizando o banco de dados *UniProt*. O estudo de bioinformática foi realizado utilizando os *softwares Blast2GO, String e Cytoscape*. As concentrações de Cu e Mn no fígado, *pellets* e *spots* proteicos sugerem maior biodisponibilidade das fontes hidroxicloretos em relação aos sulfatos. Foram identificados 19 *spots* associados ao Cu, 10 *spots* associados ao Mn, e 5 *spots* associados ao Cu e Mn simultaneamente. A análise proteômica revelou a indução das proteínas de choque térmico (HSPs) e das glutathionas-s-transferases (GSTs) em frangos de corte suplementados com níveis mais altos de cobre e manganês.

Palavras-chave: 2D-PAGE, biodisponibilidade mineral, hidroxicloretos, sulfatos

1. Introdução

Os microminerais são indispensáveis para o crescimento, saúde e desempenho das aves, uma vez que são fundamentais em vários processos metabólicos (Bao et al., 2007; Lu et al., 2020). O cobre atua como cofator de diversas enzimas importantes como a CuZn-superóxido dismutase (CuZnSOD), citocromo-c-oxidase (COX) e ceruloplasmina, o que o torna essencial na eliminação de radicais livres, respiração celular e mobilização de ferro (Hu et al., 2022). Da mesma forma, o manganês atua como componente de metaloproteínas e cofator enzimático, sendo fundamental na defesa antioxidante, formação óssea e metabolismo de carboidratos, aminoácidos e colesterol (Geng et al., 2022; Jasek et al., 2019; Meng et al., 2021).

As concentrações de cobre e manganês nos ingredientes comumente utilizados nas rações para frangos de corte são baixas e normalmente insuficientes para atender as exigências nutricionais, sendo necessário a suplementação para garantir um ótimo desenvolvimento e desempenho produtivo (Hu et al., 2022; Liao et al., 2019). Fontes de minerais inorgânicos como sulfatos e óxidos, são amplamente utilizadas devido à alta disponibilidade comercial e baixo preço (Lu et al., 2020; Meng et al., 2021). Porém, os sulfatos são conhecidos por apresentarem baixa biodisponibilidade em virtude da alta solubilidade em meio aquoso e das interações antagonistas com outros minerais e nutrientes da dieta. Dessa forma, é comum a indústria de rações adotar alta margem de segurança suplementando níveis que excedem as necessidades nutricionais, o que por sua vez, pode trazer malefícios tanto para os animais como para o ambiente devido ao risco de toxicidade e maior excreção mineral (Bao e Choct, 2009).

Partindo desse princípio, novas estratégias de suplementação que prometem maior biodisponibilidade mineral estão ganhando atenção na formulação de rações. Entre elas estão os hidroxicloretos, também classificados como fonte inorgânica, porém com algumas particularidades que os diferem dos sulfatos (Jasek et al., 2019). Os hidroxicloretos apresentam fortes ligações covalentes com os minerais tornando-os menos solúveis em água e, conseqüentemente, menos reativos, diminuindo dessa forma as interações indesejadas com outros constituintes da dieta (Cromwell et al., 1998). Embora essas características possam teoricamente favorecer a absorção dos minerais, estudos que exploram a funcionalidade do cobre e manganês a nível molecular são necessários para estimar de forma mais completa a biodisponibilidade de diferentes fontes.

Neste sentido ferramentas proteômicas aliadas aos métodos de quantificação de minerais podem fornecer informações relevantes sobre a incorporação do cobre e

manganês nas proteínas, bem como a identificação de proteínas responsivas a diferentes concentrações desses minerais. Além disso, a metaloproteômica pode contribuir na compreensão dos mecanismos envolvidos na toxicidade e tolerância dos minerais em frangos de corte. Portanto, o objetivo com este estudo foi avaliar o perfil diferencial das proteínas associadas ao cobre e manganês no tecido hepático de frangos de corte suplementados com duas fontes (sulfato e hidroxicloreto) e dois níveis de cobre (15 e 150 mg kg⁻¹) e manganês (80 e 120 mg kg⁻¹) utilizando estratégias metaloproteômicas.

2. Material e Métodos

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Botucatu, sob o protocolo CEUA 0191/2018.

2.1. Animais, tratamentos e instalações

Foram utilizadas amostras de tecido hepático obtidas de 40 frangos de corte machos da linhagem Cobb® 500 suplementados com duas fontes (sulfato e hidroxicloreto) e dois níveis de cobre (15 e 150 ppm) e manganês (80 e 120 ppm), totalizando quatro tratamentos:

- S15-80: 15 mg kg⁻¹ de sulfato de Cu e 80 mg kg⁻¹ de sulfato de Mn
- S150-120: 150 mg kg⁻¹ de sulfato de Cu e 120 mg kg⁻¹ de sulfato de Mn
- H15-80: 15 mg kg⁻¹ de hidroxicloreto de Cu e 80 mg kg⁻¹ de hidroxicloreto de Mn
- H150-120: 150 mg kg⁻¹ de hidroxicloreto de Cu e 120 mg kg⁻¹ de hidroxicloreto de Mn

Os níveis de 15 mg kg⁻¹ de Cu e 80 mg kg⁻¹ de Mn estão de acordo com as recomendações das Tabelas Brasileiras para Aves e Suínos (Rostagno et al., 2017), enquanto os níveis de 150 mg kg⁻¹ de Cu e 120 mg kg⁻¹ de Mn são níveis acima da recomendação. As dietas foram formuladas à base de milho e farelo de soja sendo divididas em quatro fases, conforme recomendações de Rostagno et al. (2017): pré-inicial (1-7 dias); inicial (8-21 dias); crescimento (22-35 dias); e final (35-42 dias). Todas as aves receberam ração e água *ad libitum* durante todo o período experimental.

As aves foram alojadas em boxes de 2,0 m² equipados com comedouro tubular e bebedouro tipo *nipple*, sendo forrados com cama de maravalha reutilizada durante o período de 1 a 43 dias de idade. O aquecimento inicial foi realizado com uso de lâmpadas infravermelhas (250 watts) e ao final do 14º dia de experimento foram retiradas. O

programa de luz foi realizado via timer com lâmpadas de 20 watts conforme as recomendações da linhagem.

2.2. Coleta das amostras

Aos 43 dias de idade, os frangos foram abatidos por deslocamento cervical e posteriormente foi realizada a coleta de um fragmento do lobo direito do fígado de cada ave utilizando lâmina de aço inoxidável. Cada fragmento foi seccionado em fatias, transferidos para criotubos e então armazenados em freezer a -80°C até a utilização nos ensaios proteômicos. A partir das amostras coletadas foram feitos quatro *pools* por meio da homogeneização e maceração das amostras de fígado do mesmo grupo, correspondendo aos quatros tratamentos estudados. Foram consideradas amostras de 10 aves por tratamento.

2.3. Extração e precipitação das proteínas

Para processo de extração das proteínas do *pool* de amostras de tecido hepático, foram pesados 200 mg de cada *pool* em microtubo de 2 mL e posteriormente homogeneizados em desruptor de células OMMI – BEAD RUPTOR4 com 1000 μL de água ultrapura ($18,2\text{ M}\Omega\text{ cm}^{-1}$). Após homogeneização, as suspensões obtidas ficaram em repouso durante 5 minutos na geladeira e posteriormente centrifugadas à 9503 *g* por 15 minutos em centrífuga refrigerada (4°C) Hettich Universal 320R.

Para precipitação das proteínas, foi adicionado em microtubos de 2 mL, 200 μL de sobrenadante (extrato de tecido hepático obtido após a centrifugação) e 400 μL de acetona gelada 80% (v/v), e levados a geladeira onde permaneceram em repouso por 1.5 h a 4°C . Após a observação de precipitados de *pellets* proteicos, os microtubos foram centrifugados à 9503 *g* na temperatura de 4°C por 15 min. Após esse processo, o sobrenadante foi descartado e obtidos os *pellets* proteicos.

2.4. Determinação da proteína total

A concentração de proteína total nos *pellets* obtidos na etapa de precipitação foi determinada pelo método do Biureto usando albumina de soro bovino (BSA) como padrão (Doumas et al., 1981). A curva analítica foi construída na faixa de concentrações de 10 a 100 g/L a partir de solução estoque de albumina (100 g L^{-1}). Alíquotas de 50 μL de amostra e/ou padrão e 2,5 mL do reativo de Biureto foram misturadas em tubos de 5 mL e levadas em banho-maria a 32°C por 10 min. Após 5 minutos em temperatura ambiente, as amostras foram transferidas para cubetas de 1 cm de largura e as leituras das absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro UV/Visível no comprimento de onda de a 545 nm.

2.5. Eletroforese bidimensional (2D-PAGE) e análise dos géis de poliacrilamida

Após a determinação de proteína total nos *pellets* foi realizado o processo de fracionamento do proteoma das amostras por 2D-PAGE. Para isso, soluções contendo $1,50 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ de proteína total foram preparadas por meio da solubilização dos *pellets* proteicos em tampão específico contendo 7 mol L^{-1} de ureia; 2 mol L^{-1} de tiureia; 2% (m/v) de CHAPS (3-[(3-colaminopropil)-dimetilamônio]-1-propano sulfonato); 0.5% (v/v) anfólitos pH variando de 3 a 10; 0,002% (m/v) de azul de bromofenol. Em seguida, alíquotas de $250 \mu\text{L}$ (correspondendo a $375 \mu\text{g}$ de proteína) das soluções dos *pellets* proteicos foram aplicadas em fitas de 13 cm contendo gel pré-fabricado e anfólitos de gradiente de pH 3 a 10 para realização da etapa de focalização isoeletrica (IEF), primeiro estágio da eletroforese bidimensional (2D-PAGE), no qual as proteínas são fracionadas em função dos seus respectivos pontos isoeletricos (pIs) (Garcia et al., 2006). Ao final da IEF, as fitas passaram por etapas de equilíbrio com soluções de ditioneitol (DTT) sob agitação suave por 15 minutos e em seguida a solução de DTT foi retirada e adicionada solução de iodoacetamida passando pelo mesmo processo. O objetivo dessas etapas foi a redução das proteínas na presença de DTT para atuar na ruptura das pontes dissulfeto presentes e evitar reoxidação das proteínas por meio da alquilação dos grupos tiol ao utilizar solução de iodoacetamida.

Após a separação das proteínas em função dos seus pIs, as fitas foram transferidas para gel de poliacrilamida a 12,5% (v/v) previamente preparados entre placas de vidro ($180 \times 160 \times 1,5 \text{ mm}$), juntamente com um padrão contendo proteínas de diferentes massas moleculares (β -fosforilase: 97,0 kDa), albumina: 66,0 kDa, ovoalbumina: 45,0 kDa, anidrase carbônica: 30,0 kDa, inibidor de tripsina: 20,1 kDa e α -lactalbumina: 14,4 kDa) para separação em função das suas respectivas massas moleculares, segunda dimensão do processo 2D-PAGE. Nessa etapa do processo, foram utilizadas as condições experimentais descritas por Lima et al. (2019). As corridas eletroforéticas foram realizadas com três repetições (três géis por tratamento) utilizando a seguinte programação: 100 volts durante 30 minutos e 250 volts por 2 horas. Ao final da corrida, os géis foram removidos cuidadosamente das placas de vidro e imersos em uma solução fixadora contendo ácido acético 10% (v/v) e etanol 40% (v/v) durante 30 minutos. Após esse tempo, a solução fixadora foi retirada e então adicionado o corante Coomassie G-250 coloidal (USB, Cleveland, Ohio, Estados Unidos) permanecendo em contato com os géis durante 72 horas em mesa agitadora. Posteriormente o corante foi removido e os géis foram lavados com água ultrapura até total revelação dos *spots* proteicos. Após lavagem completa, os géis

foram escaneados e as imagens analisadas por meio do *software Image Master Platinum v.7.0* onde foram obtidos o número de *spots* de cada gel, percentual de correlação (*matching*) entre as repetições de géis, e os valores de ponto isoelétrico (pI) e massa molecular (MM) de cada *spot*. A diferença na expressão dos *spots* proteicos (*upregulation*, *downregulation* e presença/ausência) entre os grupos estudados foi determinada pela análise de variância (ANOVA) realizada pelo mesmo *software*, sendo considerado o nível de significância de 5% ($P < 0,05$) (Braga et al., 2017). Para a análise foram considerados três géis por tratamento e foram feitas as seguintes comparações relevantes para o estudo: S150-120 x S15-80; H15-80 x S15-80; H150-120 x S150-120; e H150-120 x H15-80.

2.6. Determinação de cobre e manganês nas amostras de tecido hepático, *pellets* e *spots* proteicos

Para determinação de cobre e manganês nas amostras de tecido hepático e *pellets* proteicos, foi realizada a mineralização das amostras dos *pools* de fígado (duplicata) e dos *pellets* proteicos (triplicata) com ácido sulfúrico concentrado ultrapuro e peróxido de hidrogênio 30% (m/m) mediante aquecimento em bloco digestor. Após a completa digestão (extrato transparente), os extratos ácidos foram avolumados para 5,00 mL em tubos aferidos para posterior quantificação dos minerais por espectrometria de absorção atômica em chama (FAAS).

O mapeamento do Cu e Mn nos *spots* proteicos foi realizado nos géis dos grupos S150-120 e H150-120. Esses grupos foram escolhidos em virtude dos maiores níveis de Cu e Mn suplementados, viabilizando dessa forma, a detecção dos minerais nos *spots* proteicos para identificação das proteínas expressas nos respectivos *spots*. Para isso, os *spots* diferencialmente expressos foram recortados dos géis e transferidos para tubos de digestão de 5 mL, sendo adicionado a cada frasco alíquotas de 500 μL de ácido sulfúrico concentrado ultrapuro e 200 μL de peróxido de hidrogênio 30% (m/m). O conjunto de frascos foi colocado em bloco digestor até a completa mineralização das amostras (extrato transparente). Os extratos ácidos obtidos foram avolumados para 5 mL com água ultrapura ($18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$) (Moraes et al., 2012). Em seguida foi realizada a determinação do Cu e Mn por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS).

Para a construção das curvas analíticas, soluções padrão de cobre e manganês em meio de ácido clorídrico $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ foram preparadas a partir da diluição dos padrões Titrisol MERK contendo 1000 mg L^{-1} dos analíticos. As faixas ótimas de concentração das curvas analíticas foram as sugeridas no manual do equipamento. Para cada curva analítica

foi preparado um branco. As condições operacionais utilizadas nas determinações de cobre e manganês foram as descritas no manual do fabricante do equipamento (Cookbook, Shimadzu AA – 6800, 2000), com algumas modificações conforme procedimentos descritos por Neves et al. (2009). A determinação da concentração total do cobre e manganês nas amostras de tecido hepático e nos *pellets* proteicos foi realizada utilizando os mesmos procedimentos descritos acima. As concentrações de cobre e manganês foram analisadas utilizando a opção ANOVA do *software* Minitab 17 e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

2.7. Espectrometria de massas

Os *spots* proteicos diferencialmente expressos com a presença do Cu e/ou Mn foram extraídos dos géis com auxílio de bisturi, recortados em segmentos de aproximadamente 1 mm³ e transferidos para microtubos contendo 1 mL de ácido acético 5% (v/v) sendo submetidos às seguintes etapas conforme procedimentos descritos por Braga et al. (2017): remoção do corante, redução e alquilação das proteínas, digestão trípica utilizando solução de tripsina 10 ng mL⁻¹, e eluição dos peptídeos. Posteriormente foi realizada a purificação dos peptídeos por meio de colunas C18 ZipTip, e em seguida os eluatos foram concentrados a aproximadamente 1 µL utilizando um concentrador a vácuo. As sequências peptídicas nos extratos obtidos pelo processo de digestão trípica foram caracterizadas por espectrometria de massas em sequência acoplada com cromatografia líquida (LC-MS/MS). As alíquotas das soluções de peptídeos eluídos foram analisadas utilizando o sistema nanoAcquity UPLC acoplado ao espectrômetro de massa Xevo Q-TOF G2 (Waters, Manchester, UK).

2.8. Análise de bioinformática

A identificação das proteínas foi realizada por meio do banco de dados *UniProt* utilizando o genoma *Gallus Gallus*. Pelo mesmo banco de dados foram obtidas as sequências *FASTA* das proteínas, as quais foram utilizadas na análise funcional utilizando o *software Blast2GO* v.6.0.3. A partir dos termos *GO* (*Gene Ontology*) o programa classificou as sequências de proteínas em três domínios: componente celular, função molecular e processo biológico. O banco de dados online *String* (string-db.org v.11.5) foi utilizado para construir a rede de interação proteína-proteína considerando uma pontuação mínima de confiança de 0,400 (confiança média) e agrupamento *kmeans*. As fontes de interação consideradas foram: experimentos, banco de dados, co-expressão e co-

ocorrência. Por meio do plugin *String* foi realizado a análise de enriquecimento da via *KEGG* (Enciclopédia de Genes e Genomas de Kyoto) utilizando o *software Cytoscape* (v.3.9.1) para avaliar as vias metabólicas enriquecidas ($FDR < 0,05$). Para as análises foram consideradas apenas proteínas com escores acima de 60.

3. Resultados

3.1. Concentração de Cu e Mn nas amostras e *pellets* de tecido hepático

As concentrações de cobre e manganês nas amostras de tecido hepático e *pellets* proteicos estão apresentadas nas Tabelas 1.

Tabela 1. Determinações de cobre e manganês nas amostras e *pellets* de tecido hepático de frangos de corte suplementados com diferentes fontes e níveis de cobre e manganês.

Tratamentos	Concentração de Cu (mg kg ⁻¹)	Concentração de Mn (mg kg ⁻¹)
Tecido hepático		
S15-80	2,60 ± 0,14 ^c	10,15 ± 0,07 ^b
S150-120	64,30 ± 0,71 ^a	64,10 ± 1,56 ^a
H15-80	4,80 ± 0,14 ^b	10,60 ± 0,28 ^b
H150-120	71,55 ± 0,35 ^a	58,75 ± 1,63 ^a
Pellet proteico		
S15-80	2,21 ± 0,03 ^d	8,20 ± 0,66 ^c
S150-120	55,30 ± 0,95 ^b	55,67 ± 0,40 ^a
H15-80	4,34 ± 0,05 ^c	9,37 ± 0,21 ^b
H150-120	68,40 ± 0,79 ^a	52,60 ± 0,89 ^a

^{a,b,c,d}Médias seguidas de letras sobrescritas diferentes na coluna diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). S15-80 (15 mg kg⁻¹ de sulfato de Cu e 80 mg kg⁻¹ de sulfato de Mn), S150-120 (150 mg kg⁻¹ de sulfato de Cu e 120 mg kg⁻¹ de sulfato de Mn), H15-80 (15 mg kg⁻¹ de hidroxicloreto de Cu e 80 mg kg⁻¹ de hidroxicloreto de Mn) e H150-120 (150 mg kg⁻¹ de hidroxicloreto de Cu e 120 mg kg⁻¹ de hidroxicloreto de Mn).

De acordo com a Tabela 1, as concentrações de Cu e Mn no tecido hepático e *pellet* proteico foram maiores nos grupos S150-120 e H150-120 em relação aos grupos S15-80 e H15-80 ($P < 0,05$). No tecido hepático não houve diferença nas concentrações de ambos os minerais entre os grupos S150-120 e H150-120 e de Mn entre os grupos S15-80 e H15-80 ($P > 0,05$). Entretanto o grupo H15-80 apresentou maior concentração de Cu quando comparado com o grupo S15-80 ($P < 0,05$). No *pellet* proteico a concentração de Mn foi maior no grupo H15-80 em relação ao grupo S15-80 ($P < 0,05$), mas não diferiu entre os grupos S150-120 e H150-120 ($P > 0,05$). O mesmo foi observado nas concentrações de Cu, exceto para os grupos S150-120 e H150-120, onde grupo H150-120 apresentou maior concentração de Cu em relação ao grupo S150-120.

