UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

ALINE DE LIMA LEITE

**Análise proteômica em rim de ratos submetidos à exposição aguda ao
flúor**

Bauru
2010

ALINE DE LIMA LEITE

Análise proteômica em rim de ratos submetidos à exposição aguda ao flúor

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru, da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Área de Concentração: Estomatologia e Biologia Oral (Biologia Oral).

Orientadora: Profa. Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf

**Bauru
2010**

Leite, Aline de Lima

L536a Análise proteômica em rim de ratos submetidos à
exposição aguda de flúor / Aline de Lima Leite. – Bauru,
2010.

177 p. : il. ; 31cm.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia
de Bauru. Universidade de São Paulo

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marília Afonso Rabelo Buzalaf

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a
reprodução total ou parcial desta dissertação, por processos
fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo N^o 14/2005
Data: 20 de junho de 2005

DEDICATÓRIA

À Deus

Quem me forneceu a força necessária para enfrentar todos os desafios que me foram postos. Sem Ele, nada seria possível...

Aos meus pais, Adelaide e Francisco

Pelo amor, compreensão e apoio...

Aos meus irmãos Erick e Francielly,

Por todos os momentos que tivemos juntos,

À Marília

Por acreditar em minha capacidade sempre me estimulando e me fazendo seguir em frente...

O otimismo é a fé que leva à realização. Nada pode ser feito sem esperança ou confiança.

Helen Keller

Dedico este trabalho

Nobody said it was easy

No one ever said it would be so hard!

"Bom mesmo é ir à luta com determinação,

Abraçar a vida com paixão,

Perder com classe

E vencer com ousadia

Porque o mundo pertence a quem se atreve

E a vida é muito, para ser insignificante."

Charles Chaplin

Histórico do trabalho

No início de 2007 ingressei no curso de mestrado desta Faculdade e já em abril comecei a desenvolver minhas atividades experimentais. Recebi meus animais neste mesmo mês e após o tratamento e sacrifício dos animais, descobri que teria de repetir o experimento. Assim em agosto de 2007 encaminhei o pedido de autorização para pedir novos animais para a Comissão de ética e recebia resposta em setembro de 2007. No entanto a essa altura não pude solicitar os animais, pois eu iria para os Estados Unidos em novembro auxiliar a aluna de doutorado Juliane Carvalho, com a coleta de peças de camundongos para sua tese. Juliane e eu trabalharíamos juntas até o fim de nossos trabalhos, pois assim como eu ela também iria trabalhar com proteômica.

Devido a alguns imprevistos, minha ida para os Estados Unidos só acabou acontecendo em dezembro de 2007. Assim, apenas em fevereiro de 2008 pude fazer o pedido dos animais e os recebi no final de março, dando reinício a meu experimento. Enquanto esperava pelo tempo de meus animais Juliane e eu começamos o preparo das amostras dela para análise proteômica. O proteoma teve início em nosso laboratório com o trabalho da aluna Cláudia Kobayashi, que trabalhou muito para conseguir realizar toda sua dissertação com o sistema de eletroforese que permitia a corrida de apenas duas placas para tiras de 13 cm, tendo que realizar inúmeras corridas para atingir um número de replicas adequado. Mas no fim de 2007 nosso grupo foi contemplado com os sistemas *Ettan DALTsix* e *Ettan IPGphor Cup Loading Manifold* (ambos GE Healthcare) como parte integrante da plataforma proteômica existente em nosso laboratório. Esse sistema nos proporcionaria maior agilidade e precisão nas análises, uma vez que o aparelho permite a análise de até seis géis distintos, minimizando as diferenças verificadas quando géis de 2DE são feitos individualmente ou em duplicatas. O sistema permitia também a utilização de fitas IPG de até 24 cm, proporcionando melhor separação e visualização dos *spots*. O problema agora era aprender a trabalhar com um sistema duas vezes maior do o que estávamos acostumadas. Não tínhamos nenhuma experiência com esta plataforma, e aprendemos as duras custas a manipular o sistema.

Tivemos os mais variados problemas com a segunda dimensão, e muitos deles não tínhamos com quem compartilhar. Inicialmente não conseguíamos manter os géis inteiros, ficávamos quase 16 horas entre as corridas de primeira e segunda dimensão para no final o gel virar um quebra-cabeça. Não tínhamos jeito para lidar com um gel daquele tamanho e logo na primeira troca de solução o gel se desfez em mil pedaços. Também tínhamos problemas com a cuba, muitas vezes os tampões, superior e inferior, se misturavam pelo vazamento da cuba superior. Esta cuba era encaixada na inferior e

tentávamos selar as frestas com vaselina, mas volta e meio o vazamento acontecia. Foram varias corridas até pegarmos o jeito e entre as corridas essas, sacrificamos meus animais e preparamos as minhas amostras. Quando conseguimos géis inteiros percebemos que eles dilatavam muito durante o processo de coloração e nesta mesma época entramos em contato com Prof. Carlos Labate, da ESALQ afim de formar colaboração para realização das espectrometrias de massa. Marcamos então uma reunião em seu laboratório e fomos muito bem recebidos pelo prof. Labate e por seu aluno Alexander. Mostramos um de nossos géis e explicamos quais os problemas que havíamos encontrado ate o momento. Conversamos sobre os problemas que enfrentávamos, e eles prontamente nos ajudaram com o problema da dilatação bem como o problema do vazamento, onde o Alexander sugeriu que usássemos agarose no lugar da vaselina.

Voltamos para Bauru contente com os elogios que ouvimos do prof. Labate bem como pela a boa parceria formada. Na semana seguinte preparamos novos reagentes e começamos a processar as novas corridas, porém uma nova surpresa acabava de surgir. Durante a confecção dos géis de poliacrilamida surgiam inúmeras bolhas, por todos os lados. Muitas vezes tínhamos que refazer os géis duas, três ou até deixar para o próximo dia. Escrevi um e-mail para o Alexander e ele disse que poderia ser sujeira nas placas, mas nos tomávamos todos os cuidados possíveis, as placas eram lavadas e sacadas assim que saiam da eletroforese. Decidimos trocar os produtos de limpeza como sabão, álcool e até o papel utilizado para secagem, o que deu resultado.

Passado esse problema começamos novas corridas e não paramos por duas semanas a fim de confeccionar todas as triplicatas minhas e da Juliane, o que foi um erro, pois não percebemos que as proteínas de baixo peso molecular de alguns géis haviam sumido, e que só foi revelado após a captura das imagens dos géis, tarefa que também foi complicada, pois os nossos géis não cabiam no *scanner* da nossa plataforma, uma vez que estes eram 2 cm maiores que a área de leitura, e a solução foi colocar os géis 5 min no etanol. O resultado novamente foi uma decepção, frustração e o desespero, já que estávamos em dezembro de 2008. Nós já não aguentávamos mais esse gel “*kinder ovo*”. Decidimos refazer todas as soluções e realizamos cerca de 6 corridas entre dezembro de 2008 e janeiro de 2009. Fomos a Piracicaba conversar com o Alexander, que não sabia nos dizer o que acontecia, pois ele jamais tinha visto aquilo. Também tivemos a triste notícia de ele iria se mudar, pois acabava de ser contratado em uma universidade.

Sabíamos que o problema estava na segunda dimensão, pois as corridas que antes demoravam cerca de 7 horas, passaram a demorar 10 a 12 horas. Verificamos o tampão da cuba, a voltagem das tomadas e até pedimos para que o eletricista verificasse os eletrodos da cuba, mas nada adiantou.

Restaram as amostras e concluímos que talvez o problema pudesse estar com as mesmas. Deste modo, preparamos amostras novas, realizamos mais uma corrida e nada das proteínas de baixo peso aparecerem. Assim decidimos aceitar o novo perfil dos géis e fizemos as corridas para a obtenção das triplicatas. Já na primeira leva qual foi a surpresa? As proteínas simplesmente reapareceram, sem que mudássemos nada. A corrida foi excelente, no tempo correto como antes e os géis ficaram ótimos. Para não correr riscos de danificar os géis fomos à Piracicaba para utilizar o *scanner* do Prof. Labate, que era maior que o nosso. Depois foi sentar durante um mês e realizar a análise dos géis no *software*. Durante esse último período, soubemos pelo prof. Labate que espectrômetro estava com problemas.

Quando terminamos a análise, o prof. Labate nos deu a boa notícia de que o equipamento havia sido concertado. Fomos novamente a Piracicaba e o prof. nos apresentou o Matheus e a Fernanda, que iriam nos ajudar com a excisão e o preparo dos *spots*. Voltamos a Bauru e em duas semanas excisamos os *spots* e voltamos então a Esalq para aprender o processo de preparo das proteínas para a espectrometria. No dia em que chegamos lá o prof. Labate, já sem graça nos disse que o equipamento estava novamente com problemas. Preparamos algumas amostras e deixamos com o Matheus e voltamos a Bauru e terminamos de preparar as amostras restantes. A Fernanda tentou passar as amostras em outro lugar, mas também estavam com problemas, e depois de quase um ano de espera, em um *workshop* realizado pelo prof. Labate soubemos que o Síncrotron estava realizando espectrometria de massas para pesquisadores que não pertenciam à rede proteômica do estado de São Paulo. Assim em janeiro deste ano passamos algumas, e é com elas que finalizo minha dissertação de mestrado.

A caminhada até aqui foi dura e cheia de pedras pelo caminho, mas eu faria tudo novamente, pois, apesar dos momentos de desespero, houve momentos maravilhosos, e conheci pessoas ótimas que me ajudaram de coração. Tudo isso me deu força para SEGUIR EM FRENTE SEMPRE!

*Um dia você aprende que o importante não é o que
você tem na vida, mas quem você tem na vida... É que bons
amigos são a família que **DEUS** nos permitia escolher.*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Mileni

Já se passaram 8 anos desde que nos conhecemos, e é incrível como parece que foi ontem... parece que foi ontem que comecei aquele estágio no zoo, que é claro desisti no terceiro dia... parece que foi ontem que zoávamos a beça na aula de anatomia... parece que foi ontem que passamos noites no seu ape... tentando fazer você aprender química analítica... e ainda parece que foi ontem que fizemos nosso primeiro trabalho juntas... lembra... dos ovínhos aposemáticos no jardim botânico?... pois é você me levando pra ambiental e eu te trazendo para o lab... e hoje estamos aqui, no mesmo laboratório, fazendo o mesmo curso de mestrado... São 8 anos de uma amizade que acho que vai longe.. afinal agüentar meu mal humor não é para qualquer um...

Obrigada Mi, por estar sempre presente quando eu preciso, mesmo que seja só pelo “apoio moral”.... Adoro você muito e torço muito para que você encontre seu lugar...