3.2. Análise de imagem dos géis e mapeamento de Cu e Mn nos *spots*

A análise das imagens dos géis digitalizados indicou um número médio de 230 ± 69 *spots* e *matching* médio de $98 \pm 1\%$. As imagens representativas dos géis obtidos de cada tratamento estão apresentadas Figura suplementar S1 (material suplementar). A partir da análise por GFAAS, 34 *spots* diferencialmente expressos foram associados ao cobre e/ou manganês nos grupos S150-120 e H150-120. Na Figura 1 são apresentadas as imagens dos géis de poliacrilamida dos tratamentos S150-120 e H150-120 com os *spots* proteicos associados ao cobre e manganês indicados com círculo azul (cobre), vermelho (manganês) e verde (cobre e manganês concomitante). Foram identificados 19 *spots* com a presença apenas do Cu, 10 *spots* com a presença apenas do Mn e 5 *spots* com a presença de ambos os minerais. As concentrações de Cu e Mn nos respectivos *spots* estão sumarizadas na Tabela 2. O grupo H150-120 apresentou um número superior de *spots* associados ao Cu e/ou Mn (33 *spots*) quando comparado ao grupo S150-120 (19 *spots*). As diferenças nas expressões dos *spots* proteicos associados ao Cu e Mn entre os grupos estudados podem ser visualizadas na Tabela 3.

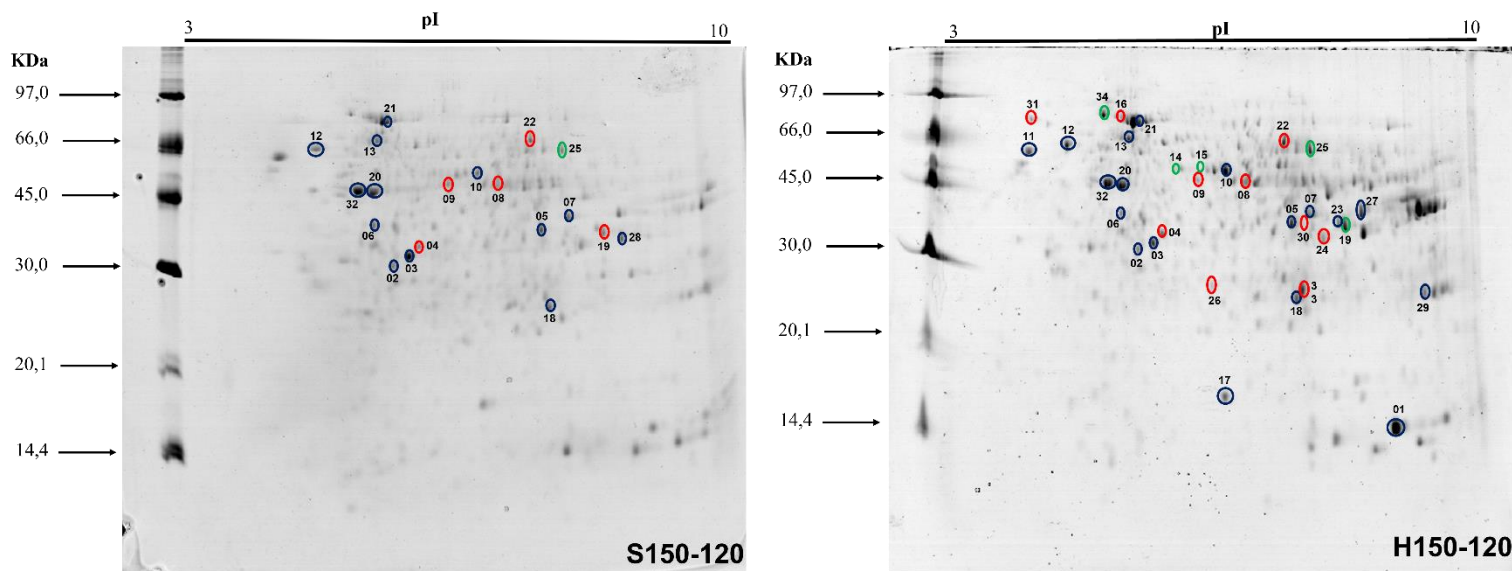


Figura 1. Representação dos géis de poliacrilamida obtidos por 2D-PAGE do *pool* de amostras do tecido hepático de frangos de corte dos grupos S150-120 (150 mg kg⁻¹ de sulfato de Cu e 120 mg kg⁻¹ de sulfato de Mn) e H150-120 (150 mg kg⁻¹ de hidroxicloreto de Cu e 120 mg kg⁻¹ de hidroxicloreto de Mn). Os *spots* proteicos indicados com círculo azul e vermelho estão associados ao cobre e manganês, respectivamente. Os *spots* indicados com círculo verde estão associados ao cobre e manganês concomitante.

Tabela 2. Concentrações de cobre e manganês nos *spots* 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 hidroxiclreto de Cu e 120 mg kg⁻¹ de hidroxiclreto de Mn).

Spot ID	Concentração de Cu (µg L ⁻¹)		Concentração de Mn (µg L ⁻¹)	
	S150-120	H150-120	S150-120	H150-120
01		6,81±0,12		
02	3,40±0,07	4,81±0,09		
03	7,30±0,13	9,63±0,15		
04			0,80±0,015	1,19±0,023
05	5,60±0,11	8,39±0,15		
06	4,70±0,08	6,93±0,13		
07	5,40±0,09	9,80±0,17		
08			0,92±0,014	1,80±0,035
09			0,75±0,012	1,50±0,029
10	3,80±0,08	7,21±0,14		
11		7,20±0,14		
12	4,30±0,07	8,04±0,15		
13	3,90±0,08	6,61±0,13		
14		8,75±0,16		1,21±0,024
15		6,63±0,12		1,31±0,026
16				1,28±0,024
17		8,50±0,16		
18	4,10±0,07	7,61±0,14		
19		10,49±0,20	1,15±0,022	2,26±0,044
20	8,50±0,15	11,17±0,21		
21	6,40±0,13	9,63±0,18		
22			0,77±0,014	1,46±0,027
23		8,22±0,14		
24				1,52±0,026
25	3,70±0,06	7,35±0,13	0,74±0,014	1,32±0,025
26				1,35±0,026
27		8,87±0,16		
28	4,50±0,09			
29		7,38±0,14		
30				1,20±0,022
31				1,31±0,025
32	7,10±0,11	11,54±0,22		
33				1,53±0,027
34		9,30±0,17		1,44±0,027

Tabela 3. Expressão dos *spots* 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.

Spot ID	S150-120 x S15-80	H15-80 x S15-80	H150-120 x S150-120	H150-120 x H15-80
01	-2,42665/+2,42665		+2,90812/-2,90812	
02	+2,32529/-2,32529		-1,9209/+1,9209	
03	+1,91333/-1,91333	-4,89508/+4,89508	-2,7908/+2,7908	
04	+1,37899/-1,37899	+1,87544/-1,87544		-1,85125/+1,85125
05	+1,07939/-1,07939			
06	+2,62169/-2,62169		-2,71604/+2,71604	
07	+1,31895/-1,31895	-1,57209/+1,57209		
08	+1,50983/-1,50983	-1,71385/+1,71385	-2,26661/+2,26661	+1,32697/-1,32697
09	+1,99035/-1,99035		-2,19431/+2,19431	
10	-1,58689/+1,58689		+1,64955/-1,64955	
11	+2,83932/-2,83932		-2,3269/+2,3269	
12	+2,46884/-2,46884	+1,30077/-1,30077	-1,63919/+1,63919	
13	+1,8366/-1,8366		-2,15529/+2,15529	
14	Ausente/Presente		Presente/Ausente	
15	Ausente/Presente	+3,71871/-3,71871	Presente/Ausente	-2,89582/+2,89582
16	+1,94859/-1,94859		-2,77459/+2,77459	
17		+2,17561/-2,17561		-1,8057/+1,8057
18	+1,50469/-1,50469			+1,9578/-1,9578
19			+1,43375/-1,43375	+1,33486/-1,33486
20		+2,09367/-2,09367	-1,43008/+1,43008	-1,63192/+1,63192
21			-3,07186/+3,07186	-2,24224/+2,24224
22		-1,62981/+1,62981		
23		-2,60766/+2,60766		+4,34762/-4,34762
24		+1,81972/-1,81972		
25		-3,29601/+3,29601		+2,75689/-2,75689
26		+1,32911/-1,32911		-1,96446/+1,96446
27		-1,96106/+1,96106		+2,02609/-2,02609
28		+1,2849/-1,2849		
29		Ausente/Presente		Presente/Ausente
30		Ausente/Presente		Presente/Ausente
31				+1,38711/-1,38711
32			-1,79011/+1,79011	+1,27324/-1,27324
33	Ausente/Presente		Presente/Ausente	+3,00156/-3,00156
34				+1,9165/-1,9165

S15-80 (15 mg kg⁻¹ de sulfato de Cu e 80 mg kg⁻¹ de sulfato de Mn), S150-120 (150 mg kg⁻¹ de sulfato de Cu e 120 mg kg⁻¹ de sulfato de Mn), H15-80 (15 mg kg⁻¹ e hidroxicloreto de Cu e 80 mg kg⁻¹ de hidroxicloreto de Mn) e H150-120 (150 mg kg⁻¹ de hidroxicloreto de Cu e 120 mg kg⁻¹ de hidroxicloreto de Mn).

3.3. Identificação das proteínas, análise funcional, interação proteína-proteína e vias metabólicas

Um total de 56 proteínas não redundantes com *score* ≥ 60 foram identificadas a partir dos 34 *spots* proteicos associados ao Cu e Mn. As proteínas identificadas possuem massa molecular variando entre 4 e 91 KDa aproximadamente, estando dentro da faixa de pH de 3 a 10 (Tabela 4). Os resultados da anotação funcional (processos biológicos, funções moleculares e componentes celulares) das proteínas podem ser visualizados na Figura suplementar S2. Resumidamente, as proteínas caracterizadas no presente estudo estão distribuídas em diversos componentes celulares, como estrutura anatômica intracelular, citoplasma, citosol, organelas, membrana, complexo hemoglobina, complexo catalítico entre outros. Além disso, exibem participação em diversos processos metabólicos, desenvolvimento, respostas biológicas e regulação. Entre as funções moleculares desempenhadas pelas proteínas identificadas estão as de ligação, chaperonas moleculares, e atividade de transferase e hidrolase.

A rede de interação proteína-proteína gerada via *String* está ilustrada na Figura 3. A rede foi agrupada em três clusters identificados pelas cores verde, vermelho e azul. O cluster verde indica a interação das chaperonas moleculares responsáveis pelo dobramento e redobramento de proteínas, e das actinas citoplasmáticas. O cluster vermelho é composto por inúmeras proteínas envolvidas em diversos processos metabólicos, como metabolismo de carboidratos, metabolismo de xenobióticos e defesa antioxidante. O cluster azul apresenta a interação das proteínas envolvidas no metabolismo de purinas e proteínas de ligação com ácidos graxos, bem como a interação das hemoglobinas responsáveis pelo transporte de oxigênio.

Um total de 29 vias *KEGG* foram significativamente enriquecidas (FDR $<0,05$) utilizando o *software Cytoscape* com o plugin *string* (Tabela 5). As 10 vias mais enriquecidas foram: *Metabolic pathways* (gga01100), *Glycolysis/Gluconeogenesis* (gga00010), *Carbon metabolism* (gga01200), *Biosynthesis of amino acids* (gga01230), *Drug metabolism - cytochrome P450* (gga00982), *Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450* (gga00980), *Pyruvate metabolism* (gga00620), *Protein processing in endoplasmic reticulum* (gga04141), *Cysteine and methionine metabolism* (gga00270) e *Glutathione metabolism* (gga00480).

Tabela 4. Proteínas identificadas por *LC-MS/MS* nos *spots* 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).

Spot	Accession	Gene	Proteína	pI/MM (Da) experimental	pI/MM (Da) teóricos	Score	Presença de Cu e/ou Mn
01	P83145	N/A	Ribonuclease UK114	8,94/15241	5,85/4083,76	6335,108	H150-120 = Cu
	P01994	HBAA	Hemoglobin subunit alpha-A		8,54/15428,87	5828,38	
	P80226	FABP1	Fatty acid-binding protein, liver		8,67/14210,37	1769,519	
	P02112	HBB	Hemoglobin subunit beta		8,84/16466,13	820,2869	
	P02127	N/A	Hemoglobin subunit rho		8,78/16589,21	281,6852	
	P02128	HBE	Hemoglobin subunit épsilon		9,07/16603,23	281,6852	
	P00337	LDHB	L-lactate dehydrogenase B chain		7,07/36318,09	263,6445	
	P02001	HBAD	Hemoglobin subunit alpha-D		7,02/15694,93	216,1184	
	P02007	N/A	Hemoglobin subunit pi		7,81/15709,04	79,9931	
	Q5ZI49	PRPS2	Ribose-phosphate pyrophosphokinase 2		6,37/35663,21	79,7743	
02	P23991	ADH1	Alcohol dehydrogenase 1	5,52/27880	8,69/39807,50	60,1557	S150-120 = Cu H150-120 = Cu
	P51913	ENO1	Alpha-enolase		6,17/47305,01	473,2483	
	P17153	ANXA5	Annexin A5		5,59/36198,34	446,3777	
	P07322	ENO3	Beta-enolase		7,28/47196,08	360,0507	
	P14315	CAPZB	F-actin-capping protein subunit beta isoforms 1 and 2		5,36/31364,45	221,4613	
	P19121	ALB	Albumin		5,51/69918,19	108,1769	
03	P07341	ALDOB	Fructose-bisphosphate aldolase B	5,87/31101	8,81/39295,78	71,3977	S150-120 = Cu H150-120 = Cu
	P17153	ANXA5	Annexin A5		5,59/36198,34	5548,77	
	P51913	ENO1	Alpha-enolase		6,17/47305,01	610,6372	
04	P07322	ENO3	Beta-enolase	5,83/29922	7,28/47196,08	490,8612	S150-120 = Mn H150-120 = Mn
	Q9I923	RGN	Regucalcin		5,77/33229,57	8090,358	
	P51913	ENO1	Alpha-enolase		6,17/47305,01	239,0043	
05	P21872	GART	Trifunctional purine biosynthetic protein adenosine-3		7,51/106544	119,1895	S150-120 = Mn H150-120 = Mn
	P00337	LDHB	L-lactate dehydrogenase B chain		7,07/36318,09	8487,15	

	P07341	ALDOB	Fructose-bisphosphate aldolase B		8,81/39295,78	4702,678	H150-120 = Cu
	P23991	ADH1	Alcohol dehydrogenase 1		8,69/39807,5	196,0894	
	Q5ZMQ2	ACTG1	Actin, cytoplasmic 2		5,31/41792,84	8439,855	
	P53478	N/A	Actin, cytoplasmic type 5		5,30/41835,87	8439,855	
	P60706	ACTB	Actin, cytoplasmic 1		5,29/41736,73	8439,855	
06	P68139	ACTA1	Actin, alpha skeletal muscle	5,47/37266	5,23/42051,03	3354,721	S150-120 = Cu
	P68034	ACTC1	Actin, alpha cardiac muscle 1		5,23/42018,97	3354,721	H150-120 = Cu
	P63270	ACTG2	Actin, gamma-enteric smooth muscle		5,31/41876,88	3354,721	
	P08023	ACTA2	Actin, aortic smooth muscle		5,24/41994,92	3354,721	
	P19121	ALB	Albumin		5,51/69918,19	83,924	
07	P00356	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	7,86/31789	8,70/35703,97	8609,476	S150-120 = Cu
	P07341	ALDOB	Fructose-bisphosphate aldolase B		8,81/39295,78	68,7995	H150-120 = Cu
08	P16580	GLUL	Glutamine synthetase	7,09/46191	6,38/42146,46	1430,712	S150-120 = Mn H150-120 = Mn
	P51913	ENO1	Alpha-enolase	6,52/46594	6,17/47305,01	380,7553	
09	P07322	ENO3	Beta-enolase		7,28/47196,08	247,165	S150-120 = Mn
	P27463	ALDH1A1	Retinal dehydrogenase 1		7,49/55809,33	66,4081	H150-120 = Mn
	O93344	ALDH1A2	Retinal dehydrogenase 2		5,87/56731,99	66,4081	
	P51913	ENO1	Alpha-enolase	6,65/43874	6,17/47305,01	10775,61	
10	O57391	ENO2	Gamma-enolase		4,84/47308,46	2788,5	S150-120 = Cu
	P07322	ENO3	Beta-enolase		7,28/47196,08	1849,809	H150-120 = Cu
11	P51913	ENO1	Alpha-enolase	4,26/58283	6,17/47305,01	559,8503	
	P07322	ENO3	Beta-enolase		7,28/47196,08	555,7766	H150-120 = Cu
	P09102	P4HB	Protein disulfide-isomerase	4,65/60297	4,69/57409,80	5805,812	
12	P08110	HSP90B1	Endoplasmic		4,83/91555,02	1379,731	S150-120 = Cu
	Q04619	HSP90AB1	Heat shock cognate protein HSP 90-beta		4,94/83427,45	142,0041	H150-120 = Cu
13	Q5ZL72	HSPD1	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	5,46/62486	5,72/60972,56	13474,97	S150-120 = Cu
	Q5ZM98	HSPA9	Stress-70 protein, mitochondrial		6,09/73192,32	122,2014	H150-120 = Cu

14	P51913	ENO1	Alpha-enolase		6,17/47305,01	3681,357	
	P07322	ENO3	Beta-enolase	6,00/45904	7,28/47196,08	523,2764	H150-120 = Cu e Mn
	O57391	ENO2	Gamma-enolase		4,84/47308,46	299,1514	
15	P51913	ENO1	Alpha-enolase		6,17/47305,01	4588,928	
	O57391	ENO2	Gamma-enolase	6,31/45224	4,84/47308,46	978,15	H150-120 = Cu e Mn
	P07322	ENO3	Beta-enolase		7,28/47196,08	771,7178	
16	P19121	ALB	Albumin		5,51/69918,19	3543,291	
	Q90593	HSPA5	Endoplasmic reticulum chaperone BiP	5,4/74696	5,12/72018,51	2434,631	H150-120 = Mn
	O73885	HSPA8	Heat shock cognate 71 kDa protein		5,46/70826,98	236,3526	
	P08106	N/A	Heat shock 70 kDa protein		5,52/69750,82	214,6749	
17	P02001	HBAD	Hemoglobin subunit alpha-D		7,02/15694,93	4248,779	
	P00356	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase		8,70/35703,97	2980,18	
	P80566	SOD1	Superoxide dismutase [Cu-Zn]		6,1/15703,6	1844,127	
	P02112	HBB	Hemoglobin subunit beta	6,52/14400	8,84/16466,13	890,2412	H150-120 = Cu
	P07341	ALDOB	Fructose-bisphosphate aldolase B		8,81/39295,78	570,7814	
	P02128	HBE	Hemoglobin subunit epsilon		9,07/16603,23	208,8738	
	P02127	N/A	Hemoglobin subunit rho		8,78/16589,21	175,0719	
	P80226	FABP1	Fatty acid-binding protein, liver		8,67/14210,37	127,1781	
18	P20136	GSTM2	Glutathione S-transferase 2		6,84/25892,82	8173,118	
	P07341	ALDOB	Fructose-bisphosphate aldolase B		8,81/39295,78	1314,413	
	P02001	HBAD	Hemoglobin subunit alpha-D	7,73/26038	7,02/15694,93	1045,607	S150-120 = Cu
	P00356	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase		8,70/35703,97	625,0613	H150-120 = Cu
	Q5ZME2	MDH1	Malate dehydrogenase, cytoplasmic		6,92/36543,40	283,7447	
	P47826	RPLP0	60S acidic ribosomal protein P0		5,71/34285,58	175,4232	
19	P00356	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase		8,70/35703,97	12218,79	
	P07341	ALDOB	Fructose-bisphosphate aldolase B	8,28/29455	8,81/39295,78	186,3181	S150-120 = Mn
	P23991	ADH1	Alcohol dehydrogenase 1		8,69/39807,50	168,1874	H150-120 = Cu e Mn
20	Q5ZMQ2	ACTG1	Actin, cytoplasmic 2	5,35/41857	5,31/41792,84	16243,58	

	P60706	ACTB	Actin, cytoplasmic 1		5,29/41736,73	16243,58	S150-120 = Cu
	P53478	N/A	Actin, cytoplasmic type 5		5,30/41835,87	16238,88	H150-120 = Cu
	P68034	ACTC1	Actin, alpha cardiac muscle 1		5,23/42018,97	5004,212	
	P68139	ACTA1	Actin, alpha skeletal muscle		5,23/42051,03	4902,417	
	P63270	ACTG2	Actin, gamma-enteric smooth muscle		5,31/41876,88	4859,32	
	P08023	ACTA2	Actin, aortic smooth muscle		5,24/41994,92	4852,473	
	P19121	ALB	Albumin		5,51/69918,19	2513,817	
	P00356	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase		8,70/35703,97	202,1998	
	Q5ZL72	HSPD1	60 kDa heat shock protein, mitochondrial		5,72/ 60972,56	198,1112	
21	P19121	ALB	Albumin		5,51/69918,19	11922,4	
	O73885	HSPA8	Heat shock cognate 71 kDa protein		5,46/70826,98	2878,664	
	P08106	N/A	Heat shock 70 kDa protein	5,61/72669	5,52/69750,82	997,7423	S150-120 = Cu H150-120 = Cu
	Q90593	HSPA5	Endoplasmic reticulum chaperone BiP		5,12/72018,51	394,2814	
	Q5ZM98	HSPA9	Stress-70 protein, mitochondrial		6,09/73192,32	152,2754	
22	P19121	ALB	Albumin		5,51/69918,19	244,9902	S150-120 = Mn
	P00368	GLUD1	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial	7,42/54093	8,48/55712,06	163,0693	H150-120 = Mn
23	Q08392	N/A	Glutathione S-transferase		8,86/25298,52	1478,593	
	Q08393	N/A	Glutathione S-transferase		8,76/25413,73	1474,454	
	P26697	N/A	Glutathione S-transferase 3		9,06/26325,84	548,1452	
	P00508	GOT2	Aspartate aminotransferase, mitochondrial	9,45/25785	9,39/47241,27	371,8729	H150-120 = Cu
	P00356	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase		8,70/35703,97	336,4139	
	Q5ZL72	HSPD1	60 kDa heat shock protein, mitochondrial		5,72/60972,56	198,1112	
24	P07341	ALDOB	Fructose-bisphosphate aldolase B		8,81/39295,78	6992,838	
	P00356	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase		8,70/35703,97	2426,886	
	P23991	ADH1	Alcohol dehydrogenase 1	8,11/34234	8,69/39807,50	1040,125	H150-120 = Mn
	P00337	LDHB	L-lactate dehydrogenase B chain		7,07/36318,09	147,8423	
25	P00368	GLUD1	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial		8,48/55712,06	2828,28	S150-120 = Cu e Mn
	P27463	ALDH1A1	Retinal dehydrogenase 1	7,82/51213	7,49/55809,33	2341,783	H150-120 = Cu e Mn

	P07341	ALDOB	Fructose-bisphosphate aldolase B		8,81/39295,78	299,201	
	O93344	ALDH1A2	Retinal dehydrogenase 2		5,87/56731,99	155,6904	
	Q5ZJF4	PRDX6	Peroxiredoxin-6		5,7/24976,79	6267,357	
	P07341	ALDOB	Fructose-bisphosphate aldolase B		8,81/39295,78	1609,665	
	P21642	PCK2	Phosphoenolpyruvate carboxykinase [GTP], mitochondrial		7,56/71106,29	878,0714	
26	P16580	GLUL	Glutamine synthetase	6,65/25240	6,38/42146,46	799,0565	H150-120 = Mn
	P38024	AIRC	Multifunctional protein ADE2		8,18/47240,32	279,2373	
	P19121	ALB	Albumin		5,51/69918,19	93,6207	
	Q5ZLR5	UQCRFS1	Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mitochondrial		8,68/29386,56	92,6274	
	P00940	TPI1	Triosephosphate isomerase		6,71/26620,45	91,4796	
27	P07341	ALDOB	Fructose-bisphosphate aldolase B	8,59/39065	8,81/39295,78	98,4781	H150-120 = Cu
	P07341	ALDOB	Fructose-bisphosphate aldolase B		8,81/39295,78	17119,69	
	P23991	ADH1	Alcohol dehydrogenase 1		8,69/39807,50	1166,58	
28	P00356	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	8,6/35327	8,70/35703,97	838,7416	S150-120 = Cu
	Q5ZKR4	RABL3	Rab-like protein 3		6,23/26002,35	94,9377	
	P00340	LDHA	L-lactate dehydrogenase A chain		7,75/36514,46	73,7079	
	P00337	LDHB	L-lactate dehydrogenase B chain		7,07/36318,09	64,6321	
	P07341	ALDOB	Fructose-bisphosphate aldolase B		8,81/39295,78	1455,896	
29	Q08392	N/A	Glutathione S-transferase	9,31/21742	8,86/25298,52	867,9658	H150-120 = Cu
	P26697	N/A	Glutathione S-transferase 3		9,06/26325,84	664,4908	
	Q08393	N/A	Glutathione S-transferase		8,76/25413,73	308,8971	
	P00356	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase		8,70/35703,97	5820,609	
30	P07341	ALDOB	Fructose-bisphosphate aldolase B	7,95/36340	8,81/39295,78	522,2266	H150-120 = Mn
	P00337	LDHB	L-lactate dehydrogenase B chain		7,07/36318,09	326,4798	
	P00940	TPI1	Triosephosphate isomerase		6,71/26620,45	250,532	
	P51913	ENO1	Alpha-enolase		6,17/47305,01	642,0277	
31	P07322	ENO3	Beta-enolase	4,25/76181	7,28/47196,08	545,8586	H150-120 = Mn
	O57391	ENO2	Gamma-enolase		4,84/47308,46	91,4921	

32	P60706	ACTB	Actin, cytoplasmic 1	5,25/41900	5,29/41736,73	16763,91	S150-120 = Cu H150-120 = Cu
	Q5ZMQ2	ACTG1	Actin, cytoplasmic 2		5,31/41792,84	16745,55	
	P53478	N/A	Actin, cytoplasmic type 5		5,30/41835,87	16742,94	
	P68139	ACTA1	Actin, alpha skeletal muscle		5,23/42051,03	4365,88	
	P68034	ACTC1	Actin, alpha cardiac muscle 1		5,23/42018,97	4365,88	
	P08023	ACTA2	Actin, aortic smooth muscle		5,24/41994,92	4193,435	
	P63270	ACTG2	Actin, gamma-enteric smooth muscle		5,31/41876,88	4170,822	
	P19121	ALB	Albumin		5,51/69918,19	600,1381	
33	P00940	TPI1	Triosephosphate isomerase	7,74/26230	6,71/26620,45	15437,87	H150-120 = Mn
	P07341	ALDOB	Fructose-bisphosphate aldolase B		8,81/39295,78	1635,883	
	P31335	ATIC	Bifunctional purine biosynthesis protein ATIC		8,40/64414,82	175,2742	
34	Q90593	HSPA5	Endoplasmic reticulum chaperone BiP	5,22/69732	5,12/72018,51	9989,707	H150-120 = Cu e Mn
	P08106	N/A	Heat shock 70 kDa protein		5,52/69750,82	853,5319	
	O73885	HSPA8	Heat shock cognate 71 kDa protein		5,46/70826,98	849,6843	
	P07341	ALDOB	Fructose-bisphosphate aldolase B		8,81/39295,78	166,5883	

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).

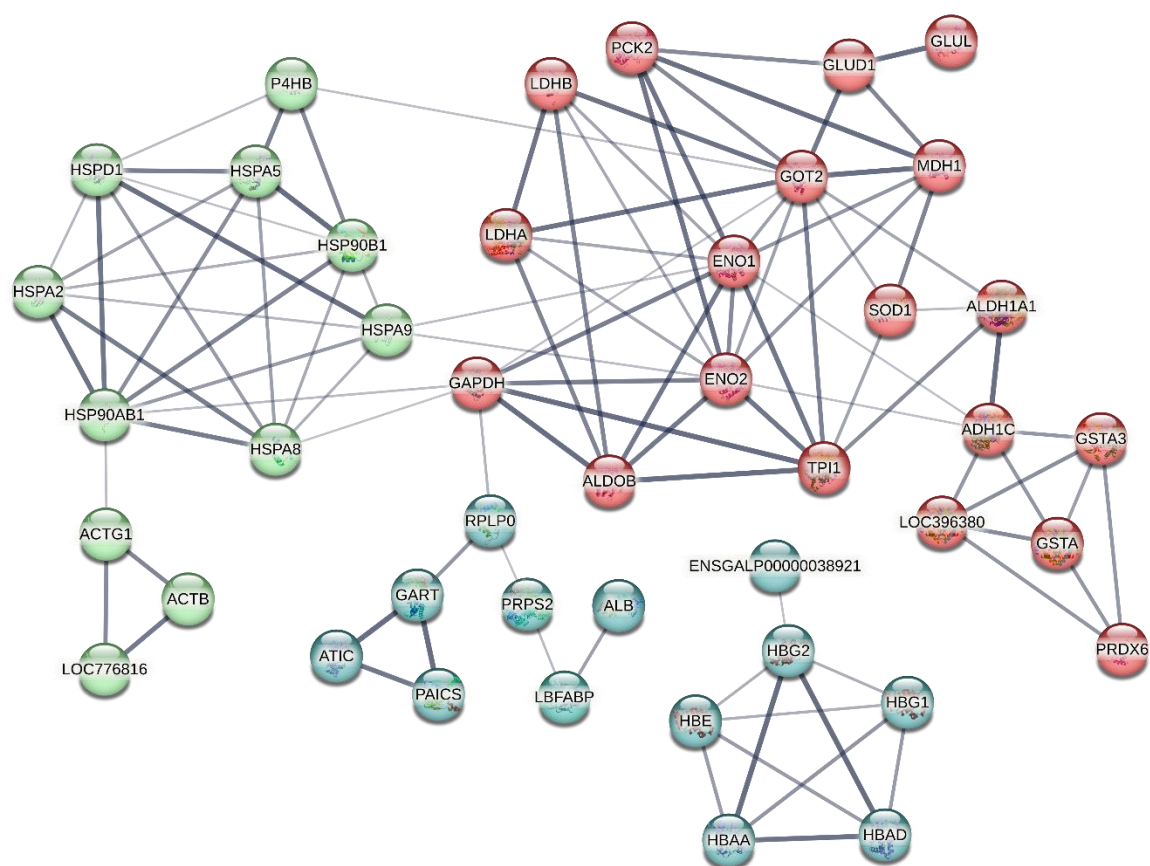


Figura 2. Rede de interação proteína-proteína das proteínas identificadas nos *spots* proteicos associados ao cobre e manganês (2D-PAGE/GFAAS), utilizando o banco de dados online *String*. A rede foi agrupada em três clusters (verde, vermelho e azul) utilizando o método de agrupamento *kmeans*. Cada nó (esferas coloridas) representa uma proteína. As linhas representam evidências de interação entre as proteínas conectadas, e a espessura das linhas indica o nível de confiança das respectivas interações (quanto mais espessa maior o nível de confiança). Cluster verde: *ACTB* (Actin cytoplasmic 1), *ACTG1* (Actin, cytoplasmic type 5), *HSPA2* (Heat shock 70 kDa protein 1/2/6/8), *HSPA5* (Endoplasmic reticulum chaperone BiP), *HSPA8* (Heat shock cognate 71 kDa protein), *HSPA9* (Stress-70 protein, mitochondrial), *HSPD1* (60 kDa heat shock protein, mitochondrial), *HSP90AB1* (Heat shock cognate protein HSP 90-beta), *HSP90B1* (Endoplasmic reticulum chaperone BiP), *LOC776816* (Actin cytoplasmic 2), *P4HB* (Protein disulfide-isomerase). Cluster vermelho: *ADH1C* (Alcohol dehydrogenase 1), *ALDH1A1* (Retinal dehydrogenase 1), *ALDOB* (Fructose-bisphosphate aldolase B), *ENO1* (Alpha-enolase), *ENO2* (Gamma-enolase), *GAPDH* (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), *GLUD1* (Glutamate

dehydrogenase 1, mitochondrial), *GLUL* (Glutamine synthetase), *GOT2* (Aspartate aminotransferase, mitochondrial), *GSTA* (Glutathione S-transferase), *GSTA3* (Glutathione S-transferase), *LDHA* (L-lactate dehydrogenase A chain), *LDHB* (L-lactate dehydrogenase B chain), *LOC396380* (Glutathione S-transferase 3), *MDH1* (Malate dehydrogenase, cytoplasmic), *PCK2* (Phosphoenolpyruvate carboxykinase [GTP], mitochondrial), *PRDX6* (Peroxiredoxin 6), *SOD1* (Superoxide dismutase, Cu-Zn), *TPI1* (Triosephosphate isomerase 1). Cluster azul: *ALB* (Albumin), *ATIC* (Bifunctional purine biosynthetic protein ATIC), *ENSGALP00000038921* (Hemoglobin subunit zeta), *GART* (Trifunctional purine biosynthetic protein adenosine-3), *HBAA* (Hemoglobin subunit alpha-A), *HBAD* (Hemoglobin subunit alpha-D), *HBE* (Hemoglobin subunit epsilon), *HBG1* (Hemoglobin subunit rho), *HBG2* (Hemoglobin subunit beta), *LBFABP* (Fatty acid-binding protein, liver), *PAICS* (Multifunctional protein ADE2), *PRPS2* (Ribose-phosphate pyrophosphokinase 2), *RPLP0* (60S acidic ribosomal protein P0).

Tabela 5. Vias *KEGG* significativamente enriquecidas (FDR<0,05) utilizando o *software Cytoscape* com o plugin *String*.

Pathway	Description	FDR	Genes
gga01100	Metabolic pathways	1.87E-13	GLUD1 GOT2 ENO1 FASN PRDX6 ATIC GLUL MDH1 PCK2 ADH1C PAICS GAPDH TPI1 ENO2 ALDH1A1 LOC396380 ENSGALP00000026286 GSTA PRPS2 RGN ALDH1A2 GART ALDOB LDHA LDHB UQCIFS1
gga00010	Glycolysis/Gluconeogenesis	1.99E-11	ENO1 PCK2 ADH1C GAPDH TPI1 ENO2 ALDOB LDHA LDHB
gga01200	Carbon metabolism	1.43E-10	GLUD1 GOT2 ENO1 MDH1 GAPDH TPI1 ENO2 PRPS2 RGN ALDOB
gga01230	Biosynthesis of amino acids	1.88E-09	GOT2 ENO1 GLUL GAPDH TPI1 ENO2 PRPS2 ALDOB
gga00982	Drug metabolism - cytochrome P450	1.00E-04	ADH1C LOC396380 ENSGALP00000026286 GSTA
gga00980	Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	1.30E-04	ADH1C LOC396380 ENSGALP00000026286 GSTA
gga00620	Pyruvate metabolism	1.40E-04	MDH1 PCK2 LDHA LDHB
gga04141	Protein processing in endoplasmic reticulum	1.70E-04	HSPA5 HSPA8 P4HB HSP90AB1 HSPA2 HSP90B1
gga00270	Cysteine and methionine metabolism	2.50E-04	GOT2 MDH1 LDHA LDHB
gga00480	Glutathione metabolism	2.50E-04	PRDX6 LOC396380 ENSGALP00000026286 GSTA
gga00220	Arginine biosynthesis	5.60E-04	GLUD1 GOT2 GLUL
gga03018	RNA degradation	0.0011	HSPA9 ENO1 HSPD1 ENO2
gga00030	Pentose phosphate pathway	0.0012	PRPS2 RGN ALDOB
gga00830	Retinol metabolism	0.0023	ADH1C ALDH1A1 ALDH1A2
gga00250	Alanine, aspartate and glutamate metabolism	0.0026	GLUD1 GOT2 GLUL
gga00230	Purine metabolism	0.0061	ATIC PAICS PRPS2 GART
gga00983	Drug metabolism - other enzymes	0.0064	LOC396380 ENSGALP00000026286 GSTA
gga04520	Adherens junction	0.0093	ACTB ACTG1 LOC776816
gga00670	One carbon pool by folate	0.0156	ATIC GART
gga00910	Nitrogen metabolism	0.0156	GLUD1 GLUL
gga00020	Citrate cycle (TCA cycle)	0.0307	MDH1 PCK2
gga00350	Tyrosine metabolism	0.0359	GOT2 ADH1C
gga00051	Fructose and mannose metabolism	0.0366	TPI1 ALDOB
gga00630	Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	0.0366	GLUL MDH1
gga00640	Propanoate metabolism	0.0366	LDHA LDHB
gga04210	Apoptosis	0.0366	ACTB ACTG1 LOC776816
gga04217	Necroptosis	0.0366	GLUD1 GLUL HSP90AB1
gga04145	Phagosome	0.0479	ACTB ACTG1 LOC776816
gga04530	Tight junction	0.0484	ACTB ACTG1 LOC776816

4. Discussão

4.1. Concentração de Cu e Mn no tecido hepático e *pellet* proteico

As concentrações de Cu e Mn no tecido hepático e *pellet* proteico dos grupos S150-120 e H150-120 foram superiores aos grupos S15-80 e H15-80, provavelmente em virtude da maior suplementação desses minerais. Kim e Kil (2015) também observaram aumento nas concentrações de Cu no fígado de frangos de corte conforme inclusão crescente de CuSO_4 e cloreto de cobre tribásico (*TBCC*) nas dietas. De modo semelhante Sun et al. (2021) relataram maior concentração de Mn em vários tecidos de frangos de corte à medida que se aumentava o nível suplementar de hidroxícloreto de Mn.

Ao comparar as fontes de suplementação, observa-se que o hidroxícloreto de Cu demonstrou ser mais biodisponível que o sulfato de Cu, uma vez que sua utilização resultou em maiores concentrações de Cu no tecido hepático com o nível de 15 mg kg^{-1} e no *pellet* proteico com ambos os níveis (15 e 150 mg kg^{-1}). Embora as concentrações de Mn não tenham diferido entre as fontes nas amostras de tecido hepático, no *pellet* proteico houve maior concentração de Mn no grupo suplementado com hidroxícloreto de Mn com o nível de 80 mg kg^{-1} em relação a fonte sulfato com o mesmo nível. Neste sentido, a análise da concentração dos minerais no *pellet* proteico parece ser mais sensível para estimar a biodisponibilidade em relação a concentração nas amostras de tecido.

Estes resultados sugerem que no presente estudo, houve maior incorporação de Cu e Mn nas proteínas do fígado de frangos de corte suplementados com hidroxícloretos. De fato, a análise por *GFAAS* indicou maior número de *spots* proteicos com a presença de Cu e Mn nos géis do grupo H150-120 em comparação com o grupo S150-120, o que reforça a hipótese de que os hidroxícloretos podem ser mais eficientes em disponibilizar os minerais absorvidos para utilização pelas proteínas em relação aos sulfatos.

4.2. Mapeamento de Cu e Mn nos *spots* proteicos

A análise por *GFAAS* indicou a presença única de Cu em 19 *spots*. Ao analisar as proteínas expressas nesses *spots*, observa-se que 5 *spots* apresentaram a expressão da proteína de ligação ao cobre, a *Albumin* (*spots* 02, 06, 20, 21 e 32), e 1 *spot* apresentou a expressão da metaloenzima de Cu e Zn, a *Superóxido dismutase [Cu-Zn]* (*spot* 17). Outras proteínas conhecidas por se ligarem ao cobre, como as chaperonas de cobre *ATOX1* e *CCs* não foram identificadas possivelmente em virtude das limitações apresentadas pela técnica *2D-PAGE* em resolver proteínas de baixa abundância, e do corante utilizado para revelar os *spots* proteicos. Segundo Smith et al. (2004), proteínas de baixa abundância dificilmente

são detectadas pela coloração *Coomassie Blue* cujo limite fica entre 50 e 100 ng de proteína.