À Juliane

Sem sua ajuda certamente a conclusão deste trabalho seria extremamente difícil, pois você sabe o quanto sofremos para finalizar nossos trabalhos e só você sabe o quanto a cumplicidade ajuda a superar os desafios e fazer-nos a seguir em frente. Obrigada Ju, por ser minha parceira e cúmplice nesses 3 anos de convivência diária, e em algumas vezes noturnas também.... Sinto saudades de fazer gel com você... e estou muito feliz por você ter encontrado seu lugar ao sol... você merece...

Obrigada por tudo!

Aos queridos Claudío, Américo, Sônia, Liza, Fernando, Henrique e Mariana

Eu não podia imaginar as coisas que me aconteceriam quando conheci essa família. O início foi incerto, e hoje todos os “estranhos” fariam parte da minha vida. Palavras nunca serão suficientes para expressar a intensidade dos meus sentimentos de amor e carinho por vocês. Vocês são maravilhosos! Obrigada por me receberem de braços abertos e pelos ótimos momentos de convívio... Vocês estarão sempre no meu coração.

Aos três pequeninos Nathália, Gabriel e Rafael

Puxa vida... vocês três são a luz que ilumina meus dias... são 10 anos que passaram voando... de repente vocês estão com 11 aninhos... e cada dia mais amorosos e maravilhoso do que nunca...

Todas as travessuras, brincadeiras, brigas, bagunça na sala, esconde-esconde (Vidro da mesa quebrado e uma big bronca da mamãe), partida de futebol no corredor (vidro do guarda-roupa quebrado e outra bronca da mamãe), jogos de Playstation, cinema, passeio a cavalo, passeios de moto na garagem, tarefas.... ufaaa... coisa que não acaba mais... como em uma história sem fim... Cada dia único... e inesquecíveis...

Amo vocês e cada dia que passamos juntos serão eternos para mim...

A Loni agradece pelo amor e carinho de vocês!

À minha orientadora e amiga Profa. Dra. Marília Buzalaf

Estava eu sentada na cama pensando o que escreveria para você, afinal você sabe o quanto NÃO sou boa com as palavras. Já era tarde da noite e nenhum pensamento legal me ocorria, foi quando comecei a lembrar de como a nossa história aconteceu... afinal já se passaram 10 anos desde que nos conhecemos. Você lembra que pouco tempo depois que comecei a trabalhar com você prestei vários vestibulares, na esperança de um dia cursar uma universidade... obviamente não entrei em universidade pública e não tinha esperança de arcar com um curso privado.... não sei se você se lembra, mas foi você, quem me deu força e incentivo, inclusive financeiro, para que eu ingressasse na USC, me dizendo que mesmo que minha situação não fosse favorável naquele momento, eu podia conseguir, pois se eu me dedicasse e lutasse por aquilo conseguiria chegar ao meu objetivo. Assim não pensei duas vezes... iniciei meus estudos e desde então não parei... e como a vida é engraçada... a matéria que eu mais gostei no meu primeiro foi bioquímica... sem saber, por dois anos que você pertencia a esta disciplina aqui na Fob. Já estava no terceiro ano do curso de biologia quando você me convidou a fazer IC... me formei e hoje cá estou... terminando o mestrado sob sua orientação... Um mestrado cheio de emoções, não é? Quantos foram os dias de desespero... em que eu xingava tudo... e dizia que nada dava certo... Ai vinha você... com toda a sua delicadeza e calma dizia para ter paciência... para não me sentir uma “nuvenzinha negra” e que tudo daria certo... Pois é... segui seus sábios conselhos... tive muita paciência, calma, respirei fundo várias vezes e hoje terminamos mais um trabalho de proteômica. Para muitos é somente mais um trabalho finalizado sob a orientação da Dra. Marília Buzalaf, uma pessoa extremamente capacitada, com um currículo de dar inveja conhecida como a Nº 1 em cariologia. Mas para mim, e creio que para você também, é uma realização única... Eu me DEDIQUEI ao máximo para a finalização deste trabalho, fiz, e faço, tudo com amor... por isso, terminar de escrever a dissertação ao seu lado foi maravilhoso... realmente foi um momento sublime do meu mestrado, pois depois de tanto sofrimento e tantas desilusões, pude ver em seus olhos a alegria e o orgulho dos resultados obtidos por nós. Espero que você sinta o mesmo orgulho que sinto de NOSSO, trabalho, e também de mim. NÃO

sou perfeita, mas tento não decepcionar você nunca, dando o melhor de mim sempre.

Sei que muitas vezes brigamos, que nos desentendemos e que temos nossas opiniões e que ambas são teimosas, e acho que é por isso que nos entendemos tão bem... Mas eu queria que soubesse que apesar tudo o que passamos, dos bons aos maus momentos, das brigas às alegrias, das lágrimas ao riso, você é muito especial para mim... terei você em meu coração para sempre... e se tivesse que voltar no tempo, repetiria tudo novamente, pois só através de tudo o que passei junto com você é que posso dizer com convicção, o que ti digo agora...

Eu amo você do fundo do meu coração...

Loní

AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradeço à FAPESP por ter me concedido a bolsa de estudos e com isso viabilizou a minha dedicação total ao mestrado.

À Faculdade de Odontologia de Bauru, pela oportunidade de concluir uma pós-graduação e pela estrutura fornecida durante todo o curso.

Aos demais professores da disciplina de Bioquímica Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira e Profa. Dra. Ana Carolina Magalhães pelo convívio.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Labate, ESALQ, que nos recebeu de braços abertos em seu laboratório, e sempre esteve disposto a nos ajudar com a espectrometria de massas

Aos professores do Departamento de Ciências Biológicas disciplina de Histologia, Prof. Dr. Rumio Taga, Prof. Dr. Gerson Francisco de Assis e Prof. Dr. Gustavo Garlet pela disponibilidade do laboratório de Histologia.

Aos professores do Departamento de Ciências Biológicas disciplina de Anatomia, Prof. Dr. Antonio de Castro Rodrigues e Prof. Dr. Jesus Carlos Andreo pela disponibilidade do laboratório de Anatomia e pela amizade.

Ao Prof. Dr. Flávio Augusto Cardoso de Faria, por quem tenho profunda admiração pela paciência, humildade e dedicação à bela arte de ensinar.

Aos funcionários da Bioquímica Thelma, Ovídio e Larissa pelo auxílio e amizade.

À Vera Lúcia, secretária do departamento de Ciências Biológicas e do Curso de pós-graduação de Estomatologia e Biologia Oral, pela ajuda em diversos momentos, pela disposição e constante torcida.

Ao Thiago Dionísio, do laboratório de Farmacologia, pela ajuda e disposição com que sempre me atendeu.

As amigas Juliane, Claudinha, Mileni, Flávia Levy e ao meu querido Juliano sempre estiveram presentes para colaborar com meu trabalho. Obrigada pelos risos e diversão inigualável dentro do laboratório, pela dedicação e pela amizade. Amo muito vocês!!

À Fernanda Salvato, que sempre esteve disposta a me ajudar com o trabalho, mesmo em recuperação do acidente você respondeu prontamente as minhas dúvidas. Fer, sem sua ajuda a conclusão deste trabalho seria muito mais árdua.

À Renata, Tia Lourdes, Tia Leonor, Fabiane, Claudio, Fernando, Flávio, Claudio B., Flávia e Gão pelo convívio ternuroso nos fins de semana.

Aos alunos Bruno, Gisele, Letícia, Melina, Marcela, que muito fizeram para que este trabalho desse certo, obrigada pela dedicação e amizade.

Aos meus amigos da Bioquímica: Flávia Levy, Flavia Iano, Camila Peres, Josi, Taísa, Senda, Helô, Flávia Italiani, Tatiana Furlani, Thiemi, Maria Cecília, Sandra, Kéllen, Bruna, Lívia, Adriana, Cíntia, pela colaboração, carinhoso convívio, momentos de diversão no laboratório e pela torcida durante toda esta jornada.

A todos os amigos que frequentam o laboratório de Bioquímica e que contribuíram direta ou indiretamente com este trabalho.

Aos meus colegas de Pós-graduação, cada qual com características e qualidades inconfundíveis, por tornarem os momentos muito mais agradáveis. Em especial os amigos Cadú, Erivan, Geraldo (G), Isabel (Bel), Luis (Rick), Leslie, Roberta (Betinha) e Mônica.

Aos funcionários da Seção de Pós-graduação, do Biotério Central e da Biblioteca pela atenção e disponibilidade.

MUITO OBRIGADA!

Resumo

O flúor é comprovadamente um agente terapêutico contra a cárie dentária, porém, quando consumido de maneira inadequada pode causar reações indesejáveis, tanto crônicas como agudas. A proteômica é uma ferramenta que permite analisar o perfil proteico completo dos sistemas biológicos, permitindo um melhor entendimento da fisiologia normal do organismo, bem como dos mecanismos de doenças, descoberta de biomarcadores para detecção precoce de doenças, identificação de novas terapias e descobertas de fármacos. Assim, o presente estudo teve como trabalho realizar um estudo proteômico diferencial em amostras de tecido renal de ratos submetidos à intoxicação aguda por fluoreto. Para isso, 27 animais, receberam desde o desmame água deionizada e ração AIN-93 por 50 dias. Ao completarem 75 dias de vida, e, após jejum por 12 horas, os animais receberam via gástrica as seguintes doses agudas de F: 0 (controle), 50 e 100 mgF/Kg peso corporal. Após 2 horas foram, os animais foram anestesiados e tiveram o sangue e os rins coletados. Inicialmente foi realizada a dosagem de flúor no plasma e tecidos renais, após difusão facilitada por hexamethyldisiloxano. Em um segundo momento, as proteínas do tecido renal foram extraídas e submetidas à eletroforese bidimensional. Os géis obtidos foram analisados através do software ImageMaster 2D-platinum v. 7.0. Os spots que se apresentaram diferencialmente expressos foram submetidos à identificação por espectrometria de massas. As proteínas identificadas foram classificadas em 5 categorias funcionais. A categoria “metabolismo e energia” reuniu a maior parte das proteínas (40%), seguida pelas categorias de “transporte” e “processos celulares” com 20% e 13% respectivamente. Na categoria “estrutura e organização estrutural”, que reúne proteínas com funções relacionadas ao citoesqueleto e membrana celular, foram identificadas 17% das proteínas. Por fim, os 10% restantes das proteínas pertenciam à categoria

“vias de informação”, que abriga proteínas envolvidas nos processos de síntese/degradação de DNA e RNA. Com base nos resultados obtidos pode se concluir que doses agudas de fluoreto alteram a expressão a nível renal de diversas proteínas relacionadas a distintos processos celulares

Palavras chaves: Fluoreto, proteômica, toxicidade aguda, falha renal.