Por outro lado, em 13 *spots* com a presença única de Cu, e 5 *spots* com a presença concomitante de Cu e Mn, foi observado a expressão de proteínas que conforme relatado na literatura até o momento, não dependem exclusivamente do Cu para realizar suas funções. No entanto, algumas proteínas expressas são metaloproteínas ativadas por metais bivalentes, como as enolases (*ENO1*, *ENO2* e *ENO3*) e a *Alcohol dehydrogenase 1* (*ADH1*). As enolases são metaloenzimas que participam da via glicolítica sendo ativadas preferencialmente pelo Mg^{2+} . A *ADH1* faz parte de uma classe de enzimas dependentes de Zn^{2+} responsáveis pela oxidação e redução de uma ampla variedade de álcoois e aldeídos (Edenberg e Bosron, 2018). Estas enzimas são extremamente abundantes no fígado e no presente estudo foram identificadas em vários *spots* proteicos que apresentaram expressões divergentes. Por esta razão, não foi possível avaliar a diferença na expressão dessas proteínas entre os grupos estudados através da técnica *2D-PAGE*. Porém, a presença de Cu nos *spots* onde as enolases (*spots* 02, 03, 10, 11, 14 e 15) e *ADH1* (*spots* 01, 05, 28 e 19) foram identificadas, pode indicar uma possível substituição do Mg^{2+} e Zn^{2+} pelo Cu^{2+} quando suplementado em níveis mais altos do que o recomendado.

Em 7 *spots* (*spots* 07, 12, 13, 18, 23, 27e 29) com a presença única de Cu, e 2 *spots* (*spots* 25 e 34) com a presença simultânea de Cu e Mn, foram expressas proteínas que normalmente não são conhecidas por apresentarem ligação com metais. Entre elas estão as proteínas envolvidas no metabolismo de carboidratos (*GAPDH*, *ALDOB*, *MDH1*), metabolismo do retinol (*ALDH1A1*, *ALDH1A2*), dobramento e redobramento de proteínas (*HSP90B1*, *HAP90AB1*, *HSPD1*, *HSPA9*, *HSPA5*, *HSPA8*, *Heat shock 70 kDa protein*), desintoxicação (*P4HB*, *GSTM2*, *Glutathione-s-transferase*) entre outros processos (*GLUD1*, *GOT2*, *RPLP0*). Isso pode ter ocorrido em virtude da afinidade do Cu^+ (estado reduzido) por grupos tiol e tioéter encontrados em resíduos de cisteínas e metioninas, e do Cu^{2+} (estado oxidado) por grupos de oxigênio encontrados em ácido aspártico e glutâmico, ou nitrogênio imidazol em resíduos de histidina (Festa e Thiele, 2011). Esta propriedade possibilita a interação do cobre com uma grande diversidade de proteínas, estabelecendo suas funções e estados estruturais, além de provocar efeitos prejudiciais em casos de excesso do metal (Inesi, 2017).

Smith et al. (2004) realizaram um estudo utilizando cromatografia de afinidade metálica (*IMAC*), *2D-PAGE* e espectrometria de massas para identificar proteínas hepatocelulares humanas com capacidade de ligação ao cobre. Os autores identificaram 19

proteínas microsossomais e 48 proteínas citosólicas com capacidade de ligação ao cobre. Entre elas encontram-se algumas proteínas homólogas as relatadas no presente estudo, como a *Protein disulfide isomerase*, *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*, *Heat shock protein 60 kD*, *Heat shock cognate 71 kD protein*, *Endoplasmic reticulum chaperone BiP* e *Aspartate aminotransferase*. Além dessas proteínas, foram detectadas proteínas comumente conhecidas por se ligarem a metais, como a *Albumin* (Cu), *Alcohol dehydrogenase* (Zn), α -*enolase* (Mg) e *Annexin V* (Ca), as quais também foram identificadas em nosso estudo. De acordo com os autores, é improvável que todas as proteínas identificadas se liguem ao cobre em condições fisiológicas normais, porém algumas proteínas podem ser alvos do cobre em condições de níveis elevados.

O manganês foi identificado unicamente em 10 *spots*, e em 5 *spots* simultaneamente com o Cu. Em 3 *spots* (*spots* 04, 09 e 31) com a presença única de Mn, e 2 *spots* (14 e 15) com Cu e Mn juntos, foram caracterizadas as *enolases* mencionadas anteriormente, indicando que assim como o Cu^{2+} , o Mn^{2+} pode substituir o Mg^{2+} nessas proteínas. Outros estudos evidenciaram que o Mn^{2+} pode substituir o Mg^{2+} em sítios ativos de muitas proteínas (González et al., 1984; Hohle e O'Brian, 2014; Khrustalev et al., 2016; Lakhin et al., 2014; Tholey et al., 1987). Essa substituição pode ocorrer em função do Mn^{2+} ser um ácido de Lewis duro, assim como o Mg^{2+} , o que permite que o inverso também ocorra (Reed e Poyner, 2000). Nos *spots* 19 e 24 foi caracterizada a *ADH1*, indicando ser uma proteína com potencial de ligação ao Mn, embora o Cu tenha demonstrado mais afinidade pelo maior número de *spots* associados a esse metal com a respectiva proteína.

Em relação as proteínas conhecidas de ligação ao Mn, foram identificadas 5 proteínas, sendo elas: *Regucalcin* (*spot* 04), *Trifunctional purine biosynthetic protein adenosine-3* (*spot* 04), *Glutamine synthetase* (*spot* 08 e 26), *Phosphoenolpyruvate carboxykinase [GTP], mitochondrial* (*spot* 26). A *Albumin* foi identificada em 3 *spots* com a presença única de Mn (*spots* 16, 22 e 26). Embora a albumina seja mais conhecida por ser ligar ao Cu^{2+} e Zn^{2+} fisiológicos, e ao Ni^{2+} e Cd^{2+} tóxicos (Bal et al. 2013), há relatos na literatura de que o Mn^{2+} possui dois sítios de ligação na Albumina, em que o sítio de ligação secundário do Mn^{2+} corresponde ao sítio de ligação primário do Zn^{2+} (Fanali et al., 2012), o que justifica a identificação da albumina nos *spots* com Mn.

De forma semelhante aos *spots* com Cu, nos *spots* associados unicamente ao Mn, também foram caracterizadas proteínas que não possuem relação direta conhecida com o metal, como *HSPA5*, *HSPA8*, *Heat shock 70 kDa protein*, *ALDH1A1*, *ALDH1A2*, *GAPDH*, *ALDOB*, *GLUD1*, *LDHB*, *TPI1* e *ATIC* (*spots* 09, 16, 22, 24, 30 e 33). Normalmente o

Mn²⁺ forma complexos relativamente fracos com muitos ligantes em comparação ao Cu²⁺ (Reed e Poyner, 2000) e isso refletiu na menor quantidade de *spots* associados ao Mn. Porém, a concentração de 120 mg kg⁻¹ de Mn na ração pode ter favorecido sua ligação com diferentes proteínas e consequentemente sua detecção nos *spots* proteicos.

4.3. Alterações na regulação de proteínas em resposta a diferentes fontes e níveis elevados de Cu e Mn

Na grande maioria dos *spots* proteicos foram caracterizadas mais de uma proteína e muitas proteínas foram identificadas em mais de um *spot*. De acordo com Zhang et al. (2016), uma proteína pode ser identificada em vários *spots* distribuídos em posições diferentes no gel devido a modificações pós-traducionais que provocam mudanças no pI e na massa molecular. Este fato explica a identificação da mesma proteína em múltiplos *spots* no presente estudo e sugere que essas modificações pós-traducionais podem estar envolvidas na resposta a suplementação de Cu e Mn acima dos níveis nutricionais. No entanto, este fator dificultou a avaliação da regulação de grande parte das proteínas (*upregulated* ou *downregulated*) entre os grupos estudados, uma vez que foram encontradas expressões divergentes dos respectivos *spots*. Por exemplo, a análise das vias *KEGG* revelou que umas das vias alteradas foram as vias da glicólise e gliconeogênese. Porém, a ampla distribuição das proteínas envolvidas nessas vias nos *spots* proteicos não permite qualquer inferência sobre sua relação com os tratamentos avaliados. Dessa forma, a discussão foi baseada em proteínas identificadas nos *spots* que apresentaram expressões consistentes.

A partir dos resultados do presente estudo, não é possível presumir com clareza que os níveis de 150 mg kg⁻¹ de Cu e 120 mg kg⁻¹ de Mn provocaram efeitos tóxicos nas aves. Entretanto, observa-se que a suplementação de Cu e Mn acima da recomendação nutricional alterou a expressão de *spots* contendo proteínas envolvidas em muitas vias metabólicas (Tabela 3), indicando que pode ter ocorrido um desequilíbrio homeostático o qual desencadeou a ativação de vários mecanismos para reestabelecer a homeostase.

As proteínas de choque térmico (*HSP90B1*, *HSP90AB1*, *HSPD1*, *HSPA9*, *HSPA5*, *HSPA8*, *Heat shock 70 kDa protein*) conhecidas como *HSPs*, foram reguladas positivamente (*spots* 12, 13 e 16) no grupo suplementado com sulfato de Cu e Mn em níveis elevados em relação ao grupo suplementado de acordo com as exigências dietéticas (S15-80). As *HSPs* estão envolvidas na resposta ao estresse sendo sensíveis a vários estressores, como oxidantes, toxinas, metais tóxicos, radicais livres, entre outros. Estas chaperonas

moleculares desempenham um papel fundamental no dobramento correto de proteínas, redobramento de proteínas mal dobradas, prevenção de agregados citotóxicos ou eliminação de proteínas danificadas durante o estresse celular (Ponomarenko et al., 2013). Neste sentido, as *HSPs* podem ter sido induzidas para suprimir os efeitos de um possível estresse oxidativo gerado pela suplementação de Cu e Mn acima da recomendação nutricional, uma vez que níveis elevados podem desencadear a formação de espécies reativas de oxigênio (ex. Reação de Fenton e Haber-Weiss) e alterar o funcionamento normal de muitas proteínas pelas quais possuem sítios de ligação.

As glutationas-s-transferases (*GSTs*) são enzimas que apresentam múltiplas funções e desempenham papel fundamental na proteção contra o estresse oxidativo, atuando principalmente na desintoxicação de vários compostos no fígado, como xenobióticos, produtos da peroxidação lipídica e íons metálicos (Awasthi et al., 1995; Lee et al., 2008; Sheehan et al., 2001; Wilczek et al., 2003). No grupo suplementado com níveis elevados de Cu e Mn a partir da fonte hidroxicloreto, foi observado a regulação positiva da *GST* e suas isoformas em relação ao grupo suplementado com níveis normais (*spots* 18 e 23). Estes resultados sugerem que a maior exposição ao Cu e Mn induziu a expressão das *GSTs*, o que por sua vez ativou as vias do metabolismo de drogas e xenobióticos pelo citocromo P450 (Tabela 3) para controlar os efeitos nocivos da suplementação dos minerais acima das exigências. Desse modo, levando em consideração os resultados do presente estudo, as *GSTs* e as *HSPs* parecem estar envolvidas na tolerância ao estresse por Cu e Mn, demonstrando ser potenciais candidatas a biomarcadores de exposição elevada desses metais em frangos de corte, sendo necessário mais estudos para investigar a sensibilidade e resposta dessas proteínas ao metais de forma individual, bem como a diferentes a fontes de suplementação mineral.

Os resultados do mapeamento de Cu e Mn nos *spots* proteicos dos grupos S150-120 e H150-120, demonstraram que os hidroxicloretos permitiram a maior incorporação desses minerais nas proteínas em relação aos sulfatos. Em contrapartida, foi observado menor expressão da maioria dos *spots* proteicos do grupo H150-120 quando comparado ao grupo ao S150-120. Considerando que os níveis de Cu e Mn estavam acima das exigências em ambos os grupos, e que os hidroxicloretos demonstraram ser mais biodisponíveis que os sulfatos, é provável que a maior disponibilização dos minerais pelos hidroxicloretos tenha provocado alterações nas proteínas nas quais o Cu e Mn se ligaram, e consequentemente alterou o funcionamento dessas proteínas resultando em menor expressão quando comparado aos sulfatos. Assim, tornam-se proeminentes os efeitos dos

níveis elevados de metais a partir de fontes mais biodisponíveis como os hidroxicloretos, em relação a fontes menos biodisponíveis.

5. Conclusão

No presente estudo, as concentrações de Cu e Mn nas amostras de tecido hepático, *pellets* e *spots* proteicos demonstraram que os hidroxicloretos de Cu e Mn são mais biodisponíveis em relação aos sulfatos. Além disso, a suplementação de Cu e Mn acima das exigências nutricionais induziu a expressão de proteínas de choque térmico (*HSPs*) e de desintoxicação (*GSTs*), sugerindo o envolvimento dessas proteínas na tolerância e estresse por metais.

6. Referências

- Awasthi, Y. C., Zimniak, P., Singhal, S. S., & Awasthi, S. (1995). Physiological role of glutathione S-transferases in protection mechanisms against lipid peroxidation: A commentary. *Biochemical Archives*, 11(2), 47–54.
- Bal, W., Sokołowska, M., Kurowska, E., & Faller, P. (2013). Binding of transition metal ions to albumin: Sites, affinities and rates. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1830(12), 5444–5455. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.06.018>
- Bao, Y. M., & Choct, M. (2009). Trace mineral nutrition for broiler chickens and prospects of application of organically complexed trace minerals: a review. *Animal Production Science*, 49(4), 269–282. <https://doi.org/10.1071/EA08204>
- Bao, Y. M., Choct, M., Iji, P. A., & Bruerton, K. (2007). Effect of Organically Complexed Copper, Iron, Manganese, and Zinc on Broiler Performance, Mineral Excretion, and Accumulation in Tissues. *Journal of Applied Poultry Research*, 16(3), 448–455. <https://doi.org/10.1093/japr/16.3.448>
- Braga, C. P., Vieira, J. C. S., Grove, R. A., Boone, C. H. T., Leite, A. D. L., Buzalaf, M. A. R., Fernandes, A. A. H., Adamec, J., & Padilha, P. D. M. (2017). A proteomic approach to identify metalloproteins and metal-binding proteins in liver from diabetic rats. *International Journal of Biological Macromolecules*, 96, 817–832. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.12.073>

- Cromwell, G. L., Lindemann, M. D., Monegue, H. J., Hall, D. D., & Orr, D. E. (1998). Tribasic Copper Chloride and Copper Sulfate as Copper Sources for Weanling Pigs. *Journal of Animal Science*, 76, 118–123. <https://doi.org/10.2527/1998.761118x>
- Doumas, B. T., Bayse, D. D., Carter, R. J., Peters, J. R., & Schaffer, R. A. (1981). Candidate reference method for determination of total protein in serum. I. Development and validation. II. Tests for transferability. *Clinical Chemistry*, 27(10), 1651–1654.
- Edenberg, H. J., & Bosron, W. F. (2018). Alcohol Dehydrogenases. In *Comprehensive Toxicology: Third Edition* (Vols. 10–15, pp. 126–145). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.01962-0>
- Fanali, G., Cao, Y., Ascenzi, P., & Fasano, M. (2012). Mn (II) binding to human serum albumin: A ¹H-NMR relaxometric study. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 117, 198–203. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2012.08.013>
- Festa, R. A., & Thiele, D. J. (2011, November 8). Copper: An essential metal in biology. *Current Biology*, 21(21), 877–883. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.09.040>
- Geng, Y., Sun, X., Lu, L., Lin, X., Liao, X., Zhang, L., Wang, R., & Luo, X. (2022). Effect of in ovo manganese injection on the embryonic development, antioxidation, hatchability, and performances of offspring broilers under normal and high temperatures. *Poultry Science*, 101(8), 101936. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.101936>
- González, R., Carvajal, N., & Morán, A. (1984). Differences between magnesium-activated and manganese-activated pyruvate kinase from the muscle of *Concholepas Concholepas*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 78(2), 389–392. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(84\)90047-6](https://doi.org/10.1016/0305-0491(84)90047-6)
- Hohle, T. H., & O'Brian, M. R. (2014). Magnesium-dependent processes are targets of bacterial manganese toxicity. *Molecular Microbiology*, 93(4), 736–747. <https://doi.org/10.1111/mmi.12687>
- Hu, Y., Chen, Z., Lu, L., Zhang, L., Liu, T., Luo, X., & Liao, X. (2022). Determination of dietary copper requirement by the monoamine oxidase activity in kidney of broilers

- from 1 to 21 days of age. *Animal Nutrition*, 8(1), 227–234. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2021.05.013>
- Inesi, G. (2017). Molecular features of copper binding proteins involved in copper homeostasis. *IUBMB Life*, 69(4), 211–217. <https://doi.org/10.1002/iub.1590>
- Jasek, A., Coufal, C. D., Parr, T. M., & Lee, J. T. (2019). Evaluation of Increasing Manganese Hydroxychloride Level on Male Broiler Growth Performance and Tibia Strength. *Journal of Applied Poultry Research*, 28(4), 1039–1047. <https://doi.org/10.3382/japr/pfz065>
- Khrustalev, V. V., Barkovsky, E. V., & Khrustaleva, T. A. (2016). Magnesium and manganese binding sites on proteins have the same predominant motif of secondary structure. *Journal of Theoretical Biology*, 395, 174–185. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2016.02.006>
- Kim, J. W., & Kil, D. Y. (2015). Determination of relative bioavailability of copper in tribasic copper chloride to copper in copper sulfate for broiler chickens based on liver and feather copper concentrations. *Animal Feed Science and Technology*, 210, 138–143. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2015.09.022>
- Lakhin, A. v., Tarantul, V. Z., & Gening, L. v. (2014). Manganese-induced infidelity of DNA synthesis as a possible cause of manganism. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*, 29(1), 16–22. <https://doi.org/10.3103/S0891416814010030>
- Lee, K. W., Raisuddin, S., Rhee, J. S., Hwang, D. S., Yu, I. T., Lee, Y. M., Park, H. G., & Lee, J. S. (2008). Expression of glutathione S-transferase (GST) genes in the marine copepod *Tigriopus japonicus* exposed to trace metals. *Aquatic Toxicology*, 89(3), 158–166. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2008.06.011>
- Liao, X. D., Wang, G., Lu, L., Zhang, L. Y., Lan, Y. X., Li, S. F., & Luo, X. G. (2019). Effect of manganese source on manganese absorption and expression of related transporters in the small intestine of broilers. *Poultry Science*, 98(10), 4994–5004. <https://doi.org/10.3382/ps/pez293>
- Lima, P. M. de, Cavalcante, J., Vieira, S., Cavecci-mendonça, B., Fleuri, L. F., Leite, A. D. L., Afonso, M., Buzalaf, R., Pezzato, L. E., & Braga, C. P. (2019). Identification

- of Zinc Absorption Biomarkers in Muscle Tissue of Nile Tilapia Fed with Organic and Inorganic Sources of Zinc Using Metallomics Analysis. *Biological Trace Element Research*, 190, 1–14. [https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s12011-019-01765-9](https://doi.org/10.1007/s12011-019-01765-9)
- Lu, W. B., Kuang, Y. G., Ma, Z. X., & Liu, Y. G. (2020). The effect of feeding broiler with inorganic, organic, and coated trace minerals on performance, economics, and retention of copper and zinc. *Journal of Applied Poultry Research*, 29(4), 1084–1090. <https://doi.org/10.1016/j.japr.2020.10.002>
- Meng, T., Gao, L., Xie, C., Xiang, Y., Huang, Y., Zhang, Y., & Wu, X. (2021). Manganese methionine hydroxy analog chelated affects growth performance, trace element deposition and expression of related transporters of broilers. *Animal Nutrition*, 7(2), 481–487. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2020.09.005>
- Moraes, P. M., Santos, F. A., Padilha, C. C. F., Vieira, J. C. S., Zara, L. F., & de M. Padilha, P. (2012). A preliminary and qualitative metallomics study of mercury in the muscle of fish from amazonas, Brazil. *Biological Trace Element Research*, 150(1–3), 195–199. <https://doi.org/10.1007/s12011-012-9502-x>
- Neves, R. C. F., Moraes, P. M., Saleh, M. A. D., Loureiro, V. R., Silva, F. A., Barros, M. M., Padilha, C. C. F., Jorge, S. M. A., & Padilha, P. M. (2009). FAAS determination of metal nutrients in fish feed after ultrasound extraction. *Food Chemistry*, 113(2), 679–683. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.07.070>
- Ponomarenko, M., Stepanenko, I., & Kolchanov, N. (2013). Heat Shock Proteins. In *Brenner's Encyclopedia of Genetics: Second Edition* (pp. 402–405). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.00685-9>
- Reed, G. H., & Poyner, R. R. (2000). Mn²⁺ as a Probe of Divalent Metal Ion Binding and Function in Enzymes and Other Proteins. In A. Sigel & H. Sigel (Eds.), *Metal ions in biological systems* (Vol. 37, pp. 183–207). CRC Press.
- Rostagno, H. S., Albino, L. F. T., Hannas, M. I., Donzele, J. L., Sakomura, N. K., Alysson, F. G. P., Saraiva, A., Teixeira, M. L., Rodrigues, P. B., Oliveira, R. F. de, Barreto, S. L. de T., & Brito, C. O. (2017). Tabelas brasileiras para aves e suínos. In H. S.