Abstract

Fluoride has been widely used in dentistry as a caries prophylactic agent. However, if consumed in high concentrations, it can cause side effects as dental fluorosis, skeletal fluorosis and, in extreme situations, death. The recent development of proteomic techniques has allowed the analysis of the entire protein profile of biological systems, contributing to the understanding of the normal physiology of the organism, as well as the mechanisms of diseases and the investigation of biomarkers for their early detection, identification of new therapies and drugs. This study used proteomic techniques to analyze the differential protein expression in kidney of rats submitted to acute fluoride treatments. Three groups of five 75-day-old *Wistar* rats received, by gastric gavage, the following single doses of fluoride: 0 (control), 50 and 100 mgF/Kg body weight. After the treatments, the animals were killed and the left kidney and plasma were collected for fluoride analysis. For proteomic analysis, the right kidney was collected. Fluoride in plasma and renal tissues was analyzed with the electrode, after hexamethyldisiloxane-facilitated diffusion. Proteins from kidney were profiled by two-dimensional gel electrophoresis. Gels from control and treated groups were digitalized using the ImageScanner III and analyzed with ImageMaster 2D Platinum version 7.0 for statistical differences (ANOVA, $p < 0.05$). The proteins identified were classified into five functional categories. The category of “metabolism and energy” had the majority of the proteins (40%), followed by the categories of “transport” and “cell processes, with 20% and 13% of the proteins, respectively. In the category “structure and cell organization”, which brings together proteins with functions related to the cytoskeleton and plasma membrane were identified 17% of the protein. Finally, 10% of the proteins belonged to the category “information pathways”, which comprises the proteins involved in the processes of synthesis and degradation of DNA and RNA. Based on the results

obtained, it can be concluded that acute doses of fluoride alters the expression of several proteins related to different cellular processes in the kidneys.

Key-words: fluoride; proteomic analysis; kidney fail

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema geral da distribuição e eliminação do fluoreto no organismo....	51
Figura 2 - Exemplo de uma curva de concentração deste elemento no plasma em função do tempo	52
Figura 3 - Mecanismo de reabsorção tubular do fluoreto. Em a o comportamento do fluoreto perante uma urina alcalina, e em b na presença de urina ácida.....	54
Figura 4 - Etapas envolvidas no processo de separação de proteínas por eletroforese bidimensional. Inicialmente as proteínas solubilizadas de uma amostra são separadas de acordo com o seu pl (1ª dimensão). Após a focalização, as mesmas são transferidas para um gel de poliacrilamida onde são separadas de acordo com sua massa molecular (2ª dimensão).....	62
Figura 5 - Representação gráfica da matriz de poliacrilamida contendo os monômeros de acrilamida modificados, onde R representa os grupamentos ácidos carboxílicos ou aminas terciárias.....	63
Figura 6 - Esquema representativo das etapas envolvidas na identificação de proteínas através da espectrometria de massas.....	67
Figura 7 - Os analitos são misturados a uma matriz que na maioria das vezes trata-se de um ácido orgânico que quando seco cristaliza-se junto com a amostra. Seguidamente, um laser é incidido nesse complexo matriz/analito promovendo a transferência do complexo para a fase gasosa. Após inúmeras colisões íons-molécula que ocorrem durante esse processo há a formação de moléculas monocarregadas que são aceleradas para um analisador de massas.....	69
Figura 8 - Representação esquemática da ionização por <i>electrospray</i> . Em a , descrição da teoria do modelo do resíduo carregado; em b , a descrição do modelo da dessorção de íons.....	71
Figura 9 - Representação esquemática de ionização por dessorção a laser assistida por matriz utilizando um analisador de massas do tipo <i>time-of-flight</i>	72
Figura 10 - Representação esquemática de analisador de massa do tipo quadrupolar.....	73

Figura 11 - Representações esquemáticas de analisadores do tipo <i>Ion-trap</i> . Em a um 3D <i>Ion-trap</i> e em b um Linear <i>Ion-trap</i>	74
Figura 12 - Representações de um detector tipo multiplicador de elétrons.....	76
Figura 13 - Sequência da dosagem de flúor nas amostras de plasma e rim.....	88

Figura 14 - Homogeneização do tecido renal para determinação da concentração de flúor.....	89
Figura 15 - Homogeneização do tecido renal em N ₂ para posterior extração das proteínas.....	90
Figura 16 - Focalização isoeletrica no Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare).....	91
Figura 17 - Segunda dimensão em géis SDS-PAGE 12,5% (200 mm X 255 mm X 1,5 mm), no sistema <i>Ettan DALTsix</i> (GE Healthcare).....	93
Figura 18 - Excisão e recorte dos <i>spots</i> selecionados para espectrometria de massas	95
Figura 19 - Seleção dos parâmetros de busca de íons MS/MS no programa MASCOT.....	97
Figura 20: Perfil proteômico obtido a partir de extrato renal. Em a, o resultado obtido por Tilton e colaboradores (2007) e em b, o resultado obtido neste estudo	103
Figura 21 - Géis bidimensionais representativos de proteínas renais de ratos dos grupos controle, grupo tratado com 50 mgF/Kg (T1) e tratado com 100 mgF/Kg (T2). As proteínas foram focalizadas em strips de 24 cm e faixa de pH 3-10 linear, e em seguida separadas pela massa molecular em gel de poliacrilamida 12,5% e coradas com azul de Coomassie coloidal G250.....	104
Figura 22. Gel representativo contendo os spots comuns aos dois grupos sobrepostos. Em azul estão representados os spots do grupo controle e em vermelho os spots pertencentes ao grupo T1 (50 mgF/Kg).....	105
Figura 23 - Géis bidimensionais obtidos a partir da focalização isoeletrica em tiras de pH 3-10, 24 cm, e corados em azul de coomassie coloidal. Os spots circundados em verde apresentam diferença de expressão entre os grupos controle (A) e T1 (B).....	107
Figura 24 - Géis bidimensionais obtidos a partir da focalização isoeletrica em tiras de pH 3-10, 24 cm, e corados em azul de coomassie coloidal. Os spots circundados em verde estavam presentes apenas no controle (A) quando comparado com grupo T1 (B).....	109
Figura 25 - Géis bidimensionais obtidos a partir da focalização isoeletrica em tiras de pH 3-10, 24 cm, e corados em azul de coomassie coloidal. Os spots circundados em verde estavam presentes apenas no grupo T1 (A), quando comparado ao controle (B).....	111

Figura 26. Gel representativo contendo os spots comuns aos dois grupos sobrepostos. Em azul estão representados os spots do grupo controle e em vermelho os spots pertencentes ao grupo T2 (100 mgF/Kg).....	113
Figura 27 - Géis bidimensionais obtidos a partir da focalização isoeletrica em tiras de pH 3-10, 24 cm, e corados em azul de coomassie coloidal. Os spots circundados em verde apresentam diferença de expressão entre os grupos controle (A) e T2 (B).....	115
Figura 28 - Géis bidimensionais obtidos a partir da focalização isoeletrica em tiras de pH 3-10, 24 cm, e corados em azul de coomassie coloidal. Os spots circundados em verde estavam presentes apenas no grupo controle (A), quando comparado ao T2 (B).....	117
Figura 29 - Géis bidimensionais obtidos a partir da focalização isoeletrica em tiras de pH 3-10, 24 cm, e corados em azul de coomassie coloidal. Os spots circundados em verde estavam presentes apenas no grupo T2 (A), quando comparado ao controle (B).....	119
Figura 30. Gel representativo contendo os spots comuns aos dois grupos sobrepostos. Em azul estão representados os spots do grupo T1 (50 mgF/Kg) e em vermelho os spots pertencentes ao grupo T2 (100 mgF/Kg).....	121
Figura 31 - Géis bidimensionais obtidos a partir da focalização isoeletrica em tiras de pH 3-10, 24 cm, e corados em azul de coomassie coloidal. Os spots circundados em verde apresentam diferença de expressão entre os grupos T1 (A) e T2 (B).....	123
Figura 32 - Géis bidimensionais obtidos a partir da focalização isoeletrica em tiras de pH 3-10, 24 cm, e corados em azul de coomassie coloidal. Os spots circundados em verde estavam presentes apenas no grupo T1 (A), quando comparado ao T2 (B).....	125
Figura 33 - Géis bidimensionais obtidos a partir da focalização isoeletrica em tiras de pH 3-10, 24 cm, e corados em azul de coomassie coloidal. Os spots circundados em verde estavam presentes apenas no grupo T1 (A), quando comparado ao T2 (B).....	127
Figura 34. Gráfico representando a distribuição entre os grupos dos spots de proteínas submetidos à MS.....	130
Figura 35. Proteínas do extrato renal, identificadas como múltiplos spots (circundados em verde). É possível perceber que há uma variação tanto no PI, quanto na MM da proteína Alpha-2-μ-globulin.....	131

Figura 36. Gráfico obtido a partir do MASCOT para o spot 700. As barras presentes na área sombreada em verde não foram considerados matches significativos, uma vez que estão abaixo do valor limite. Porém, dois outros matches foram considerados significativos e provavelmente apresentam coincidência com alguma proteína..... 132

Figura 37. Distribuição funcional das proteínas identificadas a partir de extrato renal. Foi adotado o esquema de classificação de Rison (2000)..... 133

Figura 38. Via metabólica da Adenosylhomocysteinase, S-adenosilmetionina e homocisteína..... 134

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentração de acrilamidas recomendada e suas respectivas faixas de separação.....	64
Tabela 2- Peso corporal (g) dos animais do grupo controle e o volume de água deionizada ingerido.....	86
Tabela 3- Peso corporal (g) dos animais do grupo 50 mgF/Kg e o volume de solução fluoretada (18 g F/L) ingerido.....	86
Tabela 4- Peso corporal (g) dos animais do Grupo 100 mgF/Kg e o volume de solução fluoretada (18 g F/L) ingerido.....	87
Tabela 5- Dosagem de proteínas do homogenato renal, e volume de amostra utilizado para obtenção do pool.....	91
Tabela 6 - Concentração média ($\pm$ EP) de fluoreto no plasma e rins dos animais, após administração de doses únicas de fluoreto por gavagem gástrica.....	102

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

% - Porcentagem
°C - Grau Celsius
µg – micrograma
µL – Microlitro
µM – Micromolar
2DE - Two dimensional electrophoresis (eletroforese bidimensional)
3-DG - 3-deoxyglucosone
ACN - Acetonitrila
ADH - Alcohol dehydrogenase
AdoHcyase - Adenosylhomocysteinase
ADP - Adenosina difosfato
AG - Ácidos graxos
ALDH2 - Aldehyde dehydrogenase mitochondrial
AMBIC - Bicarbonato de amônio
ATP – Adenosina trifosfato
BSA - Albumina de soro bovina
Ca⁺⁺ - cálcio
CO₂ - Dióxido de carbono
CoA - Coenzima A
CRM - Charged-residue model (modelo do resíduo carregado)
DC - Direct-current (corrente direta)
DCL - Dose certamente letal
DL_{50 dose} - Dose letal
DNA - Ácido desoxiribonucleico
DPT - Dose provavelmente tóxica
DTT – Ditionitrito
EC - Enzymes classification
EF-1-α-1 - Elongation factor 1-alpha 1
ESI - Electrospray Ionization
g – gramas
GABA-T - 4-aminobutyrate aminotransferase mitochondrial
GM2 - Gangliosídeo GM2
GM2AP - GM2 activator protein
GM3 - Gangliosídeo GM3

GOT - Transaminase glutâmico-oxalacética
GPT - Glutamato-piruvato transaminase
GRHPR - Glyoxylate reductase/ hidroxypyruvate reductase
GTP - Guanosina trifosfato
h – Hora
HMDS – Hexametildisiloxano
IAA – Iodoacetamida
IDM - íon-desorption model
IEF - Isoelectric focalization (Focalização isoelétrica)
IPG - Immobilized pH gradient (Gradiente de pH imobilizado)
IT - Armadilha de íons (Ion trap)
 K^+ - Potássio
Kg - Quilograma
kV – Quilovolts
L – Litros
LAL-1 - liver annexin-like protein 1
LC - Cromatografia líquida (liquid Chromatography)
M – Molar
m/z - Razão entre a massa e a carga
mA – Miliamper
MALDI - Matrix-assisted laser desorption ionization (Ionização/desorção a laser assistida por matiz)
mg – Miligramas
Min – Minutos
mL – Mililitros
MM – Massa molecular
mM – Milimolar
MS - Mass spectrometry (Espectrometria de massas)
 N_2 - Nitrogênio líquido
 NAD^+ - Nicotinamida adenina dinucleotídeo
 $NADP^+$ - Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidada
NADPH - Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzida
NaOH – Hidróxido de sódio
NAPRT1 - Nicotinate phosphoribosyltransferase
ng – Nanogramas
nm – Nanometros

p/v – Peso/volume

PAGE - Poliacrylamide gel electrophoresis (Eletroforese em gel de poliacrilamida)

PDC-E2 - Pyruvate dehydrogenase complex component E2

PGPC - *Plasma glutamate carboxypeptidase*

pH - Potencial hidrogeniônico

Pi - fosfato inorgânico

pI - Ponto isoelétrico

PMF - Peptide mass fingerprinting

ppm - Parte por milhão

RF – Radiofrequência

RNA - Ácido ribonucleico

rpm - Rotações por minuto

SDS - Dodecil sulfato de sódio

TBARS - Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

TCA - Ácido tricloroacético

TEMED – Tetrametiletilenodiamina

TMABA-DH - 4-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase

TOF - Time-of-flight (Tempo de voo)

UDP - Uridina difosfato

V – Volts

W – Watts

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	45
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	49
2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O FLUORETO.....	49
2.1.1 O elemento químico flúor.....	49
2.1.2 Características metabólicas do fluoreto.....	50
2.2 TOXICIDADE DO FLUORETO.....	54
2.2.1 Crônica	54
2.2.2 Aguda.....	55
2.3 BIOMARCADORES.....	58
2.4 ANÁLISE PROTEÔMICA.....	59
2.4.1 ELETROFORESE BIDIMENSIONAL (2DE).....	61
2.4.1.1 Focalização Isoelétrica (IEF).....	62
2.4.1.2 - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida contendo Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE).....	63
2.4.1.3 - Detecção das proteínas em gel.....	64
2.4.2 ESPECTROMETRIA DE MASSAS (MASS SPECTROMETRY -MS).....	65
2.4.2.1 Fontes de Ionização.....	67
2.4.2.1.1 Ionização por dessorção a laser assistida por matriz (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization - MALDI).....	68
2.4.2.1.2 Ionização por spray de elétrons (Electrospray ionization - ESI).....	69
2.4.2.2 Analisadores de massas.....	71
2.4.2.2.1 Time-of-Flight (TOF).....	71
2.4.2.2.2 Analisador Quadrupolar (Quadrupole Analyser).....	72
2.4.2.2.3 Armadilhas de íons (Ion Trap - IT).....	73
2.4.2.3 Detectores.....	75
2.4.2.3.1 Copo de Faraday (Faraday cup)	75
2.4.2.3.2 Multiplicadores de Elétrons.....	75
2.5 PROTEÔMICA APLICADA À TOXICOLOGIA.....	76
3 PROPOSIÇÃO.....	81
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	85
4.1 OBTENÇÃO, TRATAMENTO DOS ANIMAIS E COLETA DE AMOSTRAS..	85

4.2 DOSAGENS DE FLUORETO.....	87
4.2.1 Plasma.....	87
4.2.2 Rins.....	89
4.3 ANÁLISE PROTEÔMICA.....	89
4.3.1 - Preparo da amostra.....	89
4.3.2 Eletroforese bi-dimensional.....	91
4.3.2.1 <i>Focalização Isoelétrica (Primeira Dimensão)</i>	91
4.3.2.2 <i>Eletroforese SDS-PAGE (Segunda Dimensão)</i>	92
4.3.3 - Visualização e análise de imagens da eletroforese bi-dimensional.....	93
4.3.4. Preparo das amostras para espectrometria de massa.....	94
4.3.5 - Sequenciamento das proteínas.....	96
4.3.5.1 - LC/MS/MS.....	96
4.3.5.2 - <i>Análise dos espectros de massas e identificação das Proteínas.....</i>	96
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	97
5 Resultados e Discussão.....	101
5.1 - ANÁLISE DE FLUORETO.....	101
5.2 ANÁLISE PROTEÔMICA.....	103
5.2.1. <i>ANÁLISE DAS IMAGENS.....</i>	103
5.2.2. <i>ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE OS GRUPOS.....</i>	105
5.2.3. <i>PROTEÍNAS IDENTIFICADAS.....</i>	129
5.2.3.1. Proteínas Relacionadas ao metabolismo.....	133
5.2.3.2 Proteínas Relacionadas a Vias de Informação.....	142
5.2.3.3 Proteínas relacionadas com “Processo celulares”	144
5.2.3.4 Proteínas pertencentes à categoria “Transporte de moléculas”	146
5.2.3.5 Proteínas pertencentes à categoria de “Estrutura e organização celular”	149
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	153
REFERÊNCIAS.....	157
ANEXOS.....	165

1 INTRODUCTION

1 INTRODUÇÃO

O uso disseminado do fluoreto tem contribuído consideravelmente para uma redução na prevalência e incidência da cárie dentária. Apesar de seus efeitos terapêuticos, quando o mesmo é consumido de maneira inadequada (tanto em dose crônica como aguda) pode causar reações indesejáveis. Seus efeitos variam desde fluorose dentária, fluorose esquelética, distúrbios gástricos, redução na capacidade de concentração urinária e até a mesmo a morte em situações extremas (WHITFORD, 1996).

Os rins são órgãos essenciais para o equilíbrio do fluoreto, uma vez que os mesmos são os principais órgãos excretores desse elemento. Muitos trabalhos têm observado uma boa correlação entre a ingestão e a eliminação de fluoreto na urina, uma vez que, em uma pessoa saudável, aproximadamente 50% do fluoreto ingerido é excretado pela urina (SMITH; EKSTRAND, 1996b; WHITFORD, 1996; BUZALAF; CARDOSO, 2008). Mudanças estruturais marcantes têm sido relatadas em rins de animais com intoxicação crônica ou aguda por fluoreto, tais como hemorragia, hiperemia glomerular e medular, alterações inflamatórias, destruição tubular e edema intersticial (KOBAYASHI et al., 2009). Adicionalmente, três condições patológicas têm sido notadas nestes animais: glomerulonefrite subaguda, nefrite crônica e necrose (OGILVIE, 1953).

Também têm sido observados danos severos causados por ingestão crônica de fluoreto em outros tecidos como músculos, fígado, glândulas tireóide e paratireóide, glândula pituitária, cérebro, ossos e dentes (KRISHNAMACHARI, 1986; GUAN et al., 1998; STRUNECKA, 2007). Além disso, o fluoreto pode causar elevação nos níveis sanguíneos de K^+ e diminuição de Ca^{++} , o que diminui a atividade enzimática mitocondrial (ANURADHA; KANNO; HIRANO, 2001; SU et al., 2003).

É sabido que em concentrações milimolares o fluoreto pode influenciar muitas funções celulares *in vitro*, causando efeitos citotóxicos em células dos ductos renais coletores e proximal (CITTANOVA et al., 1996; ZAGER; IWATA, 1997). Entretanto, quando em concentrações micromolares os efeitos celulares do fluoreto são menores, resultando apenas na inibição de algumas enzimas. Algumas fosfatases são muito sensíveis ao fluoreto, como a pirofosfatase inorgânica (inibida com 200

μM), a fosfatase ácida de células ósseas (inibida com 50-200 μM) e a fosfatase ácida tartraro-resistente osteoclástica (inibida com 200-1000 μM) (BAYKOV; ALEXANDROV; SMIRNOVA, 1992; JANCKILA et al., 1992; PINKSE; MERKX; AVERILL, 1999).

A análise proteômica é um dos vários campos “OMICOS” (como a genômica, a transcriptômica, metabolômica, interatômica, etc.) que vem crescendo rapidamente na era pós-genômica. O rápido progresso da proteômica se deve ao fato de a mesma complementar e ser complementada pelos dados gerados pela genômica e transcriptômica, representando uma ponte de ligação entre os genes e seus produtos, as proteínas (HAYNES; YATES, 2000; THONGBOONKERD, 2004).

Inúmeros tipos de estudos compõem a proteômica, porém a abordagem clássica é o estudo da expressão protéica global, que envolve a criação de mapas quantitativos das proteínas expressas em extratos de células ou tecidos. Os perfis protéicos expressos sob diferentes condições fisiológicas são então comparados, e as informações deste tipo de estudo podem permitir a identificação de proteínas de transdução de sinal ou ainda identificar proteínas específicas de estados patológicos e fisiológicos (GRAVES; HAYSTEAD, 2002).

Deste modo, a análise proteômica completa gera novas hipóteses para um melhor entendimento da fisiologia normal bem como dos mecanismos das doenças, sendo de grande utilidade para a descoberta de biomarcadores para detecção precoce de doenças, identificação de novas terapias e descoberta de novas drogas. Neste sentido, poderia ser empregada na análise da expressão diferencial de proteínas em tecidos corporais após a ingestão de doses excessivas de fluoreto.

Com base no exposto, quando se pensa no metabolismo e toxicidade do fluoreto, o tecido de escolha para o estudo da expressão protéica diferencial induzida por este elemento seria o rim, por ser sua principal via de excreção e apresentar níveis elevados deste elemento. A identificação de proteínas-alvo que poderiam ter seu perfil alterado no extrato renal nos casos de intoxicações agudas por fluoreto auxiliaria na identificação dos possíveis alvos terapêuticos, bem como na identificação de biomarcadores para esta e outras intoxicações que causariam danos aos rins. Assim, este trabalho buscou identificar alterações induzidas pelo fluoreto na expressão protéica global no tecido renal, através da separação de proteínas por eletroforese bidimensional e identificação por espectrometria de massas.

2 REVISTA DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O FLUORETO

Neste tópico serão apresentadas as características do elemento flúor, bem como o seu destino no organismo.