Rostagno (Ed.), *Tabelas brasileiras aves e suínos* (4th ed.). Departamento de Zootecnia - UFV.

- Sheehan, D., Meade, G., Foley, V. M., & Dowd, C. A. (2001). Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochemical Journal*, 360, 1–16. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3600001>
- Smith, S. D., She, Y. M., Roberts, E. A., & Sarkar, B. (2004). Using immobilized metal affinity chromatography, two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry to identify hepatocellular proteins with copper-binding ability. *Journal of Proteome Research*, 3(4), 834–840. <https://doi.org/10.1021/pr049941r>
- Sun, Y., Geng, S., Yuan, T., Liu, Y., Zhang, Y., Di, Y., Li, J., & Zhang, L. (2021). Effects of manganese hydroxychloride on growth performance, antioxidant capacity, tibia parameters and manganese deposition of broilers. *Animals*, 11(12). <https://doi.org/10.3390/ani11123470>
- Tholey, G., Bloch, S., Ledig, M., Mandel, P., & Wedler, F. (1987). Chick Brain Glutamine Synthetase and Mn^{2+} - Mg^{2+} Interactions. *Neurochemical Research*, 12(11), 1041–1047. <https://doi.org/10.1007/BF00970934>
- Wilczek, G., Kramarz, P., & Babczynska. (2003). Activity of carboxylesterase and glutathione S-transferase indifferent life-stages of carabid beetle (*Poecilus cupreus*) exposed to toxic metal concentrations. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 134(4), 501–512. [https://doi.org/10.1016/s1532-0456\(03\)00039-5](https://doi.org/10.1016/s1532-0456(03)00039-5)
- Zhang, H., Xia, Y., Chen, C., Zhuang, K., Song, Y., & Shen, Z. (2016). Analysis of copper-binding proteins in rice radicles exposed to excess copper and hydrogen peroxide stress. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01216>

MATERIAL SUPLEMENTAR

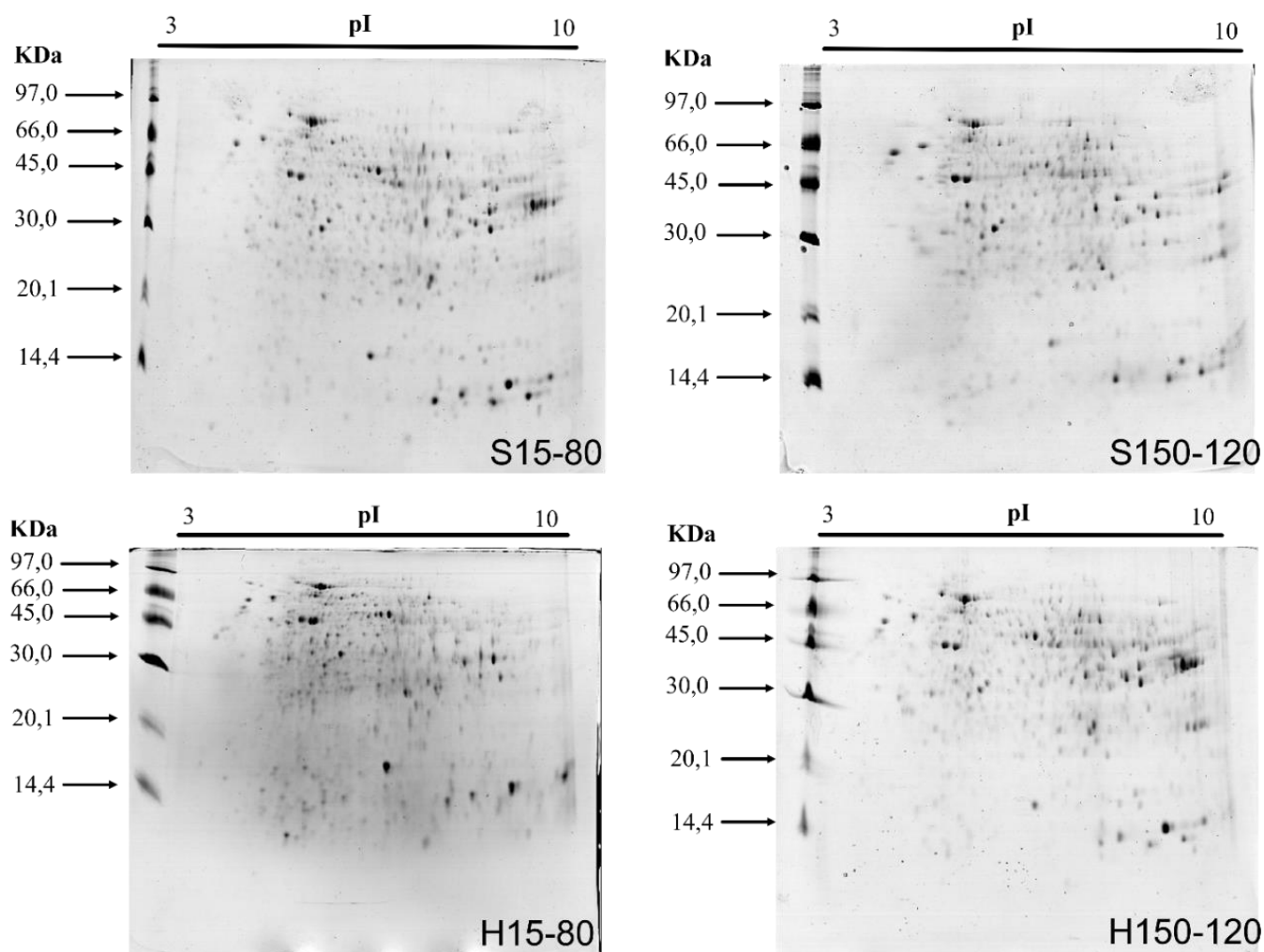


Figura S1. Representação dos géis de poliacrilamida obtidos por 2D-PAGE do *pool* de amostras do tecido hepático de frangos de corte suplementados com diferentes fontes e níveis de Cu e Mn. S15-80 (15 mg kg⁻¹ de sulfato de Cu e 80 mg kg⁻¹ de sulfato de Mn), S150-120 (150 mg kg⁻¹ de sulfato de Cu e 120 mg kg⁻¹ de sulfato de Mn), H15-80 (15 mg kg⁻¹ e hidroxiclreto de Cu e 80 mg kg⁻¹ de hidroxiclreto de Mn) e H150-120 (150 mg kg⁻¹ de hidroxiclreto de Cu e 120 mg kg⁻¹ de hidroxiclreto de Mn).

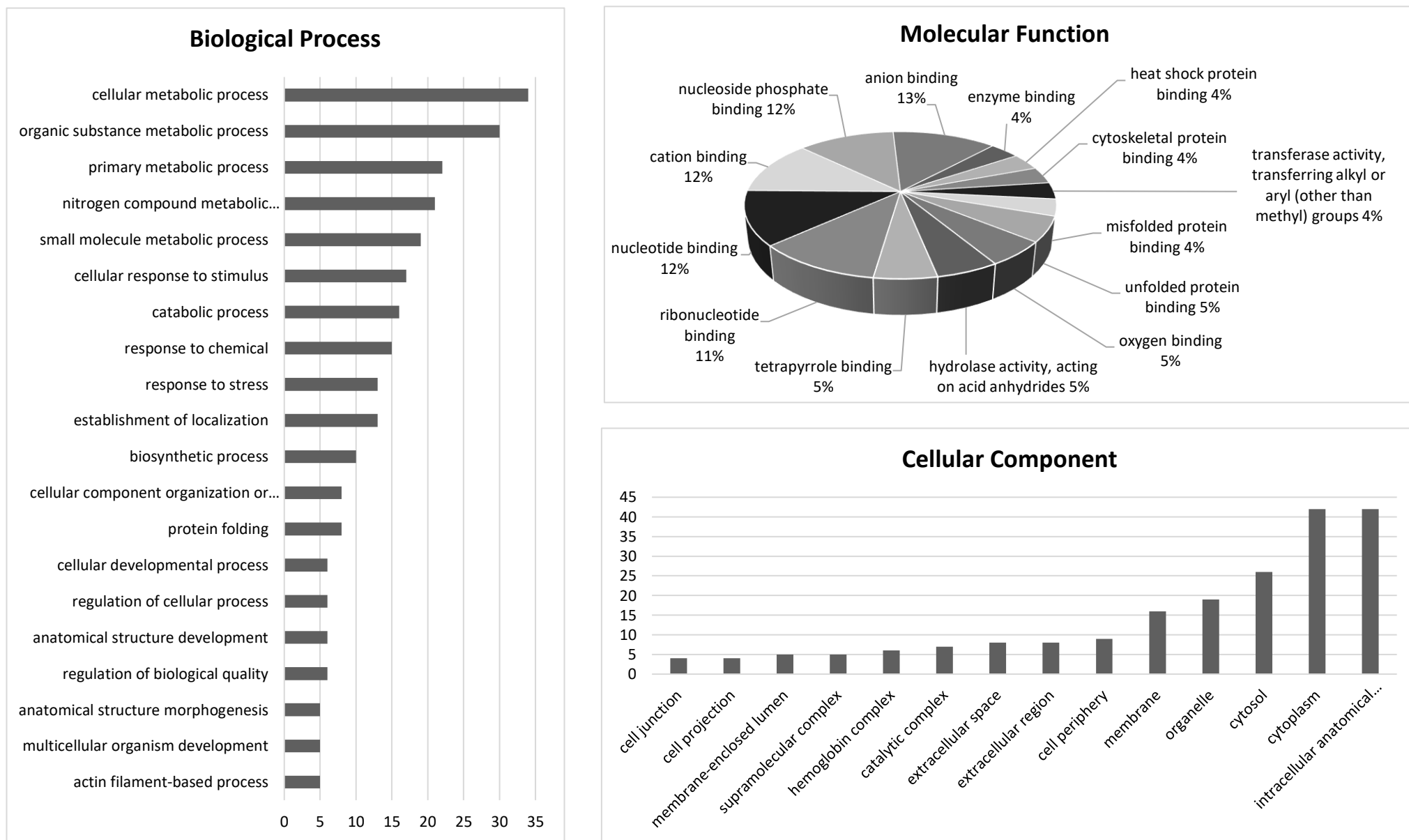


Figura S2. Anotação funcional das proteínas identificadas nos *spots* proteicos associados ao cobre e manganês (2D-PAGE/GFAAS) utilizando o *software* Blast2GO.

CAPÍTULO 3

Estudo proteômico do plasma de frangos de corte suplementados com diferentes fontes e níveis de cobre e manganês

RESUMO

O objetivo com o presente estudo foi avaliar a expressão diferencial das proteínas plasmáticas de frangos de corte suplementados com diferentes fontes e níveis de cobre e manganês. Para o estudo foram considerados dois níveis de cobre (15 e 150 mg kg⁻¹) e manganês (80 e 120 mg kg⁻¹) suplementados a partir de sulfatos e hidroxicloretos, totalizando quatro grupos experimentais: 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). Amostras de sangue foram coletadas de 10 aves/grupo para obtenção do plasma. A partir das amostras de plasma de cada ave do mesmo tratamento, foram feitos quatro *pools* correspondendo aos grupos avaliados. O fracionamento das proteínas plasmáticas foi realizado por eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D-PAGE). Os géis obtidos em triplicata por grupo foram digitalizados e analisados utilizando o *software ImageMaster Platinum v.7.0*. Os *spots* que apresentaram diferença na expressão foram extraídos dos géis para identificação das proteínas por espectrometria de massas em sequência acoplada com cromatografia líquida (LC-MS/MS). Por meio da espectrometria de absorção atômica em chama (FAAS) foi realizada a quantificação de Cu e Mn nas amostras e *pellets* proteicos de plasma. As proteínas foram identificadas utilizando o banco de dados *UniProt* e a anotação funcional foi realizada pelo programa *Blast2GO*. A rede de interação proteína-proteína foi construída pelo banco de dados *String*, e a análise da via pelo banco de dados *Reactome*. As concentrações de Cu e Mn nas amostras e *pellets* proteicos foram maiores nos grupos S150-120 e H150-120 em comparação com os grupos S15-80 e H15-80 (P<0.05). O grupo H150-120 apresentou maior concentração de Mn quando comparado com S150-120 (P<0.05). O grupo S15-80 apresentou menor concentração de Cu e Mn quando comparado a todos os grupos (P<0.05). A análise dos géis revelou um total de 40 *spots* diferencialmente expressos entre os quatro tratamentos. A suplementação de níveis mais altos de Cu e Mn promoveu alterações nas proteínas implicadas principalmente nas vias da homeostase sugerindo estresse fisiológico.

Palavras-chaves: Eletroforese bidimensional, hidroxicloretos, microminerais, sulfatos

1. Introdução

Na avicultura a suplementação de microminerais é fundamental para o desenvolvimento normal e saúde das aves, uma vez que dietas formuladas a base de milho e farelo de soja não apresentam concentrações suficientes para suprir as exigências nutricionais (Hu et al., 2022; Lu et al., 2020). Entre os minerais mais estudados na nutrição de frangos de corte estão o cobre e o manganês, por exercerem diversos papéis importantes no metabolismo e impactar diretamente na produtividade em situações de deficiência (Brugger e Windisch, 2015; Geng et al., 2022; Hu et al., 2022). Por exemplo, tanto o cobre quanto o manganês são essenciais na defesa antioxidante por atuarem como cofatores catalíticos da superóxido dismutase (CuZn-SOD e Mn-SOD), além de muitas outras metaloproteínas envolvidas em várias funções bioquímicas vitais para os animais e humanos (Geng et al., 2022; Horn e Barrientos, 2008; Hu et al., 2022; Meng et al., 2021).

O cobre e manganês geralmente são suplementados a partir de fontes inorgânicas como sulfatos, óxidos e carbonatos. Embora essas fontes tenham baixo custo e grande oferta comercial, a baixa biodisponibilidade mineral apresentada estimula a suplementação em quantidades elevadas podendo exceder os níveis nutricionais recomendados e, conseqüentemente, causar efeitos indesejáveis na saúde das aves (Lu et al., 2020; Meng et al., 2021; Underwood e Suttle, 1999). Por esta razão, a utilização de fontes inorgânicas apresenta desafios significativos, impulsionando a busca e o desenvolvimento de outras formas de suplementação mineral mais eficientes (Bao e Choct, 2009). Os hidroxicloretos consistem em uma alternativa com características promissoras para substituir as fontes tradicionalmente utilizadas. Devido a sua estrutura cristalina, os hidroxicloretos podem proporcionar uma liberação mais lenta dos minerais no tratogastrointestinal, além de possuírem menor higroscopicidade e solubilidade em água, tornando-os menos reativos com outros nutrientes da ração (Lu et al., 2010; Miles et al., 1998; Olukosi et al., 2019).

Estudos foram realizados para comparar os hidroxicloretos com outras fontes, bem como os efeitos da suplementação de diferentes níveis sobre parâmetros como, desempenho, características de carcaça e conteúdo mineral no fígado, plasma e osso tibial (Kim e Kil, 2015; M'Sadeq et al., 2018; Nguyen et al., 2020; Olukosi et al., 2018; Sun et al., 2021). No entanto, faltam estudos adicionais para avaliar a influência sobre o perfil proteico de tecidos e fluidos biológicos, tendo em vista que os microminerais, especialmente o cobre e manganês, atuam como componentes metálicos de muitas

proteínas. Além disso, a análise da expressão de proteínas permite estudar os mecanismos envolvidos na tolerância e desintoxicação de metais, uma vez que o proteoma responde a diversas condições estressantes sendo extremamente útil na avaliação de altas concentrações de minerais (Ruas et al., 2019). Neste sentido, a presente pesquisa é um estudo preliminar no qual foi utilizada a técnica proteômica de eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D-PAGE), com o objetivo de avaliar o proteoma plasmático de frangos de corte suplementados com dois níveis de Cu (15 e 150 mg kg⁻¹) e Mn (80 e 120 mg kg⁻¹) por meio de sulfatos e hidroxicloretos.

2. Material e métodos

Os procedimentos experimentais realizados no presente estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, da Universidade Estadual Paulista (UNESP), sob o protocolo CEUA 0191/2018.

2.1. Aves, grupos experimentais e coleta das amostras

Para o estudo proteômico foram utilizadas amostras de plasma de 40 frangos de corte machos da linhagem Cobb® 500. As aves foram distribuídas em quatro grupos experimentais considerando duas fontes de suplementação de cobre e manganês (sulfato e hidroxiclreto), com níveis de acordo com as recomendações de Rostagno et al. (2017) (15 e 80 mg kg⁻¹ de Cu e Mn respectivamente) e níveis acima das recomendações (150 e 120 mg kg⁻¹ de Cu e Mn respectivamente) (Tabela 1).

Tabela 1. Descrição dos grupos experimentais.

Grupos experimentais		Cu (mg kg ⁻¹)	Mn (mg kg ⁻¹)
Sulfatos	S15-80	15	80
	S150-120	150	120
Hidroxicloretos	H15-80	15	80
	H150-120	150	120

As aves receberam ração e água *ad libitum* por meio de comedouro tubular e bebedouro tipo *nipple* em boxes de 2,0m² forrados com cama de maravalha reutilizada. As dietas formuladas à base de milho e farelo de soja foram divididas em quatro fases: pré-inicial (1-7 dias); inicial (8-21 dias); crescimento (22-35 dias); e final (35-42 dias). O aquecimento das aves foi realizado até o 14º dia de idade com uso de lâmpadas infravermelhas (250 watts) e o programa de luz foi seguido conforme as recomendações do manual da linhagem utilizando timer com lâmpadas de 20 watts.

Aos 42 dias de idade, foram realizadas coletas de sangue via punção da veia jugular procedendo-se a centrifugação a 671 *g* durante 15 minutos em tubos com heparina sódica para obtenção do plasma. Após a separação do plasma, as amostras foram transferidas para criotubos e armazenadas imediatamente em freezer -80°C até a realização da análise proteômica. Previamente aos ensaios proteômicos, foram feitos quatro *pools* a partir das amostras de plasma de 10 aves por grupo resultando nos quatros tratamentos avaliados.

2.2. Extração, precipitação e determinação da proteína total

Para a extração das proteínas foram adicionados em microtubos 100 μL de *pool* de plasma de cada grupo e 200 μL de água ultrapura (18,2 $\text{M}\Omega\text{ cm}^{-1}$). Logo após, foi realizada a centrifugação à 9503 *g* e 4°C durante 15 minutos. Posteriormente os sobrenadantes foram coletados e transferidos para novos microtubos onde foi adicionado 900 μL de acetona gelada 80% (v/v), permanecendo sob refrigeração por 2 h à 4°C para a precipitação das proteínas. Em seguida, as amostras foram centrifugadas novamente durante 10 minutos à 9503 *g* e 4°C. Após obtenção dos *pellets* proteicos, os mesmos foram solubilizados em vórtex com 1000 μL de etanol gelado procedendo-se a centrifugação à 9503 *g* por 5 minutos. Esse procedimento foi realizado duas vezes.