2.1.1 O ELEMENTO QUÍMICO FLÚOR

O nome flúor, dado por André Ampère em 1812, tem origem na palavra em latim *fluere*, que significa “fluir”. Tal nomeação deve-se ao fato de que em 1529, o geólogo alemão Georgius Agricola descreveu a utilização de um mineral (antes chamado de fluorespato e hoje conhecido como fluorita) como fundente de metais a temperaturas relativamente baixas (PEIXOTO, 1998; BUZALAF; CARDOSO, 2008).

Em condições normais de temperatura e pressão o flúor é um elemento gasoso, com pontos de fusão e ebulição de $-219,62$ e $-188,12^{\circ}\text{C}$, respectivamente, e de coloração amarelo-pálida. Possui como símbolo a letra F, seu número atômico é 9, e seu peso atômico é 19. Por possuir um pequeno raio atômico, sua carga de superfície efetiva é maior que a dos outros elementos, tornando-o deste modo o elemento mais eletronegativo e reativo da tabela periódica. Essas características fazem com que o íon fluoreto se ligue facilmente a qualquer outro elemento, e estas ligações são mais estáveis que a de uma molécula de F_2 (SMITH; EKSTRAND, 1996a; PEIXOTO, 1998; BUZALAF; CARDOSO, 2008).

Devido à sua extrema reatividade, o flúor raramente ocorre em sua forma livre, estando presente principalmente nos minerais fluorita (CaF_2 , 49% de fluoreto), fluorapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$, 3,4% de fluoreto) e criolita (Na_3AlF_6 , 54% de fluoreto) (EKSTRAND, 1996; BUZALAF; CARDOSO, 2008). Como consequência, durante muito tempo estas características impediram a sua obtenção. A descoberta do elemento flúor somente veio acontecer em 1886 por Henri Moissan, na França.

Nessa data, Moissan produziu fluoreto pela eletrólise de uma solução resfriada de bifluoreto do potássio (KHF_2) em ácido fluorídrico anidro (HF), usando eletrodos de platina e irídio num tubo em forma de “U” e selado nas duas extremidades com fluorespato (PEIXOTO, 1998).

O flúor é encontrado na natureza mais frequentemente na forma inorgânica, sendo o 13º elemento mais abundante na crosta terrestre (participa com 0,03% em massa), com uma concentração de 950 ppm. Quando considerado do ponto de vista biológico, geralmente é classificado como elemento traço, uma vez que sua ocorrência em organismos biológicos comumente está na casa de partes por milhão (ppm) (SMITH; NINCI, 1996).

2.1.2 CARACTERÍSTICAS METABÓLICAS DO FLUORETO

Para melhor entendimento do metabolismo do fluoreto, é necessário ter em mente que este se combina reversivelmente com íons hidrogênio ($\text{H}^+ + \text{F}^- \rightleftharpoons \text{HF}$) para formar o HF, um ácido fraco com pK_a de 3,4. Grande parte do comportamento fisiológico do fluoreto pode ser explicado pela alta difusibilidade do HF. Estudos demonstram que vários aspectos do metabolismo do fluoreto são pH-dependentes e que o transporte deste íon através da membrana ocorre na forma de HF, em resposta a diferenças de pH entre compartimentos adjacentes de fluidos corporais. Estudos com membranas de bicamada lipídica mostraram ainda que o coeficiente de permeabilidade do HF é cerca de um milhão de vezes maior que o do fluoreto (WHITFORD, 1996).

A figura 1 esboça as características gerais da distribuição do fluoreto pelo organismo. Após a ingestão, o fluoreto é rapidamente absorvido no trato gastrointestinal, sendo essa absorção passiva e independente de mecanismos especiais de transporte. Essa rápida absorção está diretamente relacionada à acidez gástrica. Uma vez presente em um ambiente ácido, como a cavidade estomacal, o fluoreto é facilmente convertido em HF, que rapidamente atravessa as membranas biológicas, incluindo a mucosa gástrica. O restante do fluoreto que não foi absorvido passará ao intestino onde é absorvido através de canais existentes nas junções celulares não sendo, portanto, pH-dependente (WHITFORD, 1990; EKSTRAND, 1996; WHITFORD, 1996).

Figura 1. Esquema geral da distribuição e eliminação do fluoreto no organismo. Modificado de Whitford (1996).

O fluoreto distribui-se rapidamente pelo organismo. Após sua absorção, os níveis plasmáticos aumentam rapidamente, como mostrado na figura 2, atingindo o pico após 20 a 60 min, para então retornar aos níveis de pré-ingestão depois de 3 a 11 h, dependendo da dose (WHITFORD, 1996). No plasma, o fluoreto pode estar na forma iônica (fração inorgânica), que tem importância na odontologia e medicina, ou associado a constituintes plasmáticos (fração orgânica), cuja importância biológica ainda permanece desconhecida. O rápido declínio nas concentrações plasmáticas ocorre conforme a proporção de absorção diminui devido à contínua incorporação deste elemento ao osso e também à excreção urinária (EKSTRAND, 1996; WHITFORD, 1996; BUZALAF; CARDOSO, 2008).

Figura 2. Exemplo de uma curva de concentração do fluoreto no plasma em função do tempo. Modificado de Whitford, 1996

Os tecidos mineralizados retêm cerca de 99% de todo o fluoreto presente no organismo. As concentrações deste íon no osso e na dentina se assemelham e aumentam ao longo da vida, ao passo que o esmalte detém menor concentração e reflete o nível de exposição a este elemento durante a odontogênese. O *clearance* do fluoreto plasmático pelo esqueleto ocorre rapidamente, sendo que aproximadamente 50% do total absorvido diariamente por jovens ou adultos de meia idade saudáveis se associa aos tecidos mineralizados em 24 h. Entretanto, o fluoreto presente nos tecidos calcificados não está ligado de maneira irreversível, principalmente aquele que foi recentemente adquirido e está localizado nos cristalitos da superfície óssea, os quais podem fazer trocas iso-iônicas ou hetero-iônicas (com outros ânions do fluido extracelular). O fluoreto presente em regiões profundas do tecido ósseo pode ser liberado, ao longo do tempo, durante o processo de remodelação óssea (RAO et al., 1995; WHITFORD, 1996; ABIKO et al., 2001; BUZALAF et al., 2004a; LEITE et al., 2008).

Já nos tecidos moles, o fluoreto rapidamente estabelece um estado estacionário de distribuição entre os fluidos extracelular e intracelular. Em geral, os níveis de fluoreto na maioria dos tecidos moles são menores que os plasmáticos, mas ocorre um aumento ou uma diminuição simultânea e proporcional dos níveis de fluoreto em ambos os compartimentos (WHITFORD, 1996).

O restante do fluoreto que não foi retido no organismo será eliminado, sendo os rins a principal rota de remoção deste íon no corpo. A taxa de excreção deste elemento é uma variável importante por diversos fatores, incluindo o fato de ser frequentemente utilizada como biomarcador da ingestão de fluoreto (EKSTRAND, 1996; WHITFORD, 1996). Em condições normais, aproximadamente metade do fluoreto ingerido diariamente pelos adultos é excretada através da urina. Consequentemente, o plasma e a excreção urinária refletem um balanço fisiológico que é determinado pela ingestão prévia de fluoreto, o grau de acumulação do íon no osso, a taxa de mobilização do osso e a eficiência dos rins em excretá-lo (EKSTRAND; ERICSSON; ROSELL, 1977; EKSTRAND; SPAK; VOGEL, 1990).

O *clearance* renal do fluoreto é bastante alto quando comparado a outros halógenos como o cloro, bromo e iodo, cujos *clearances* em adultos jovens ou de meia idade saudáveis são da ordem de 2 mL/min, ao passo que o do fluoreto é em torno de 35 mL/min (EKSTRAND, 1996; WHITFORD, 1996; BUZALAF; CARDOSO, 2008).

Assim, como acontece para a absorção gástrica, o mecanismo de reabsorção tubular parece acontecer por difusão do HF. Quando a urina está relativamente alcalina, quase todo o fluoreto está presente na forma iônica, e, devido ao seu tamanho e carga, permanece no interior do túbulo renal para ser excretado sendo, portanto, o *clearance* renal alto (figura 3a). Quando a urina está relativamente ácida a concentração de HF aumenta, aumentando assim o gradiente de concentração transtubular de HF e, consequentemente, o grau de sua difusão do lúmen tubular para o fluido intersticial, reduzindo a quantidade do íon a ser excretada (figura 3b). No fluido intersticial, onde o pH é mantido próximo da neutralidade, independentemente do pH do fluido tubular, o HF se dissocia e o íon fluoreto se difunde para os capilares, retornando à circulação sistêmica (WHITFORD; PASHLEY, 1984; WHITFORD, 1996; BUZALAF; CARDOSO, 2008).

Figura 3. Mecanismo de reabsorção tubular do fluoreto. Em **a**, o comportamento do fluoreto perante uma urina alcalina, e em **b**, na presença de urina ácida.

2.2 TOXICIDADE DO FLUORETO

2.2.1 CRÔNICA

Apesar de seus reconhecidos efeitos terapêuticos, quando consumido de maneira inadequada, tanto de forma crônica quanto aguda, o fluoreto pode causar reações indesejáveis. Seus efeitos variam desde fluorose dentária a distúrbios gástricos reversíveis, reduções transitórias na capacidade de concentração urinária, fluorose esquelética e até mesmo a morte (WHITFORD, 1996).

Os efeitos colaterais crônicos da ingestão excessiva de fluoreto ocorrem pela administração de doses pequenas e constantes, atingindo principalmente os tecidos mineralizados. Quando essa exposição excessiva e crônica ocorre no período da formação dos dentes, o fluoreto pode interferir no processo de amelogenese, o que resultará em um esmalte hipomineralizado. Esta condição é conhecida como fluorose dentária, que em suas formas mais suaves, dá-se na forma de pequenas linhas brancas, ao passo que nas formas mais severas pode resultar na perda da

maior parte do esmalte alterando a anatomia dentária. (FEJERSKOV; RICHARDS; DENBESTEN, 1996; SAMPAIO, 2008).

Uma condição mais séria que a fluorose dentária é a chamada fluorose esquelética, que resulta de um longo período de exposição a altas doses fluoreto. Ela pode ser classificada em 6 estágios de severidade crescente: a fase assintomática, a fase sintomática inicial, a fase esquelética estabelecida, a fase de complicações, a fase de enfraquecimento e a fase de incapacitação. As características clínicas da fluorose esquelética incluem imobilização das articulações e uma combinação de outras discrepâncias como exostose, osteoesclerose, osteomalácia e osteoporose. Joelho valgo (*knock knee*) e joelho varo também são características comuns da fluorose esquelética (KRISHNAMACHARI, 1986). Até o momento, o diagnóstico precoce pode ser realizado através de densitometria óssea, mas não há agentes terapêuticos para o tratamento da fluorose esquelética. Esta doença metabólica crônica é endêmica em várias partes do mundo, onde a concentração de fluoreto na água de beber é encontrada acima de 4 ppm, sendo necessária que haja a desfluoretação da água a ser consumida (LEITE; BUZALAF, 2008; SAMPAIO, 2008).