Para determinar a concentração de proteína total, uma parte dos *pellets* proteicos foi utilizada seguindo o método de Biureto e utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão (Doumas et al., 1981). Resumidamente, os *pellets* foram solubilizados em 100 μL de NaOH a 0,5 mol L^{-1} , e então alíquotas de 50 μL do solubilizado anterior e 2,5 mL de reativo de Biureto foram adicionadas em tubos de 5 mL e levados para banho maria a 32°C por 10 minutos. Também foi preparado um branco com água ultrapura seguindo os mesmos procedimentos descritos acima. Após o banho maria, as amostras foram mantidas em temperatura ambiente durante 5 minutos e então transferidas para cubetas de 1cm de largura, sendo realizadas as leituras das absorbâncias em espectrofotômetro UV/Visível no comprimento de onda de a 545 nm.

2.3. Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D-PAGE) e análise dos géis

Para o fracionamento do proteoma plasmático por 2D-PAGE foram preparadas soluções contendo 1,50 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ de proteína total a partir da solubilização dos *pellets* proteicos em tampão contendo 7 mol L^{-1} de ureia; 2 mol L^{-1} de tiureia; 2% (m/v) de CHAPS (3-[(3-colaminopropil)-dimetilamônio]-1-propano sulfonato); 0.5% (v/v)

anfólitos pH variando de 3 a 10; e 0,002% (m/v) de azul de bromofenol. Em seguida, três fitas de 13 cm por grupo (contendo gel pré-fabricado e anfólitos de gradiente de pH de 3 a 10) foram hidratadas com alíquotas de 250 μ L das soluções dos *pellets* (correspondendo a 375 μ g de proteína) em uma caixa de hidratação específica. As fitas permaneceram por 12 horas em temperatura ambiente cobertas com óleo mineral para evitar a evaporação da amostra. Após 12 horas, as fitas foram transferidas para o sistema de focalização isoeletrica (IEF) EttanTMIPGphorTM 3 - IEF (GE Healthcare, Uppsala, Suécia), no qual as proteínas foram separadas de acordo com seus pontos isoeletricos (*pIs*), primeira dimensão da eletroforese bidimensional (Garcia et al., 2006). O tempo de corrida foi de cinco horas.

Finalizado o procedimento de IEF, as fitas passaram por etapas de equilíbrio por um período de 15 minutos com solução de ditioneitol (DTT) sob agitação suave, seguida da solução de iodoacetamida repetindo o mesmo processo. Posteriormente as fitas foram posicionadas no topo de géis de poliacrilamida 12,5% (v/v) preparados entre placas de vidro (180 x 160 x 1,5 mm) e ao lado das fitas também foi adicionado um marcador por meio de papel filtro contendo proteínas com massas moleculares conhecidas (β -fosforilase: 97,0 kDa), albumina: 66,0 kDa, ovoalbumina: 45,0 kDa, anidrase carbônica: 30,0 kDa, inibidor de tripsina: 20,1 kDa e α -lactalbumina: 14,4 kDa). Em seguida foi realizada a corrida eletroforética onde ocorre o fracionamento das proteínas de acordo com suas respectivas massas moleculares (segunda dimensão da 2D-PAGE). Para isso foi aplicada uma tensão de 100 volts durante os 30 minutos iniciais, sendo posteriormente alterada para 180 volts por um período de três horas e quarenta minutos.

Ao final da corrida eletroforética os géis foram removidos do sistema de placas de vidros e imersos em solução fixadora (ácido acético 10% (v/v) e etanol 40% (v/v)) durante 30 minutos. Em seguida a solução foi retirada e os géis foram imersos em corante Coomassie G-250 coloidal (USB, Cleveland, Ohio, Estados Unidos) e mantidos sob agitação suave por um período de 72 horas. Após esse período o corante foi removido e os géis foram lavados com água ultrapura até a visualização dos *spots* proteicos. Os géis foram digitalizados em um *scanner* específico e as imagens analisadas no *software Image Master Platinum v.7.0*, sendo obtidos o número de *spots*, percentual de correlação (*matching*) entre as repetições de géis, e os valores de ponto isoeletrico (*pI*) e massa molecular (MM) experimental de cada *spot*. Por meio do mesmo *software* foi realizada a análise de expressão dos *spots* proteicos (*upregulation* e *downregulation*), sendo considerado expressão significativa quando o *spot* apresentava diferença mínima de 1,3

vezes na abundância (*fold change*) e $P < 0,05$. Foram considerados três géis por tratamento e as seguintes comparações relevantes para o estudo: S150-120 x S15-80; H15-80 x S15-80; H150-120 x S150-120; e H150-120 x H15-80.

2.4. Espectrometria de massas

Os *spots* que apresentaram expressão significativa foram extraídos dos géis e seccionados em segmentos de aproximadamente 1 mm^3 . Posteriormente foi realizada a remoção do corante, redução, alquilação e digestão trípica das proteínas com solução de tripsina na concentração de 10 ng mL^{-1} , conforme procedimentos descritos por Braga et al. (2017). Os peptídeos foram purificados utilizando colunas C18 ZipTip e posteriormente concentrados em concentrador a vácuo a aproximadamente $1 \mu\text{L}$. As sequências peptídicas provenientes da digestão trípica foram caracterizadas por espectrometria de massas em sequência acoplada com cromatografia líquida (LC-MS/MS). As soluções dos peptídeos eluídos foram analisadas utilizando o sistema nanoAcquity UPLC acoplado ao espectrômetro de massa Xevo Q-TOF G2 (Waters, Manchester, UK).

2.5. Análise de bioinformática

O banco de dados *UniProt* foi utilizado para identificação das proteínas e obtenção das sequências FASTA utilizadas na análise ontológica a partir do *software* Blast2GO v.6.0.3, o qual classificou as sequências de proteínas em três domínios: processo biológico, função molecular e componente celular. A rede de interação proteína-proteína foi construída por meio banco de dados online *String* (string-db.org v.11.5) com pontuação mínima de confiança exigida de 0,400 (confiança média). Foram consideradas as fontes de interação “experimentos”, “banco de dados”, “co-expressão” e “co-ocorrência”. A análise da via foi realizada utilizando a ferramenta do banco de dados de vias *Reactome* (<https://reactome.org/>) sendo considerado $\text{FDR} < 0.05$ para vias significativamente enriquecidas.

2.6. Quantificação de cobre e manganês nos *pellets* proteicos e amostras de plasma

A mineralização das amostras dos *pools* de plasma (duplicata) e dos *pellets* proteicos (triplicata) foi realizada com ácido sulfúrico concentrado (Baker) e peróxido de hidrogênio (Merck) 30% (m/m) mediante aquecimento em bloco digestor até a digestão completa (extrato transparente). Posteriormente os extratos ácidos foram avolumados para 5 mL em tubos aferidos e então procedeu-se a quantificação do cobre e manganês

por espectrometria de absorção atômica em chama (FAAS) utilizando espectrômetro Shimadzu AA – 6800. As curvas analíticas foram construídas utilizando soluções padrão de cobre e manganês em meio ácido clorídrico 0,10 mol L⁻¹ preparadas a partir da diluição dos padrões Titrisol MERK contendo 1000 mg L⁻¹ dos analíticos. Para os ajustes experimentais de análises foram utilizadas as condições descritas por Cavecci et al. (2015).

3. Resultados

Na Figura 1 estão apresentadas as imagens representativas dos géis digitalizados de cada grupo experimental. As triplicatas dos géis obtidos apresentaram número médio de 229 ± 17 spots e correspondência média de $99 \pm 1\%$, indicando boa reprodutibilidade e repetibilidade dos géis.

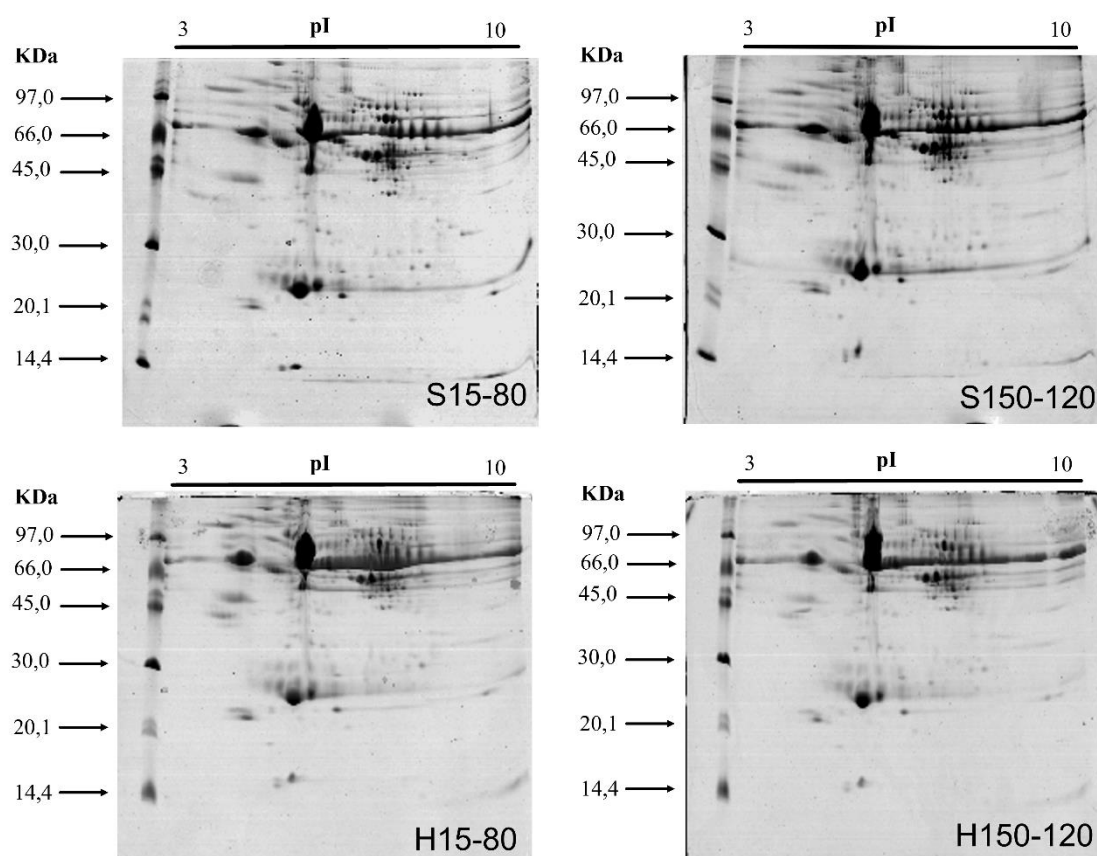


Figura 1. Representação dos géis de poliacrilamida obtidos por 2D-PAGE do pool de amostras de plasma de frangos de corte suplementados com diferentes fontes e níveis de Cu e Mn. S15-80 (15 mg kg⁻¹ de sulfato de Cu e 80 mg kg⁻¹ de sulfato de Mn), S150-120 (150 mg kg⁻¹ de sulfato de Cu e 120 mg kg⁻¹ de sulfato de Mn), H15-80 (15 mg kg⁻¹ e hidroxiclreto de Cu e 80 mg kg⁻¹ de hidroxiclreto de Mn) e H150-120 (150 mg kg⁻¹ de hidroxiclreto de Cu e 120 mg kg⁻¹ de hidroxiclreto de Mn).

Os resultados da quantificação de cobre e manganês nas amostras e *pellets* de plasma podem ser visualizados na Tabela 1. Nas amostras de plasma e *pellets* proteicos os grupos S150-120 e H150-120 apresentaram maiores concentrações de Cu, enquanto o grupo S15-80 apresentou a menor concentração ($P < 0.05$). Não houve diferença na concentração de Cu nas amostras e *pellets* entre os grupos S150-120 e H150-120. As diferenças nas concentrações de manganês entre os grupos nas amostras e *pellets* proteicos foram semelhantes às do cobre, exceto para o grupo H150-120 que apresentou concentração superior ao grupo S150-120 ($P < 0.05$).

Tabela 2. Concentrações de cobre e manganês nas amostras e *pellets* de plasma de frangos de corte suplementados com diferentes fontes e níveis de cobre e manganês.

Tratamentos	Concentração de Cu	Concentração de Mn
Plasma (mg L⁻¹)		
S15-80	2.65 ± 0.07 ^c	5.25 ± 0.07 ^d
S150-120	23.40 ± 0.28 ^a	16.85 ± 0.07 ^b
H15-80	5.75 ± 0.07 ^b	7.85 ± 0.07 ^c
H150-120	20.70 ± 0.14 ^a	20.45 ± 0.07 ^a
Pellet proteico (mg kg⁻¹)		
S15-80	1.67 ± 0.12 ^c	3.15 ± 0.09 ^d
S150-120	37.57 ± 0.97 ^a	25.33 ± 0.75 ^b
H15-80	3.57 ± 0.42 ^b	4.30 ± 0.10 ^c
H150-120	40.13 ± 0.61 ^a	32.70 ± 0.82 ^a

^{a,b,c,d} Médias seguidas de letras sobrescritas diferentes na coluna diferem pelo teste de Tukey ($P < 0.05$). S15-80 (15 mg kg⁻¹ de sulfato de Cu e 80 mg kg⁻¹ de sulfato de Mn), S150-120 (150 mg kg⁻¹ de sulfato de Cu e 120 mg kg⁻¹ de sulfato de Mn), H15-80 (15 mg kg⁻¹ de hidroxicloreto de Cu e 80 mg kg⁻¹ de hidroxicloreto de Mn) e H150-120 (150 mg kg⁻¹ de hidroxicloreto de Cu e 120 mg kg⁻¹ de hidroxicloreto de Mn).

A análise de expressão revelou um total de 40 *spots* diferencialmente expressos (“*fold change*” mínimo de 1.3, $P < 0.05$) entre os grupos. As proteínas identificadas nos *spots* apresentaram *pI* entre 4.80 e 9.07, e massa molecular entre 40 e 209 kDa. Em 9 *spots* não foram identificadas proteínas ou apresentaram proteínas com *score* muito baixo desqualificando-as do estudo. Na Tabela 3 estão apresentados 31 *spots* caracterizados com suas respectivas proteínas e diferenças nas abundancias relativas entre os grupos. O número de *spots* caracterizados com expressão significativa em cada comparação de grupos foi: 8 *spots* em S150-120xS15-80; 14 *spots* em H15-80xS15-80; 10 *spots* em H150-120xS150-120; e 5 *spots* em H150-120xH15-80.

Os resultados da análise dos termos de ontologia genética (GO) podem ser visualizados na Figura suplementar S1, sendo apresentado os processos biológicos,

funções moleculares e componentes celulares nas quais as proteínas foram associadas. Em geral, as proteínas identificadas estão envolvidas em processos metabólicos (15%), regulação biológica (15%), resposta a estímulos (14%), regulação de processos biológicos (13%), processos celulares (12%), resposta ao estresse (11%), entre outros. Dentre as funções moleculares, destacam-se ligação de proteína (21%), atividade de regulação enzimática (13%), atividade inibidora da função molecular (11%), ligação de íons metálicos (10%), atividade de hidrolase (10%), atividade catalítica agindo sobre uma proteína (8%) e atividade de serina hidrolase (6%). Em relação aos componentes celulares, a maioria das proteínas fazem parte da região extracelular (31%), membrana (13%), periferia celular (11%), estrutura anatômica intracelular (10%), citoplasma (9%), organelas (6%) e matriz extracelular (5%).

A rede de interação proteína-proteína está apresentada na Figura 2. Conforme os critérios adotados durante a análise, foram encontradas evidências de interação em 19 proteínas (*ALB*, *AMBP*, *APOA4*, *APOH*, *C3*, *C7*, *C8A*, *GC*, *FGA*, *FGB*, *FGG*, *HPX*, *ITIH2*, *ITIH3*, *PLG*, *SERPINA1*, *SERPINF2*, *TF* e *TTR*). A análise da via pelo *Reactome* resultou em 36 vias significativamente enriquecidas ($FDR < 0.05$) apresentadas na Tabela suplementar S1. Na figura 3, pode ser visualizada a visão hierárquica da análise da via baseada na super-representação do valor de P, demonstrando o envolvimento das proteínas nas vias da homeostase, organização da matriz extracelular e sistema imune inato.

Tabela 3. Proteínas caracterizadas nos *spots* proteicos diferencialmente expressos nos géis de poliacrilamida dos *pools* 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).

Spot ID	Acession	Gene	Protein	pI/MM (Da) teóricos	Score	H15-80 versus S15-80	H150-120 versus S150-120	H150-120 versus H15-80	S150-120 versus S15-80
3	R9PXM5	N/A	Immunoglobulin lambda like polypeptide 1	6.09/ 11417.69	2343.459			-1.362/+1.362	
	A0A3Q2UDC8	N/A	Ig-like domain-containing protein	4.99/ 9762.55	738.1473			-1.362/+1.362	
13	O93601	apoAIV	Apolipoprotein AIV	4.80/ 40852.86	1734.531				-1.325/+1.325
25	E1C7T1	SPIA1	Serpin peptidase inhibitor_ clade A (alpha-1 antiproteinase_ antitrypsin)_ member 1	6.08/ 48714.69	290.6664				+1.424/-1.424
	E1BV78	FGG	Fibrinogen gamma chain	5.47/ 49954.83	3348.089				+1.424/-1.424
26	F1P4V1	FGA	Fibrinogen alpha chain	5.69/82392.35	2692.128	+2.438/-2.438			
28	F1NUL9	FGB	Fibrinogen beta chain	7.85/ 55319.58	2491.537		-1.478/+1.478		
31	Q90WR3	N/A	Hemopexin (Fragment)	5.92/ 29384.78	15930.77		-1.740/+1.740		
38	F1NWX6	PLG	Plasminogen	7.92/ 90764.21	1504.657		-1.625/+1.625	-1.647/+1.647	
	Q7LZF3	N/A	Plasmin	8.29/10325.29	369.8466		-1.625/+1.625	-1.647/+1.647	
44	F1NUL9	FGB	Fibrinogen beta chain	7.85/ 55319.58	1836.466	+1.919/-1.919		-1.339/+1.339	-1.753/+1.753
	Q9W6F5	VTDB	Vitamin D-binding protein	6.47/ 53686.59	1368.327	+1.919/-1.919		-1.339/+1.339	-1.753/+1.753
48	Q90633	N/A	Complement C3	6.69/ 184086.42	864.9603				-1.328/+1.328
	F1DQG4	C7	Complement component 7	5.96/ 93012.62	292.7017				-1.328/+1.328
	A6N9E0	C3d	Complement component 3d (Fragment)	9.01/ 36550.12	255.618				-1.328/+1.328
50	A0A3Q2U3V9	LOC100858647	Beta-microseminoprotein-like	8.32/ 12421.55	1290.518				-1.626/+1.626

	Q7LZS1	N/A	12K serum protein_ beta-2-m cross-reactive (Fragment)	5.01/ 3974.64	654.4376	-1.626/+1.626
54	A0A1D5NXA6	ITIH3	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 3	5.58/ 72500.59	2022.493	+1.373/-1.373
	B3VE14	ITIH2	Inter-alpha inhibitor heavy chain 2	6.92/ 106767.87	903.7598	+1.373/-1.373
	A0A1D5PU00	AMBP	Protein AMBP	5.59/ 38457.56	878.0583	+1.373/-1.373
56	A0A3Q2UFG5	N/A	Ig-like domain-containing protein	9.07/ 10384.62	3791.357	-1.426/+1.426
	A2N881	N/A	VH1 protein	9.10/12247.88	1697.29	-1.426/+1.426
	A0A1D5NW68	ALB	Albumin	5.29/ 64004.39	767.5627	-1.426/+1.426
	F1NJU5	C8A	Complement C8 alpha chain	6.11/ 67725.13	431.8983	-1.426/+1.426
59	A0A1I7Q422	TTR	Transthyretin	4.97/ 18539.00	1194.293	-1.349/+1.349
64	A0A1D5PW77	LOC776376	C-reactive protein_ pentraxin-related	6.31/ 34987.04	1473.075	+2.030/-2.030
	Q2EJU6	CRP	Pentaxin	6.33/ 25660.32	260.4364	+2.030/-2.030
67	F1NW43	PKLR	Pyruvate kinase	7.97/ 57873.81	2774.254	+1.802/-1.802
	F1NUL9	FGB	Fibrinogen beta chain	7.85/ 55319.58	1133.725	+1.802/-1.802
68	F1NUL9	FGB	Fibrinogen beta chain	7.85/ 55319.58	2847.544	+2.262/-2.262
	F1NW43	PKLR	Pyruvate kinase	7.97/ 57873.81	1418.43	+2.262/-2.262
	A0A1D5PNU2	APOH	Beta-2-glycoprotein 1	8.60/ 41093.29	361.6708	+2.262/-2.262
	F1P4V1	FGA	Fibrinogen alpha chain	5.69/82392.35	247.5071	+2.262/-2.262
70	A0A3Q2UFG5	N/A	Ig-like domain-containing protein	9.07/ 10384.62	4344.046	+2.414/-2.414
	A0A1D5NW68	ALB	Albumin	5.29/ 64004.39	3554.366	+2.414/-2.414