SHANTHAKUMARI et al. (SHANTHAKUMARI; SRINIVASALU; SUBRAMANIAN, 2004) observaram um aumento na concentração de TBARS e peroxidação lipídica, além de uma redução na atividade de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase no fígado e rins nos grupos de ratos tratados com 25 ppm de fluoreto durante 8 e 16 semanas. Também foi relatado que o fluoreto aumenta significativamente a atividade de enzimas como a glutamato-piruvato transaminase (GPT), transaminase glutâmico-oxalacética (GOT) e fosfatase alcalina, bem como a geração de radicais livres. Na análise histopatológica, os rins apresentaram discreta necrose nos túbulos e feixes vasculares dos glomérulos.

2.2.2 AGUDA

Os efeitos agudos do fluoreto são devidos à administração de doses elevadas e frequentes, e as principais consequências relatadas são casos de intoxicação,

havendo também alguns casos isolados de morte (GOLINSKY, 1981; LI, 1993; SHULMAN; WELLS, 1997; WHITFORD, 2008).

A dose máxima de fluoreto seguramente tolerada, ou DPT, tem sido definida como sendo a dose mínima que poderia causar sinais e sintomas tóxicos e que requereria intervenção terapêutica e hospitalização imediatas (WHITFORD; ALLMANN; SHAHED, 1987; WHITFORD, 2008). Baseado em relatos de casos de intoxicação por este elemento, concluiu-se que a DPT é aproximadamente 5 mg fluoreto/kg peso corporal. Por outro lado, a DCL, isto é, aquela em que se espera que nenhuma pessoa a qual ingerir tal dose de fluoreto sobreviva, encontra-se entre 32 e 64 mgF/kg peso corporal, embora haja casos de morte de crianças com doses bem menores que esta (DUKES, 1980; EICHLER et al., 1982; WHITFORD, 2008).

Os casos de intoxicação podem ocorrer através da via oral (ingestão), das vias respiratórias (inalação) e através do contato com a pele (absorção). Os casos relacionados à via oral são na maioria das vezes devido à confusão de compostos fluoretados com outras substâncias semelhantes. O fluoreto de sódio era muito utilizado como raticida e pesticida, que eram facilmente encontrados em casas e hospitais, e o pó destas substâncias era facilmente confundido com farinha de trigo, açúcar, fermento em pó dentre outros (WHITFORD, 1996). Um dos acidentes mais catastróficos resultante dessa confusão ocorreu no Hospital Estadual de Oregon em 1942, onde cerca de 10 galões de ovos mexidos foram misturados com aproximadamente 7 Kg de fluoreto de sódio, que por sua vez foi confundido com leite em pó. Um total de 263 pessoas foram envenenadas das quais 47 vieram a óbito (LIDBECK; HILL; BEEMAN, 1943).

Casos como esses são incomuns atualmente, mas exemplos recentes ainda podem ser citados, como o caso que ocorreu em Osaka, Japão, no ano de 2004 onde um trabalhador teve sua face pulverizada com ácido fluorídrico, muito utilizado nas indústrias e alguns produtos domésticos, o que provocou queimaduras de terceiro grau. O trabalhador veio a óbito cerca de 1 h e 30 min depois do incidente e a concentração de fluoreto encontrada em seu soro foi de 63,8 µgF/mL (ppm), com hipocalcemia e hipercalemia (TAKASE et al., 2004).

A evolução clínica do quadro de toxicidade aguda pelo fluoreto é bastante rápida. Quase imediatamente após a exposição a uma grande dose, o indivíduo tem náusea e desconforto gástrico, frequentemente acompanhados por vômito. Sinais e sintomas não específicos, como salivação e lacrimejamento excessivos, descargas

de muco do nariz, dores de cabeça, hiperidrose, diarreia e fraqueza generalizada, podem estar ou não presentes. Se uma dose potencialmente letal está envolvida, sintomas miopatológicos, incluindo espasmo das extremidades, tetania e convulsões, podem estar envolvidos. A falha progressiva do sistema cardiovascular pode ser indicada pelo pulso pouco detectável, hipotensão e arritmias cardíacas. Os problemas musculares e cardiovasculares sinalizam distúrbios no balanço de eletrólitos, particularmente hipocalcemia e hiperpotassemia (WHITFORD, 1996).

WHITFORD e colaboradores (WHITFORD; ALLMANN; SHAHED, 1987) relatam que os rins são um dos órgãos-alvo na intoxicação aguda pelo fluoreto. Isto se deve, em parte, ao fato de que, para qualquer nível de fluoreto plasmático, e comparado com outros órgãos, as células renais estão expostas a concentrações de fluoreto relativamente altas. Em adição, à semelhança do sódio e do cloreto, o fluoreto mostra um gradiente progressivo de concentração córtex-medula, de forma que a razão da concentração medula-córtex é entre 3 e 4 (WHITFORD; TAVES, 1973). Assim, as porções responsáveis pela habilidade dos rins em concentrar a urina e conservar a água no organismo, como a alça de Henle e ductos coletores, são expostas às concentrações mais elevadas de fluoreto nos rins.

Na década de 1960, foi relatada pela primeira vez uma grande falha renal em alguns pacientes que tinham sido anestesiados com metoxiflurano, um anestésico fluoretado volátil (FRY; TAVES; MERIN, 1973) observaram que os níveis plasmáticos de fluoreto tanto em humanos quanto em ratos no dia seguinte à anestesia eram em torno de 0,4 a 1,2 $\mu\text{g/mL}$, podendo chegar a 6 $\mu\text{g/mL}$ em casos extremos. A síndrome, que lembra o diabetes insipidus, é caracterizada por uma diurese resistente ao hormônio antidiurético, baixa osmolaridade urinária, e em alguns dos pacientes mais seriamente afetados, hemoconcentração e desbalanço de eletrólitos. O mecanismo envolvido parece ser uma redução induzida pelo fluoreto na hipertonicidade normal do interstício medular renal (WHITFORD; TAVES, 1973).

Apesar dos vários relatos na literatura sobre a toxicidade do fluoreto, pouco se sabe sobre os mecanismos responsáveis por esse efeito. Estudos recentes têm demonstrado que o fluoreto em concentrações na ordem de μM induz apoptose de várias linhagens celulares, bem como induz alteração da resposta imunológica (ANURADHA; KANNO; HIRANO, 2001; REFSNES et al., 2001; REFSNES et al.,

2003; WANG et al., 2004). No entanto, o mecanismo molecular dessas ações ainda não está completamente esclarecido. Acredita-se que pelo menos 3 classes de proteínas envolvidas em pontos chaves de transdução de sinal sejam afetadas pelo fluoreto: proteínas G, proteínas quinases e proteínas fosfatases (REFSNES; SCHWARZE; HOLME et al., 2003).

2.3 BIOMARCADORES

Os biomarcadores podem ser definidos como uma característica que é objetivamente medida e avaliada como indicador de um processo biológico normal, um processo patogênico, ou respostas farmacológicas a uma intervenção terapêutica (ATKINSON et al., 2001).

Espera-se que um biomarcador seja capaz de fornecer, de maneira precoce, informações que permitam a obtenção de respostas precisas ou que possa pelo menos aumentar a probabilidade de acerto a certas questões, como se o indivíduo está doente, se a doença está evoluindo ou ainda se a terapia aplicada está apresentando efeitos satisfatórios. Deste modo, os estudos envolvendo biomarcadores são de extrema importância, uma vez que não só auxiliam na detecção precoce das doenças como também auxiliam a monitorá-las perante a um tratamento (GILLETTE; MANI; CARR, 2005).

Vários são os parâmetros biológicos que podem estar alterados como consequência da interação entre o agente causador e o organismo. Muitos estudos sobre biomarcadores envolvem a comparação do padrão de proteínas constituinte de uma amostra saudável com o de uma amostra afetada. As proteínas desempenham papéis fundamentais nos sistemas biológicos. Suas atividades específicas, estado de modificação, associação com outras biomoléculas e os níveis de expressão são essenciais para o desempenho ideal das funções celulares, promovendo o crescimento, a diferenciação, a proliferação e a morte celular. Por isso, as proteínas são moléculas de grande interesse na busca por biomarcadores confiáveis, uma vez que diferenças, não só nos níveis de expressão, mas também nas estruturas protéicas, geralmente indicam um quadro patológico (HANCOCK, 2003; VLAHOU; FOUNTOLAKIS, 2005).

Cotidianamente, a população está exposta a diversos agentes químicos através do ar que respira, da água que bebe e do alimento que ingere. A avaliação da exposição aos agentes químicos constitui um importante aspecto para a saúde pública, tendo em vista a possibilidade de se prevenir ou minimizar a incidência de mortes ou doenças decorrentes da interação das substâncias químicas com o organismo humano. Com relação ao fluoreto, apesar das políticas de saúde pública instituídas para sua utilização como agente terapêutico, ainda ocorrem diversos casos de intoxicação accidental. Para este elemento, os biomarcadores de exposição, ou seja, aqueles que permitem quantificar a substância no organismo quando a toxicocinética da mesma já está bem estabelecida, são o plasma, a saliva, a urina e as unhas. Para os biomarcadores de efeito, ou seja, aqueles que refletem a interação da substância química com os receptores biológicos são consideradas as fluoroses dentária e esquelética. Entretanto, em ambas a severidade depende de características individuais, hábitos dietéticos e metabolismo do cálcio (KRISHNAMACHARI, 1986; SAMPAIO, 2008). Outro fator importante é que as fluoroses não são capazes de fornecer dados a respeito de danos ocorridos nos rins, os principais alvos do fluoreto perante uma intoxicação por este elemento.

Alguns indicadores biológicos de efeito possibilitam a avaliação da ação de um agente específico no órgão-alvo a partir da medida de uma alteração biológica associada a esta ação. Vários parâmetros têm sido testados e utilizados como biomarcadores de danos renais como, por exemplo, creatinina sérica e β 2-microglobulina que, embora sejam importantes indicadores de nefrotoxicidade foram bem validados em relação à exposição ao cádmio (ROELS et al., 1993; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1994). Como não há evidências científicas suficientes para indicar um biomarcador capaz de medir alterações nas funções renais em um estágio precoce aos danos graves ocasionados por uma exposição elevada ao fluoreto, há a necessidade de pesquisas com o propósito de busca dos mesmos.