	A2N881	N/A	VH1 protein	9.10/12247.88	2203.052	+2.414/-2.414
	F1ND07	PSME4	Proteasome activator subunit 4	6.67/ 209793.34	162.0611	+2.414/-2.414
	A0A3Q2UFG5	N/A	Ig-like domain-containing protein	9.07/ 10384.62	1259.289	+5.128/-5.128
71	A0A1D5NW68	ALB	Albumin	5.29/ 64004.39	658.7015	+5.128/-5.128
	A2N881	N/A	VH1 protein	9.10/12247.88	886.9579	+5.128/-5.128
72	Q4ADJ7	TFEW	Ovotransferrin	6.85/ 77831.61	12703.08	-1.394/+1.394
	A0A3Q2UFG5	N/A	Ig-like domain-containing protein	9.07/ 10384.62	4764.221	-1.439/+1.439
73	A2N881	N/A	VH1 protein	9.10/12247.88	1486.285	-1.439/+1.439
	F1NWX6	PLG	Plasminogen	7.92/ 90764.21	1435.87	+1.741/-1.741
75	Q7LZF3	N/A	Plasmin	8.29/10325.29	580.665	+1.741/-1.741
	A0A3Q2U3V9	LOC100858647	Beta-microseminoprotein-like	8.32/ 12421.55	689.0574	+1.382/-1.382
79	Q7LZS1	N/A	12K serum protein_ beta-2-m cross-reactive (Fragment)	5.01/ 3974.64	515.8345	+1.382/-1.382
98	A0A1D5NW68	ALB	Albumin	5.29/ 64004.39	6786.945	+2.293/-2.293
100	A0A1L1RIW5	KRT8	Keratin 8	5.79/ 60513.22	151.5625	-2.011/+2.011
	A0A1D5PNU2	APOH	Beta-2-glycoprotein 1	8.60/ 41093.29	3404.912	-1.507/+1.507
	F1NUL9	FGB	Fibrinogen beta chain	7.85/ 55319.58	3101.555	-1.507/+1.507
104	F1P4V1	FGA	Fibrinogen alpha chain	5.69/82392.35	2380.485	-1.507/+1.507
	F1NW43	PKLR	Pyruvate kinase	7.97/ 57873.81	363.0029	-1.507/+1.507
	A0A1L1RIW5	KRT8	Keratin 8	5.79/ 60513.22	347.331	-1.507/+1.507
105	E1BV78	FGG	Fibrinogen gamma chain	5.47/ 49954.83	19501.08	-1.909/+1.909

	A0A1D5NW68	ALB	Albumin	5.29/ 64004.39	1006.718	-1.909/+1.909
	F1ND07	PSME4	Proteasome activator subunit 4	6.67/ 209793.34	171.9035	-1.909/+1.909
106	Q98TD1	PIT 54	PIT 54	4.61/50821.51	9397.017	-1.308/+1.308
	A0A3Q2UF48		Peptidase S1 domain-containing protein	6.30/20380.13	862.9152	-1.308/+1.308
	E1BV78	FGG	Fibrinogen gamma chain	5.47/ 49954.83	315.1335	-1.308/+1.308
	A0A1D5NW68	ALB	Albumin	5.29/ 64004.39	124.195	-1.308/+1.308
107	A0A3Q2UFG5	N/A	Ig-like domain-containing protein	9.07/ 10384.62	989.2745	-2.109/+2.109
108	F1NAR5	SERPINF2	Serpin family F member 2	4.84/ 56973.56	934.6506	-1.703/+1.703
	A0A1L1RIW5	KRT8	Keratin 8	5.79/ 60513.22	284.1509	-1.703/+1.703
111	F1NK40	A2ML4	Alpha-2-macroglobulin-like 4	5.98/163338.74	243.638	-1.425/+1.425
	E1BV78	FGG	Fibrinogen gamma chain	5.47/ 49954.83	203.0988	-1.425/+1.425
	H1AC38	N/A	A2M_recep domain-containing protein (Fragment)	6.15/ 30756.72	114.814	-1.425/+1.425
	Q90WR3	N/A	Hemopexin (Fragment)	5.92/ 29384.78	1525.618	-2.550/+2.550
112	A0A1D5PEU7	VNN1	Vanin 1	5.17/ 54664.46	613.8879	-2.550/+2.550
	Q5ZHM4	RCJMB04	CN hydrolase domain-containing protein	6.33/ 55399.28	595.0783	-2.550/+2.550

S15-80 (15 mg kg⁻¹ de sulfato de Cu e 80 mg kg⁻¹ de sulfato de Mn), S150-120 (150 mg kg⁻¹ de sulfato de Cu e 120 mg kg⁻¹ de sulfato de Mn), H15-80 (15 mg kg⁻¹ de hidroxicloreto de Cu e 80 mg kg⁻¹ de hidroxicloreto de Mn) e H150-120 (150 mg kg⁻¹ de hidroxicloreto de Cu e 120 mg kg⁻¹ de hidroxicloreto de Mn).

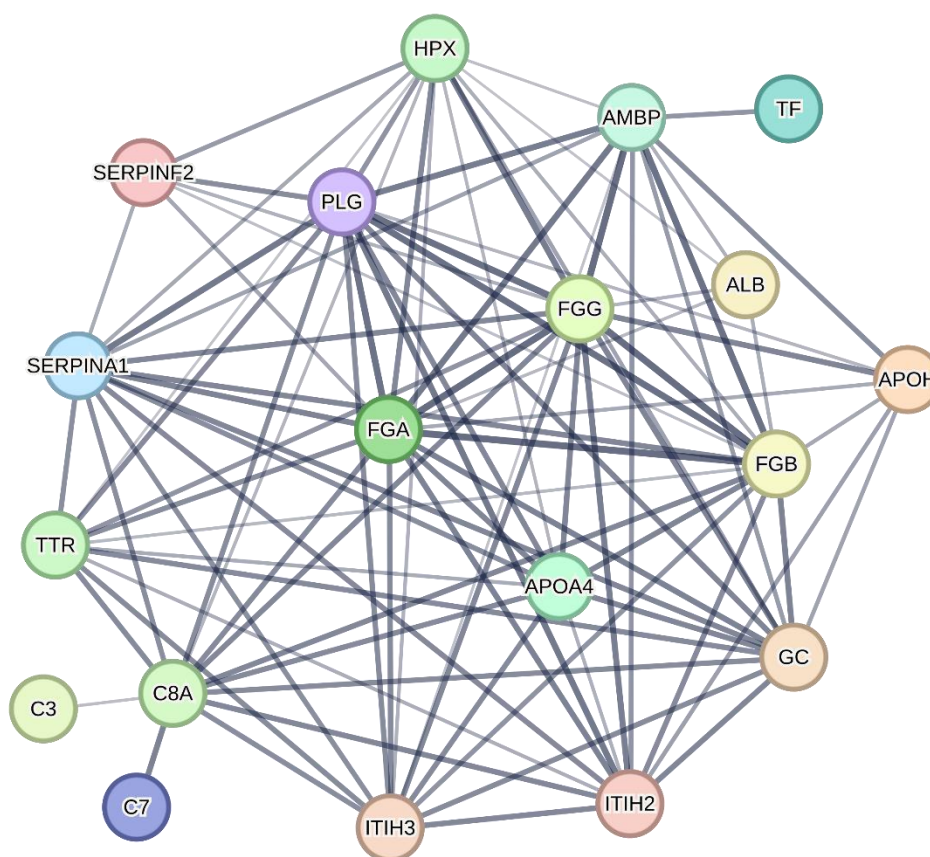


Figura 2. Rede de interação proteína-proteína das proteínas identificadas nos *spots* proteicos diferencialmente expressos nos géis de poliacrilamida das amostras de plasma de frangos de corte suplementados com diferentes níveis e fontes de cobre e manganês. Cada nó (esferas coloridas) representa uma proteína com o nome do respectivo gene centralizado. As linhas que conectam cada nó indicam evidência de interação entre as proteínas e a espessura das linhas indicam o nível de confiança da interação (quanto mais espessa maior o nível de confiança). ALB: *Albumin*; AMBP: *Protein AMBP*; APOA4: *Apolipoprotein A4*; APOH: *Beta-2-glycoprotein 1*; C3: *Complement C3 precursor*; C7: *Complement component 7*; C8A: *Complement C8 alpha chain*; GC: *Vitamin D-binding protein*; FGA: *Fibrinogen alpha chain*; FGB: *Fibrinogen beta chain*; FGG: *Fibrinogen gamma chain*; HPX: *Hemopexin*; ITIH2: *Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 2*; ITIH3: *Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 3*; PLG: *Plasminogen*; SERPINA1: *Serpin peptidase inhibitor_ clade A (alpha-1 antiproteinase_ antitrypsin)_ member 1*; SERPINF2: *Serpin family F member 2*; TF: *Ovotransferrin*; TTR: *Transthyretin*.

4.1. Concentração de Cu e Mn nas amostras de plasma e *pellets* proteicos

Os grupos suplementados com níveis mais altos de cobre e manganês apresentaram concentrações maiores desses minerais nas amostras de plasma e *pellets* proteicos em comparação aos grupos que receberam níveis de acordo com as exigências, independentemente da fonte. Resultados semelhantes foram relatados em outros estudos sugerindo que a concentração de microminerais aumenta em diversos tecidos em resposta aos maiores níveis de inclusão nas dietas (Jasek et al., 2019; Kim e Kil, 2015; Olukosi et al., 2018; Sun et al., 2021).

Em relação as fontes, observa-se que não houve diferença entre o sulfato e hidroxiclreto de Cu quando suplementados com o nível mais alto (150 mg k⁻¹ de Cu). Curiosamente, os grupos suplementados com 15 mg k⁻¹ de Cu a partir da fonte hidroxiclreto apresentaram maiores concentrações de Cu nas amostras e *pellets* proteicos em relação aos sulfatos, demonstrando que o sulfato de Cu foi menos eficiente quando se utilizou a concentração mínima exigida. Por outro lado, as concentrações de Mn tanto nas

amostras quanto nos *pellets* foram maiores nos grupos suplementados com hidroxicloretos independentemente do nível suplementar, indicando maior capacidade do hidroxicloreto de Mn em disponibilizar o mineral para absorção e incorporação nas proteínas em comparação aos sulfatos.

4.2. Regulação das proteínas plasmáticas

No presente estudo a utilização de diferentes fontes e níveis de Cu e Mn promoveu mudanças no nível de expressão de proteínas plasmáticas associadas a múltiplos processos e funções biológicas. A análise funcional indicou o envolvimento das proteínas em processos relevantes como regulação biológica, resposta ao estresse, processos do sistema imune e homeostase. De modo semelhante, a análise da via destacou as vias da homeostase, sistema imune inato e organização da matriz extracelular para o conjunto de proteínas identificadas. Grande parte das proteínas apresentaram evidências de interações entre si demonstrando a complexidade da resposta aos grupos estudados. A partir da análise dos termos *GO*, oito proteínas foram associadas com a função de *metal binding* (*ALB*, *apoAIV*, *CRP*, *FGA*, *FGB*, *FGG* e *PKLR*), destacando-se a albumina conhecida por se ligar a diferentes metais, incluindo o cobre e o manganês.

A albumina é a proteína mais abundante no plasma sanguíneo e desempenha um importante papel no transporte de diversas moléculas e minerais, o que a torna essencial no controle do estresse oxidativo por impedir a circulação livre de metais com atividades pró-oxidantes (Fasano et al., 2005). O grupo suplementado com menor nível de hidroxicloreto de Cu e Mn (H15-80) apresentou maior expressão dos *spots* 70, 71 e 98 caracterizados com albumina, em comparação com o grupo suplementado com sulfatos (S15-80). Levando em consideração as propriedades de ligação a metais da albumina, possivelmente sua regulação positiva no grupo H15-80 ocorreu em virtude da maior concentração de Cu e Mn no plasma e *pellet* proteico conforme apresentado na Tabela 1. Em contrapartida, a suplementação de níveis mais altos de hidroxicloreto de Cu e Mn (H150-120) diminuiu a expressão dos *spots* 56 e 105 com a presença de albumina e outras proteínas em relação ao grupo suplementado com o mesmo nível de sulfato (S150-120). Embora não houve diferenças nas concentrações de Cu entre os grupos H150-120 e S150-120, a concentração de Mn foi superior no grupo H150-120. Dessa forma, a maior concentração de Mn apresentada pelo grupo suplementado com hidroxicloreto, pode ter exposto as alterações provocadas na albumina em resposta aos níveis mais elevados dos minerais, uma vez que foi sugerido que em situações de excesso de metais, a albumina

adota uma atitude de “auto sacrifício” direcionando o dano oxidativo para si mesma de forma a limitar os danos a outras moléculas importantes (Siotto e Squitti, 2018).

Outra observação relevante, refere-se ao fato de que todos os *spots* do grupo H150-120 apresentaram regulação negativa quando comparado ao grupo S150-120 e H15-80. Nesses *spots*, além da albumina, também foram identificadas outras proteínas envolvidas na capacidade antioxidante do plasma, como as cadeias alfa, beta e gama de fibrinogênio (*spots* 28, 44, 104, 105 e 106) e a hemopexina (*spot* 31). O fibrinogênio por exemplo, foi relatado em estudos anteriores por apresentar função antioxidante no plasma e ser altamente susceptível a oxidação (Kaplan, et al., 2001; Mañucat-Tan et al., 2021). De modo semelhante, a hemopexina atua protegendo as células da toxicidade do heme livre, porém, a exposição a espécies reativas de oxigênio e nitrogênio provocam modificações oxidativas em sua estrutura comprometendo a sua atividade (Hahl et al., 2017). Embora não esteja claro as razões pelas quais as proteínas do grupo H150-120 tenham sido reguladas negativamente, a maior biodisponibilidade mineral apresentada pelos hidroxicloretos pode ter tornado mais evidentes os efeitos dos níveis elevados de Cu e Mn no proteoma plasmático, sugerindo um desequilíbrio na homeostase e possíveis alterações na estrutura e funcionamento das proteínas, seja pela geração de radicais livres ou pela ligação direta dos metais nas proteínas, sendo necessários mais estudos para esclarecer tais mecanismos.

O grupo suplementado com níveis mais altos de sulfato de Cu e Mn (S150-120) também demonstrou alterações na expressão proteica quando comparado ao grupo suplementado com níveis recomendados (S15-80). No entanto, foi observado a expressão diferencial de *spots* com algumas proteínas distintas das encontradas na comparação entre os grupos H150-120 e H15-80, além de apresentar regulação positiva em dois *spots*, 25 e 54. No *spot* 25 foi identificada a *SPIA1*, uma proteína conhecida comumente como alfa-1-antitripsina, pertencente a superfamília das serpinas inibidoras de serina proteases. A *SPIA1* é relativamente abundante no plasma e além de atuar na inibição de proteases, também está envolvida em muitos processos fisiológicos como regulação da resposta anti-inflamatória e imunomoduladora (Kelly-robinson et al., 2021). No *spot* 54, foram identificadas proteínas da família dos inibidores de inter-alfa-tripsina (*IαI*), sendo as cadeias pesadas 2 e 3 (*ITIH2* e *ITIH3*), e a proteína *AMBP* (precursor de alfa-1-microglobulina/bicunina - *AMBP*). Apesar de pertencerem a família de inibidores de proteases, essas proteínas são conhecidas por se ligarem ao ácido hialurônico atuando na estabilização da matriz extracelular, e também foram associadas na reparação celular de

lesões teciduais (Adair et al., 2009; Chen et al., 2019). Além disso, Garantziotis et al. (2007) relataram a ação dos I&I na atenuação da ativação do complemento e o dano tecidual induzido pelo complemento em resposta a inflamação. De fato, no presente estudo foi observado menor expressão das proteínas complemento C3, C7 e C3d (*spot* 48) no grupo S150-120, sugerindo que os níveis mais altos de sulfato de Cu e Mn podem ter iniciado uma resposta inflamatória levando a indução de inibidores inter-alfa-tripsina para controlar potenciais danos teciduais.

O grupo suplementado com o menor nível de sulfato de Cu e Mn (S15-80) apresentou regulação negativa de quase todos os *spots* em comparação com o grupo suplementado com o mesmo nível de hidroxicloretos (H15-80), coincidindo também com as menores concentrações dos minerais nas amostras e *pellets* proteicos. Partindo do princípio de que o nível de Cu e Mn suplementados nesses grupos estavam de acordo com a recomendação nutricional para frangos de corte não havendo o risco de toxicidade, pode-se presumir que a disponibilização de Cu e Mn a partir dos sulfatos encontra-se em um nível subótimo quando comparado com os hidroxicloretos. Embora os resultados sejam insuficientes para inferir qualquer efeito negativo, foi possível observar que a menor absorção dos minerais a partir dos sulfatos induziu mudanças na regulação das proteínas no plasma sanguíneo em comparação com os hidroxicloretos, ressaltando assim, a importância de se utilizar fontes com maior biodisponibilidade mineral para atender adequadamente as exigências das aves.

Em resumo, este é o primeiro estudo que abordou os efeitos da suplementação de níveis e fontes de Cu e Mn em frangos de corte a partir de uma perspectiva proteômica. Apesar das limitações da técnica *2D-PAGE*, os resultados demonstraram alterações no padrão de expressão das proteínas plasmáticas envolvidas principalmente nas vias da homeostase, fornecendo um caminho para futuras pesquisas na busca de biomarcadores responsivos as diferentes concentrações dietéticas de minerais. Neste sentido, sugere-se para os próximos estudos a combinação de diferentes abordagens proteômicas para reduzir as limitações de cada técnica e ampliar os resultados, bem como o estudo individual de cada metal para melhor clareza e compreensão dos mecanismos envolvidos nas alterações do proteoma e seus impactos na saúde das aves.

5. Conclusão

Os hidroxicloretos de Cu e Mn apresentaram maior biodisponibilidade mineral quando comparados aos sulfatos. A diferença da biodisponibilidade entre as fontes

promoveu mudanças na regulação das proteínas, especialmente quando se utilizou níveis dietéticos mais altos, indicando possível desequilíbrio na homeostase quando a suplementação está acima da exigência nutricional.

6. Referências

- Adair, J. E., Stober, V., Sobhany, M., Zhuo, L., Roberts, J. D., Negishi, M., Kimata, K., & Garantziotis, S. (2009). Inter- α -trypsin inhibitor promotes bronchial epithelial repair after injury through vitronectin binding. *Journal of Biological Chemistry*, 284(25), 16922–16930. <https://doi.org/10.1074/jbc.M808560200>
- Bao, Y. M., & Choct, M. (2009). Trace mineral nutrition for broiler chickens and prospects of application of organically complexed trace minerals: a review. *Animal Production Science*, 49(4), 269–282. <https://doi.org/10.1071/EA08204>
- Braga, C. P., Vieira, J. C. S., Grove, R. A., Boone, C. H. T., Leite, A. D. L., Buzalaf, M. A. R., Fernandes, A. A. H., Adamec, J., & Padilha, P. D. M. (2017). A proteomic approach to identify metalloproteins and metal-binding proteins in liver from diabetic rats. *International Journal of Biological Macromolecules*, 96, 817–832. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.12.073>
- Brugger, D., & Windisch, W. M. (2015). Environmental responsibilities of livestock feeding using trace mineral supplements. *Animal Nutrition*, 1(3), 113–118. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2015.08.005>
- Cavecci, B., Lima, P. M., Vieira, J. C. S., Braga, C. P., Queiroz, J. V., Bittarello, A. C., Padilha, P. M. (2015). Use of ultrasonic extraction in determining apparent digestibility in fish feed. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 9, 599-603. <https://doi.org/10.1007/s11694-015-9269-9>
- Chen, X., Nakada, S., Donahue, J. E., Chen, R. H., Tucker, R., Qiu, J., Lim, Y. P., Stopa, E. G., & Stonestreet, B. S. (2019). Neuroprotective effects of inter-alpha inhibitor proteins after hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *Experimental Neurology*, 317, 244–259. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2019.03.013>
- Doumas, B. T., Bayse, D. D., Carter, R. J., Peters, J. R., & Schaffer, R. A. (1981). Candidate reference method for determination of total protein in serum. I. Development and validation. II. Tests for transferability. *Clinical Chemistry*, 27(10), 1651–1654.

- Fasano, M., Curry, S., Terreno, E., Galliano, M., Fanali, G., Narciso, P., Notari, S., & Ascenzi, P. (2005). The extraordinary ligand binding properties of human serum albumin. In *IUBMB Life* (Vol. 57, Issue 12, pp. 787–796). <https://doi.org/10.1080/15216540500404093>
- Garantziotis, S., Hollingsworth, J. W., Ghanayem, R. B., Timberlake, S., Zhuo, L., Kimata, K., & Schwartz, D. A. (2007). Inter-Trypsin Inhibitor Attenuates Complement Activation and Complement-Induced Lung Injury 1. In *The Journal of Immunology* (Vol. 179). www.jimmunol.org
- Garcia, J. S., Magalh, C. S. de, Aur, M., & Arruda, Z. (2006). Trends in metal-binding and metalloprotein analysis. *Talanta*, 69, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2005.08.041>
- Geng, Y., Sun, X., Lu, L., Lin, X., Liao, X., Zhang, L., Wang, R., & Luo, X. (2022). Effect of in ovo manganese injection on the embryonic development, antioxidation, hatchability, and performances of offspring broilers under normal and high temperatures. *Poultry Science*, 101(8), 101936. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.101936>
- Hahl, P., Hunt, R., Bjes, E. S., Skaff, A., Keightley, A., & Smith, A. (2017). Identification of oxidative modifications of hemopexin and their predicted physiological relevance. *Journal of Biological Chemistry*, 292(33), 13658–13671. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.783951>
- Horn, D., & Barrientos, A. (2008). Mitochondrial Copper Metabolism and Delivery to Cytochrome c Oxidase. *IUBMB Life*, 60(7), 421–429. <https://doi.org/10.1002/iub.50>
- Hu, Y., Chen, Z., Lu, L., Zhang, L., Liu, T., Luo, X., & Liao, X. (2022). Determination of dietary copper requirement by the monoamine oxidase activity in kidney of broilers from 1 to 21 days of age. *Animal Nutrition*, 8(1), 227–234. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2021.05.013>
- Jasek, A., Coufal, C. D., Parr, T. M., & Lee, J. T. (2019). Evaluation of Increasing Manganese Hydroxychloride Level on Male Broiler Growth Performance and Tibia Strength. *Journal of Applied Poultry Research*, 28(4), 1039–1047. <https://doi.org/10.3382/japr/pfz065>

- Kaplan, I. v, Attaelmannan, M., & Levinson, S. S. (2001). Fibrinogen is an antioxidant that protects b-lipoproteins at physiological concentrations in a cell free system. In *Atherosclerosis* (Vol. 158). www.elsevier.com/locate/atherosclerosis
- Kelly-robinson, G. A., Reihill, J. A., Lundy, F. T., McGarvey, L. P., Lockhart, J. C., Litherland, G. J., Thornbury, K. D., & Martin, S. L. (2021). The serpin superfamily and their role in the regulation and dysfunction of serine protease activity in copd and other chronic lung diseases. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 12). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms22126351>
- Kim, J. W., & Kil, D. Y. (2015). Determination of relative bioavailability of copper in tribasic copper chloride to copper in copper sulfate for broiler chickens based on liver and feather copper concentrations. *Animal Feed Science and Technology*, 210, 138–143. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2015.09.022>
- Lu, L., Wang, R. L., Zhang, Z. J., Steward, F. A., Luo, X., & Liu, B. (2010). 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*, 138(1–3), 181–189. <https://doi.org/10.1007/s12011-010-8623-3>
- Lu, W. B., Kuang, Y. G., Ma, Z. X., & Liu, Y. G. (2020). The effect of feeding broiler with inorganic, organic, and coated trace minerals on performance, economics, and retention of copper and zinc. *Journal of Applied Poultry Research*, 29(4), 1084–1090. <https://doi.org/10.1016/j.japr.2020.10.002>
- Mañucat-Tan, N., Zeineddine Abdallah, R., Kaur, H., Saviane, D., Wilson, M. R., & Wyatt, A. R. (2021). Hypochlorite-induced aggregation of fibrinogen underlies a novel antioxidant role in blood plasma. *Redox Biology*, 40. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101847>
- Meng, T., Gao, L., Xie, C., Xiang, Y., Huang, Y., Zhang, Y., & Wu, X. (2021). Manganese methionine hydroxy analog chelated affects growth performance, trace element deposition and expression of related transporters of broilers. *Animal Nutrition*, 7(2), 481–487. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2020.09.005>
- Miles, R. D., Keefe, S. F. O., Henry, P. R., Ammerman, C. B., & Luo, X. G. (1998). The Effect of Dietary Supplementation with Copper Sulfate or Tribasic Copper Chloride

on Broiler Performance, Relative Copper Bioavailability, and Dietary Prooxidant Activity. *Poultry Science*, 77, 416–425.

- M'Sadeq, S. A., Wu, S. B., Choct, M., & Swick, R. A. (2018). Influence of trace mineral sources on broiler performance, lymphoid organ weights, apparent digestibility, and bone mineralization. *Poultry Science*, 97(9), 3176–3182. <https://doi.org/10.3382/ps/pey197>
- Nguyen, H. T. T., Morgan, N., Roberts, J. R., Swick, R. A., & Toghyani, M. (2020). Copper hydroxychloride is more efficacious than copper sulfate in improving broiler chicken's growth performance, both at nutritional and growth-promoting levels. *Poultry Science*, 99(12), 6964–6973. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.09.053>
- Olukosi, O. A., van Kuijk, S., & Han, Y. (2018). Copper and zinc sources and levels of zinc inclusion influence growth performance, tissue trace mineral content, and carcass yield of broiler chickens. *Poultry Science*, 97(11), 3891–3898. <https://doi.org/10.3382/ps/pey247>
- Olukosi, O. A., van Kuijk, S. J. A., & Han, Y. (2019). 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*, 98(10), 4961–4971. <https://doi.org/10.3382/ps/pez261>
- Rostagno, H. S., Albino, L. F. T., Hannas, M. I., Donzele, J. L., Sakomura, N. K., Alysson, F. G. P., Saraiva, A., Teixeira, M. L., Rodrigues, P. B., Oliveira, R. F. de, Barreto, S. L. de T., & Brito, C. O. (2017). Tabelas brasileiras para aves e suínos. In H. S. Rostagno (Ed.), *Tabelas brasileiras aves e suínos* (4th ed.). Departamento de Zootecnia - UFV.
- Ruas, F. A. D., Barboza, N. R., Castro-Borges, W., Guerra-Sá, R. (2019). Manganese alters expression of proteins involved in the oxidative stress of *Meyerozyma guilliermondii*. *Journal of Proteomics*, 196, 173-188. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.11.001>
- Siotto, M., & Squitti, R. (2018). Copper imbalance in Alzheimer's disease: Overview of the exchangeable copper component in plasma and the intriguing role albumin

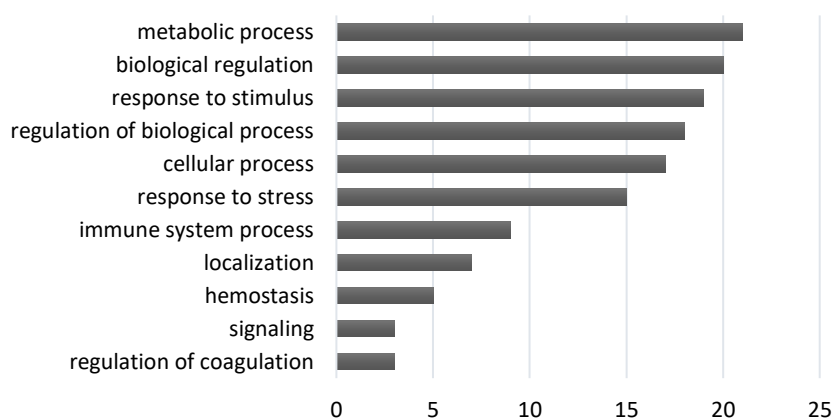
plays. In *Coordination Chemistry Reviews* (Vol. 371, pp. 86–95). Elsevier B.V.
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2018.05.020>

Sun, Y., Geng, S., Yuan, T., Liu, Y., Zhang, Y., Di, Y., Li, J., & Zhang, L. (2021). Effects of manganese hydroxychloride on growth performance, antioxidant capacity, tibia parameters and manganese deposition of broilers. *Animals*, 11(12).
<https://doi.org/10.3390/ani11123470>

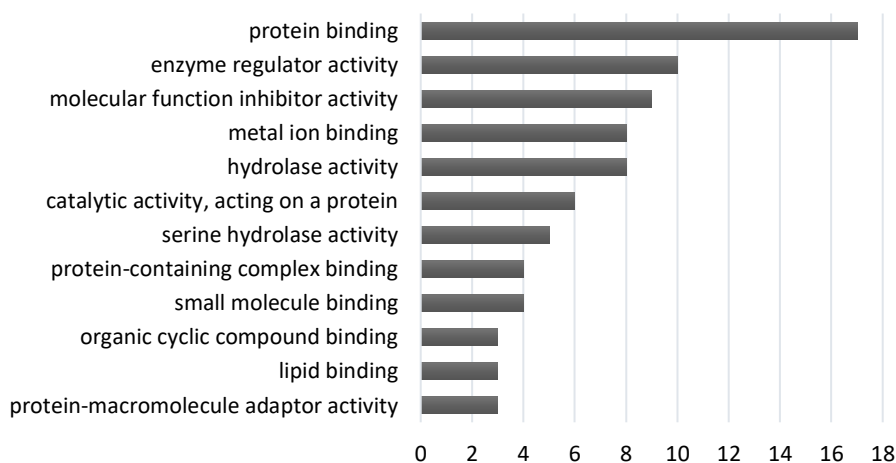
Underwood, E. J., & Suttle, N. F. (1999). The mineral nutrition of livestock. In Cabi (3rd ed.). CABI Publishing.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Biological process



Molecular function



Cellular component

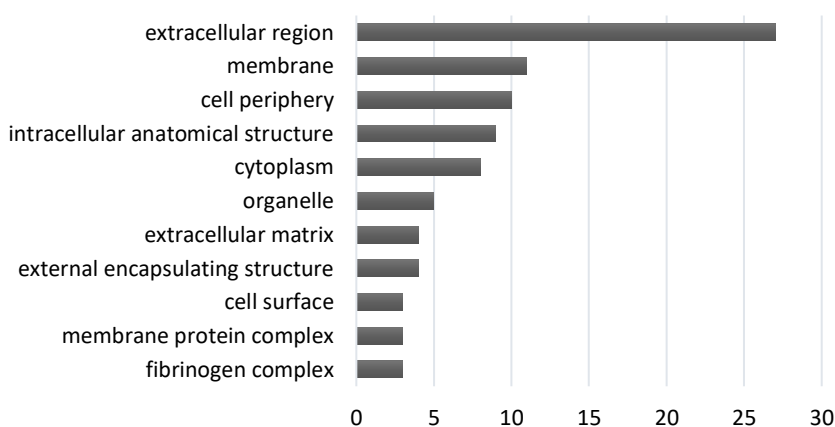


Figura S1. Análise de ontologia genética do proteoma plasmático de frangos de corte suplementados com diferentes níveis e fontes de cobre e manganês utilizando o *Blast2GO*.

Tabela S1. Vias significativamente enriquecidas (FDR<0.05) utilizando o banco de dados de vias *Reactome*.

Pathway identifier	Pathway name	FDR	Gene
R-GGA-114608	Platelet degranulation	7.93E-07	FGA; FGG; FGB; PLG; APOH; ALB; SERPINF2; SPIA1; ITIH3
R-GGA-76005	Response to elevated platelet cytosolic Ca ²⁺	7.93E-07	FGA; FGG; FGB; PLG; APOH; ALB; SERPINF2; SPIA1; ITIH3
R-GGA-76002	Platelet activation, signaling and aggregation	2.08E-04	FGA; FGG; FGB; PLG; APOH; ALB; SERPINF2; SPIA1; ITIH3
R-GGA-140875	Common Pathway of Fibrin Clot Formation	2.29E-04	FGA; FGG; FGB; SPIA1
R-GGA-109582	Hemostasis	5.85E-04	FGA; FGG; IGLL1; FGB; PLG; APOH; ALB; SERPINF2; SPIA1; ITIH3
R-GGA-140877	Formation of Fibrin Clot (Clotting Cascade)	9.68E-04	FGA; FGG; FGB; SPIA1
R-GGA-372708	p130Cas linkage to MAPK signaling for integrins	9.75E-04	FGA; FGG; FGB
R-GGA-354194	GRB2:SOS provides linkage to MAPK signaling for Integrins	9.75E-04	FGA; FGG; FGB
R-GGA-2132281	Regulation of complement cascades	9.75E-04	C7; C3; C8A
R-GGA-5686938	Regulation of TLR by endogenous ligand	0.00261	FGA; FGG; FGB
R-GGA-2168880	Scavenging of heme from plasma	0.00284	IGLL1; AMBP; ALB; Ig-like domain-containing protein
R-GGA-2173782	Binding and Uptake of Ligands by Scavenger Receptors	0.00374	IGLL1; AMBP; ALB; Ig-like domain-containing protein
R-GGA-75205	Dissolution of Fibrin Clot	0.00374	PLG; SERPINF2
R-GGA-2132285	Complement Cascade	0.00374	C7; C3; C8A
R-GGA-5674135	MAP2K and MAPK activation	0.00456	FGA; FGG; FGB
R-GGA-2132267	Formation of membrane attack complex (MAC)	0.00459	C7; C8A
R-GGA-166658	Complement cascade	0.00460	IGLL1; C8A; CRP; Ig-like domain-containing protein
R-GGA-354192	Integrin signaling	0.00737	FGA; FGG; FGB
R-GGA-216083	Integrin cell surface interactions	0.00737	FGA; FGG; FGB
R-GGA-173623	Classical antibody-mediated complement activation	0.00737	IGLL1; CRP; Ig-like domain-containing protein
R-GGA-8957275	Post-translational protein phosphorylation	0.00737	FGA; FGG; ALB; ITIH2

R-GGA-381426	Regulation of Insulin-like Growth Factor (IGF) transport and uptake by Insulin-like Growth Factor Binding Proteins (IGFBPs)	0.00895	FGA; FGG; ALB; ITIH2
R-GGA-9757110	Prednisone ADME	0.00928	ALB; SPIA1
R-GGA-166786	Creation of C4 and C2 activators	0.00929	IGLL1; CRP; Ig-like domain-containing protein
R-GGA-76009	Platelet Aggregation (Plug Formation)	0.01037	FGA; FGG; FGB
R-GGA-166663	Initial triggering of complement	0.01074	IGLL1; CRP; Ig-like domain-containing protein
R-GGA-8963899	Plasma lipoprotein remodeling	0.02497	PLG; ALB
R-GGA-2132287	Creation of alternative pathway C3 convertase	0.02497	C3
R-GGA-2132293	Formation of fluid-phase convertase C3	0.02497	C3
R-GGA-2132273	Formation of membrane-bound convertase C3	0.02497	C3
R-GGA-2422406	Innate Immune System	0.02879	C7; C3; C8A
R-GGA-2173345	Anaphylatoxins initiate inflammatory responses	0.03735	C3
R-GGA-9793528	Ciprofloxacin ADME	0.03735	ALB
R-GGA-168249	Innate Immune System	0.03915	FGA; FGG; FGB; IGLL1; TTR; C8A; SPIA1; CRP; Ig-like domain-containing protein
R-GGA-1474244	Extracellular matrix organization	0.04035	FGA; FGG; FGB; PLG
R-GGA-2029481	FCGR activation	0.04372	IGLL1; Ig-like domain-containing protein

CAPÍTULO 4

IMPLICAÇÕES

O presente trabalho buscou avaliar a biodisponibilidade das fontes hidroxicloretos *versus* sulfatos por meio de estratégias metaloproteômicas, combinando a avaliação da expressão diferencial das proteínas por *2D-PAGE*, o mapeamento do Cu e Mn nos *spots* proteicos por *GFAAS* e a identificação das proteínas associadas aos minerais por *LC-MS/MS*. Esta proposta foi baseada na funcionalidade dos minerais por meio da incorporação do Cu e Mn nas proteínas, considerando que os metais desempenham papel fundamental na atividade de muitas proteínas.

A análise por *GFAAS* demonstrou ser uma ferramenta sensível e permitiu o mapeamento de muitos *spots* proteicos revelando proteínas nas quais o Cu e Mn podem apresentar afinidade de ligação. Assim, em conjunto com a concentração dos minerais nas amostras do tecido hepático e *pellets* proteicos, foi possível concluir no presente estudo, que os hidroxicloretos de Cu e Mn apresentaram maior biodisponibilidade em relação aos sulfatos. O estudo também demonstrou que a análise das concentrações dos minerais nos *pellets* proteicos é mais sensível para estimar a biodisponibilidade baseada na funcionalidade quando comparado com as amostras de tecido hepático, uma vez que na obtenção do *pellet* é realizada uma sequência de procedimentos para isolar as proteínas presentes no tecido. Dessa forma, em ensaios de biodisponibilidade, as concentrações dos minerais nos *pellets* proteicos podem ser utilizadas como opção da avaliação do conteúdo mineral. Porém, são necessários mais estudos para confirmar a reprodutibilidade dos resultados e o aprimoramento da metodologia para diferentes amostras.

A análise do perfil diferencial das proteínas por *2D-PAGE* revelou a alteração de muitas proteínas em resposta aos tratamentos avaliados. Entretanto, a dificuldade encontrada ao utilizar esta técnica foi determinar a regulação da grande maioria das proteínas, tendo em vista que foram caracterizadas muitas proteínas redundantes distribuídas em diferentes *spots* proteicos, provavelmente devido a modificações pós-traducionais. Isso acarreta muitos *spots* com expressões divergentes, pois no mesmo *spot* são identificadas outras proteínas, o que também torna difícil inferir qual proteína é responsável pela diferença na expressão apresentada pelo *spot*. Para contornar esse desafio, sugere-se para futuras pesquisas complementar os resultados da técnica *2D-PAGE* com a técnica livre de gel, comumente conhecida como *Shotgun*. A *Shotgun* é baseada na análise quantitativa e fornece resultados de expressão diferencial de proteínas

mais robustos, sendo mais aceita entre os pesquisadores da área de proteômica quando comparada com a *2D-PAGE*.

Neste sentido, por meio das ferramentas utilizadas neste estudo (*2D-PAGE*, *GFAAS* e *LC-MS/MS*) é possível separar o proteoma, mapear os minerais nos *spots* proteicos e identificar as proteínas nestes *spots*, e a partir da *Shotgun* avaliar a diferença de expressão dessas proteínas entre os tratamentos com mais clareza, auxiliando dessa forma, na melhor compreensão dos resultados obtidos. Outra sugestão, consiste em trabalhar com menos grupos experimentais e com um mineral por vez, para inicialmente elucidar os efeitos de cada metal sobre as proteínas de maneira individual, e posteriormente seguir com estudos com metais combinados para avaliar suas interações.

Apesar das limitações, por meio da *2D-PAGE* foi possível identificar duas classes de proteínas (*HSPs* e *GSTs*) no tecido hepático que responderam de forma consistente aos maiores níveis de Cu e Mn suplementados, podendo ser candidatas promissoras a biomarcadores de exposição aos minerais estudados. Além disso, os resultados do proteoma plasmático também revelaram alterações em muitas proteínas envolvidas na regulação da homeostase, servindo de orientações para os próximos estudos.