2.4 ANÁLISE PROTEÔMICA

O sucesso dos projetos genômicos na década de 90 deu-se em virtude da automação dos métodos de análises dos ácidos nucléicos, como PCR,

sequenciamento automático e *microarrays*, o que permitiu análise genômica em larga escala, tanto de organismos procariotos como eucariotos (WILKINS et al., 1997). O término do sequenciamento de nucleotídeos dos genomas de uma variedade de organismos, inclusive o genoma humano, é uma conquista incrível da biologia molecular. Entretanto, as informações geradas pela genômica não descrevem a dinâmica dos processos da vida ocorridos nas células e organismos, pois embora os padrões comportamentais das células certamente reflitam a informação estocada no genoma, são as proteínas que de fato desempenham papéis fundamentais nos sistemas biológicos.

As proteínas desempenham papéis fundamentais nos sistemas biológicos, sendo as responsáveis pelo fenótipo definitivo da célula. Suas atividades específicas, estado de modificação, associação com outras biomoléculas e os níveis de expressão são essenciais para a descrição dos sistemas biológicos. Deste modo, torna-se impossível elucidar os diversos mecanismos que interagem em um determinado organismo apenas pelo estudo dos genes. Em virtude disto, surgiu uma nova abordagem experimental na Biologia conhecida como *análise proteômica*, que consiste de um conjunto de ferramentas empregadas para caracterizar (quali e quantitativamente) um conjunto de PROTEÍNAS expressas por um dado genOMA, e este conjunto de proteínas foi chamado de PROTEOMA (WILKINS et al., 1997)

Contrariamente ao genoma, que é praticamente constante e não muda com o tempo, o proteoma é altamente dinâmico. Assim, um único genoma pode gerar um número muito grande de proteomas, dependendo do embaralhamento de exons, de modificações transcricionais dos RNAs mensageiros e modificações co e pós-tradução das proteínas (como acilação, alquilação, carboxilação, fosforilação, metilação, dentre outras), além de variáveis como estágio de crescimento, nutrição, estresse e estado patológico do organismo (WILKINS et al., 1996; THONGBOONKERD, 2004).

A análise global das proteínas tem se constituído de múltiplas técnicas que abrangem não somente seu aspecto funcional no contexto celular (microscopia eletrônica e confocal, análise de interações entre proteínas, cristalização de proteínas, dentre outras) como também técnicas que abrangem o isolamento e identificação de proteínas em larga escala (cromatografia líquida, eletroforese bidimensional e espectrometria de massas).

Na sequência, será apresentada uma visão geral sobre eletroforese bidimensional combinada com a identificação de proteínas por espectrometria de massas, que além de serem as ferramentas empregadas no presente trabalho, são atualmente as técnicas mais utilizadas em proteômica (GORG; WEISS; DUNN, 2004).

2.4.1 ELETROFORESE BIDIMENSIONAL (2DE)

A 2DE, desenvolvida independentemente por O'Farrell e Klose (KLOSE, 1975; O'FARRELL, 1975), é uma técnica de separação amplamente utilizada para a análise de misturas complexas de proteínas extraídas de células, tecidos ou outras amostras biológicas. Esta técnica promove a separação das proteínas em duas dimensões, de acordo com duas propriedades independentes. Na primeira dimensão, focalização isoeletrica (IEF), as proteínas são separadas de acordo com seus pontos isoeletricos (pI). Na segunda dimensão, uma eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) separa as proteínas de acordo com suas massas moleculares (MM) relativas (Figura 4) (WESTERMEIER; NAVEN, 2002).

Figura 4. Etapas envolvidas no processo de separação de proteínas por eletroforese bidimensional. Inicialmente, as proteínas solubilizadas de uma amostra são separadas de acordo com o seu pI (primeira dimensão). Após a focalização, as mesmas são transferidas para um gel de poliacrilamida, onde são separadas de acordo com sua massa molecular relativa (segunda dimensão).

2.4.1.1 Focalização Isoelétrica (IEF)

Proteínas são moléculas anfóteras, ou seja, podem apresentar carga líquida positiva, negativa ou neutra, dependendo de sua estrutura primária (dos aminoácidos que a compõe) e do pH do meio. Desta forma, em um gradiente de pH e sob a influência de um campo elétrico, as proteínas irão migrar para a posição do gradiente na qual sua carga líquida será zero, focalizando-se neste ponto, onde o valor de pH é numericamente igual ao pI (NELSON; COX, 2002).

Na metodologia original, a IEF das proteínas era realizada em um tubo de gel de poliacrilamida, onde um gradiente de pH era estabelecido por meio de uma pré-corrida com anfólitos carreadores específicos, que apresentam alta capacidade tamponante em pHs próximos aos seus pIs. Atualmente, o uso destes anfólitos carreadores geradores foi substituído por fitas com gradientes de pH imobilizados (*immobilized pH gradient - IPG*), fabricadas por uma reação de copolimerização de monômeros de acrilamida, bisacrilamida e acrilamidas modificadas. Estas últimas possuem em sua estrutura grupamentos R, os quais podem ser ácidos ou bases fracas com valores de pKa bem estabelecidos (WESTERMEIER; NAVEN, 2002). A

figura 5 mostra a representação gráfica da matriz de poliacrilamida contendo os grupamentos ácidos ou básicos.

Figura 5. Representação gráfica da matriz de poliacrilamida contendo os monômeros de acrilamida modificados, onde **R** representa os grupamentos ácidos carboxílicos ou aminas terciárias.

2.4.1.2 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida contendo Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE)

As proteínas previamente separadas pela IEF são transferidas para um gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), que realizará uma nova separação, mas agora baseada na MM das proteínas. O gel de poliacrilamida é formado pela mistura dos monômeros acrilamida e bisacrilamida, sendo a porosidade do mesmo, determinada por dois parâmetros: a porcentagem total de acrilamidas (%T) e a razão de entrecruzamento, proporcionado pela bisacrilamida (%C). Quanto maior for a %T, menor será o poro da malha, e por isso a escolha da concentração do gel é um parâmetro de extrema importância para que se tenha uma boa separação (GE-HEALTHCARE, 2004; CANTU, 2007). A tabela 1 demonstra a relação existente entre a concentração de acrilamidas constituintes do gel e a faixa de MM que pode ser separada.

Tabela 1. Concentração de acrilamidas recomendada e suas respectivas faixas de separação

Acrilamida + Bisacrilamida		Faixa de Separação (KDa)
(%)		
Concentração Uniforme	5	36 – 200
	7,5	24 – 200
	10	14 – 200
	12,5	14 -100
	15	14 – 60
de Concentraç	5-15%	14 – 200
	5-20%	10 – 200
	10-20%	10 – 150

Antes de iniciar a eletroforese, as variáveis forma e carga da proteína devem ser eliminadas, para que a separação dependa exclusivamente de sua MM. Para isso, as mesmas são lavadas com uma solução contendo ditioneitol (DTT) e SDS. O DTT é um agente redutor cuja função é desfazer as pontes dissulfeto, eliminando assim a forma nativa da proteína e conferindo-lhe uma conformação linear. O SDS é um tensoativo aniônico que se associa às proteínas numa proporção de aproximadamente 1,4 g de SDS por grama de proteína, tornando-as assim negativamente carregadas, o que fará com que a migração das mesmas dependa basicamente de sua massa molecular (GE-HEALTHCARE, 2004).

2.4.1.3 Detecção das proteínas em gel

Após a realização da eletroforese, o gel deve ser corado para visualização das proteínas. O método ideal de coloração deve ser sensível para detectar concentrações extremamente baixas de proteínas, ter uma faixa dinâmica de detecção, linearidade, reprodutibilidade entre experimentos e compatibilidade com métodos de identificação. Os métodos de coloração mais comumente utilizados são

os que utilizam a coloração por prata ou por azul de *Coomassie* (CANDIANO et al., 2004). A coloração por prata é o método colorimétrico mais sensível existente (1 ng/spot), porém de difícil quantificação visto que a intensidade da coloração é saturável e depende do tempo de revelação. O princípio é saturar o gel com íons de prata (Ag^+) e reduzir a prata que interage com as proteínas, a prata metálica (Ag^0) (REINDERS; SICKMANN, 2002).

O azul de *Coomassie* é o método colorimétrico pós-eletroforese mais confiável para quantificação dos *spots* já que apresenta linearidade quantitativa na faixa de concentração de proteína de 10-100 ng/spot. Trata-se de um corante orgânico que é atraído pelos grupamentos carregados das proteínas, formando fortes complexos corante/proteína. O azul de *Coomassie* pode ser encontrado nas versões G-250 e R-250, onde a letra G indica que o corante apresenta uma coloração esverdeada, ao passo que R indica que uma coloração avermelhada. O número 250 é um indicador da força do corante. Os aminoácidos básicos apresentam particular influência na interação entre moléculas de *Coomassie* e proteínas, uma vez que existe uma correlação proporcional entre a intensidade da coloração e o número de resíduos de lisinas, histidinas e argininas na proteína. Embora não se possa negar que a prata seja muito mais sensível que o *Coomassie*, muitos cientistas que trabalham com análises proteômicas diferencial e quantitativa preferem os corantes orgânicos como o *Coomassie*. Isso se deve ao fato de que a menor sensibilidade do *Coomassie* é compensada amplamente pela maior reprodutibilidade, pois, ao contrário da prata, possui protocolos mais simples com menos chances de erros (CANDIANO; BRUSCHI; MUSANTE et al., 2004). Outra vantagem da coloração com *Coomassie* é que o mesmo não interfere na análise por espectrometria de massa dos *spots* de proteínas visualizados (REINDERS; SICKMANN, 2002; CANDIANO; BRUSCHI; MUSANTE et al., 2004).

2.5 ESPECTROMETRIA DE MASSAS (MASS SPECTROMETRY - MS)

Mesmo sendo a 2-DE uma poderosa ferramenta analítica, esta técnica somente permite detectar proteínas, atribuindo a elas pI e MM, mas não é capaz de identificá-las. Ao visualizar um perfil 2-DE, não temos como saber quais proteínas

representam cada um dos *spots*. Porém, quando a MS é integrada como método pós-2-DE, uma ferramenta poderosa se configura já que as proteínas correspondentes aos *spots* selecionados podem ser identificadas.

A maioria das proteínas, na sua forma íntegra, é muito grande para ser corretamente identificada pela espectrometria de massa e por isso as mesmas precisam ser submetidos a uma digestão enzimática, geralmente feita com tripsina. Cada proteína tem uma sequência específica de aminoácidos e quando uma protease de ação conhecida atua sobre determinada proteína, peptídeos são gerados, cada um com uma sequência e uma massa específica. Esta mesma protease quando atua em outra proteína, também gera peptídeos, mas com massas e sequências distintas da primeira. Diante das possíveis combinações de aminoácidos, peptídeos distintos são gerados após a ação da protease usada, gerando uma “impressão digital das massas de peptídeos” (*peptide-mass finger printing* - *PMF*) para cada proteína (MANN; HOJRUP; ROEPSTORFF, 1993; THIEDE et al., 2005). A figura 6 ilustra a análise por espectrometria de massa de peptídeos provenientes da digestão triptica de um *spot*.

Figura 6. Esquema representativo das etapas envolvidas na identificação de proteínas através da espectrometria de massas (modificado DASS, 2007).

De uma maneira geral, a MS é uma técnica que mede a relação entre a massa e a carga (m/z) de moléculas ionizadas em fase gasosa através de um espectrômetro de massas, que pode ser considerado uma “balança molecular”, cuja finalidade é medir a massa de átomos e moléculas com extrema precisão. O equipamento é basicamente dividido em três partes: uma fonte de ionização, um analisador e um detector, sendo que a molécula a ser analisada percorre obrigatoriamente este caminho, nesta ordem (DASS, 2007).

2.5.1 FONTES DE IONIZAÇÃO

A ionização é o processo capaz de converter um átomo ou molécula em um íon. Na fonte de ionização, os componentes da amostra são convertidos em íons, seja pelo bombardeio da amostra com elétrons, íons, moléculas ou fótons, ou pelo uso de energia térmica ou elétrica. Existem diversos tipos de ionizadores, mas para análise de proteínas e peptídeos, as técnicas de ionização mais comumente utilizadas são ionização por *spray* de elétrons (*electrospray ionization* - ESI) e ionização por dessorção a laser assistida por matriz (*matrix-assisted laser desorption ionization* - MALDI) que serão brevemente descritas abaixo. Dentre as diversas

fontes podemos citar ainda a ionização eletrônica (EI - Electron Ionization), ionização química (CI - Chemical Ionization), ionização por bombardeamento rápido de átomos (FAB - Fast Atom Bombardment), ionização química à pressão atmosférica (APCI - Atmospheric Chemical Pressure Ionization), ionização por dessorção de *spray* de elétrons (DESI - Desorption Electrospray Ionization), ionização de campo (FI - Field Ionization), dessorção de campo (FD - Field Desorption), dessorção por plasma (PD - Plasma Desorption), *thermospray*, *photospray* e análise direta em tempo real (DART - Direct Analysis in Real Time) (DASS, 2007; HOFFMANN; STROOBANT, 2007).

2.5.1.1 Ionização por dessorção a laser assistida por matriz (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization - MALDI)

A técnica MALDI foi descrita por Karas e colaboradores, em 1987 (KARAS et al., 1987). O princípio da técnica baseia-se em misturar a amostra com um solvente contendo um material com capacidade de absorver luz no comprimento de onda do laser, conhecido como matriz (ácido 2,5-dihidroxibenzóico ou ácido α -cyano-4-hidroxicinâmico). Inicialmente é feita a aplicação da amostra juntamente com a matriz e, em seguida, a mesma é atingida por um feixe de laser como ilustrado na figura 7. A matriz é capaz de absorver a energia do laser e transferir para a molécula de interesse, resultando na evaporação e ionização de ambos. Este processo ocorre em uma câmara sob vácuo e os íons formados na fase gasosa são acelerados por campos eletrostáticos em direção ao analisador de massas, que na maioria das vezes é do tipo TOF (DASS 2007; HOFFMANN, 2007).

Figura 7. Os analitos são misturados a uma matriz, que na maioria das vezes é constituída por um ácido orgânico, o qual, quando seco, cristaliza-se junto com a amostra. Na sequência, um laser é incidido nesse complexo matriz/analito, promovendo a transferência do complexo para a fase gasosa. Após inúmeras colisões íons-molécula que ocorrem durante esse processo há a formação de moléculas carregadas positivamente, as quais são aceleradas para um analisador de massas (modificado DASS, 2007).

2.5.1.2 Ionização por spray de elétrons (Electrospray ionization - ESI)

A ESI é uma das principais técnicas de ionização em pressão atmosférica (*API-atmospheric pressure ionization*) e também uma das mais importantes na determinação estrutural de diversas moléculas biológicas. Os primeiros relatos envolvendo *eletrospray* são de 1917, descritos por Zeleny (ZALENY, 1917), porém foi somente no fim dos anos 80 que Fenn e colaboradores utilizaram uma descarga elétrica na ionização de biomoléculas, sendo por isso, laureados com o Nobel de Química, em 2002 (SOUZA, 2008).

Na ESI, todo o processo de ionização ocorre à pressão e temperatura atmosféricas. Uma solução volátil levemente ácida contendo a amostra é bombeada a uma vazão de alguns microlitros por minuto através de um tubo capilar metálico, no qual é aplicada uma voltagem (3 a 4 kV). Nesse momento, inicia a formação do

cone de Taylor na ponta do capilar. Esse procedimento gera um *spray* contendo gotículas (<10 µm de diâmetro) de molécula e solvente altamente carregadas. As gotículas são evaporadas tendo seu diâmetro rapidamente reduzido, fazendo com que as cargas ali presentes fiquem mais próximas e conseqüentemente ocorra uma maior repulsão entre elas. Quando essa repulsão for maior que a tensão do solvente, as gotículas explodem formando microgotas ainda menores, processo esse denominado fissão Coulômbica, pois ocorre por forças de repulsão Coulômbicas (eletrostáticas). A partir deste ponto, têm sido propostos dois mecanismos para explicar a dessorção dos íons a partir das microgotas: o modelo do resíduo carregado (*CRM – charged-residue model*) e o modelo da dessorção de íons (*IDM – ion-desorption model*) (DASS 2007; HOFFMANN, 2007).

O modelo CRM propõe que a sequência evaporação de solvente e fissão Coulômbica é repetida várias vezes até que o tamanho da gota seja tão reduzido que conterá somente o analito. Por fim, com a evaporação do solvente, a molécula é dispersa no ambiente gasoso, retendo a carga da gota (figura 8a). Já o modelo IDM considera que, com a evaporação, as gotículas de solvente chegam em um determinado raio (~20 nm) em que a densidade elétrica na sua superfície é grande o suficiente para expulsar os analitos diretamente para fora da gotícula. Neste momento ocorreria a transferência de carga entre o solvente e o analito (Figura 8b) (DASS 2007; HOFFMANN, 2007). Existe ainda muita discussão quanto ao mecanismo exato de transferência de cargas entre o solvente e o analito, mas acredita-se que ambos os mecanismos ocorram de acordo com o tipo de analito. Assim, o modelo CRM aconteceria quando o analito é composto por moléculas hidrofílicas, enquanto que o IDM se aplicaria melhor para moléculas hidrofóbicas. Os íons são subsequentemente submetidos a alto vácuo e acelerados através de um campo elétrico para o analisador de massas do espectrômetro.

Convém ressaltar que compostos como sais e detergentes interferem diretamente na análise por ESI, uma vez que causam supressão dos íons formados ou uma determinação ambígua das massas quando combinados com o analito. Por isso, aconselha-se a combinação com técnicas de separação e purificação, como, por exemplo, a cromatografia líquida para obtenção de melhores resultados (ANDRADE, 2006).

Figura 8. Representação esquemática da ionização por *electrospray*. Em **a**, está descrita a teoria do modelo do resíduo carregado; em **b**, a descrição do modelo da dessorção de íons (modificado DASS, 2007).

2.5.2 Analisadores de massas

Como visto anteriormente, a fonte de ionização é a parte do espectrômetro de massas que produz os íons a partir dos analitos. A base da espectrometria de massas é a separação destes íons por suas diferenças de m/z . Para atender a esta necessidade, foram desenvolvidas diferentes formas para controlar a trajetória desses íons através espectrômetro, que são realizadas por campos elétricos e magnéticos, chamados de analisadores de massas. Abaixo, será feita uma breve apresentação dos principais analisadores utilizados para separação dos íons na análise proteômica.

2.5.2.1 Time-of-Flight (TOF)

Os analisadores do tipo *Time-of-Flight* (TOF) são os mais empregados em associação com MALDI e, por princípio, são os analisadores de massa mais simples. Consistem essencialmente em um tubo de vôo mantido sob vácuo onde, após dessorvidos da matriz, os íons são acelerados em um campo altamente elétrico ($\cong 20$ kV) com energias cinéticas iguais e voam ao longo do tubo com velocidades diferentes, que são inversamente proporcionais às suas massas (figura 9). Assim, os

íons de massas menores chegam ao detector mais rápido que aqueles de massas maiores (CANAS et al., 2006; DASS, 2007). Outra característica importante é que, para o funcionamento do TOF, é imprescindível que todos os íons formados na fonte entrem no analisador ao mesmo tempo, pois só assim será possível determinar o tempo que cada íon levou para percorrer toda a extensão do analisador.

Para aumentar a resolução dos analisadores do tipo TOF, dois avanços tecnológicos foram implementados: a extração atrasada de íons (*delay extraction*) e o modo de operação com refletor (*reflectron*). O primeiro é específico para situações nas quais a ionização por MALDI é empregada e consiste única e exclusivamente em introduzir um tempo de atraso entre o momento da ionização e a aplicação do potencial de extração. No segundo, uma série de eletrodos espaçados é introduzida no final do tubo de voo linear, aumentando o tamanho do tubo de voo, e consequentemente o caminho a ser percorrido pelos íons será maior (DASS, 2007).

Figura 9. Representação esquemática de ionização por dessorção a laser assistida por matriz utilizando um analisador de massas do tipo time-of-flight (modificado DASS, 2007).

2.5.2.2 Analisador Quadrupolar (Quadrupole Analyser).

Um analisador de massas quadrupolar ideal é composto por um conjunto de quatro barras metálicas paralelas (eletrodos) mantidas a potenciais elétricos, sendo de mesmo sinal o potencial das barras opostas e contrário o das barras adjacentes. Tais barras estabilizam ou desestabilizam os íons seletivamente, de acordo com seus valores de m/z , durante sua passagem pelo centro do quadrupolo (Figura 10) (DASS, 2007; HOFFMANN; STROOBANT, 2007).

O campo elétrico oscilante é gerado nos eletrodos pela aplicação de potenciais de corrente-direta (DC – *direct-current*) e rádio-frequência (RF). Através de variações sistemáticas nos valores de DC e RF, a trajetória dos íons é estabilizada ou desestabilizada, sendo que o quadrupolo funciona como um filtro. Isso permite que os íons de diferentes valores de m/z cheguem com tempos diferentes ao detector, e desta forma pode ser diferenciados. Este mesmo princípio pode ser utilizado para estabilizar a trajetória de apenas um íon desejado, que pode ser posteriormente fragmentado, como será visto posteriormente (CANAS; LOPEZ-FERRER; RAMOS-FERNANDEZ et al., 2006; DASS, 2007; HOFFMANN; STROOBANT, 2007).

Figura 10. Representação esquemática de analisador de massa do tipo quadrupolar (modificado DASS, 2007).

2.5.2.3 Armadilhas de íons (Ion Trap - IT)

Os analisadores do tipo IT operam por princípios físicos semelhantes aos do quadrupolares. Porém, ao invés de os íons realizarem a trajetória através do ambiente quadrupolar, eles são aprisionados dentro deles durante todo o tempo necessário para executar as operações habituais em MS, daí o nome “armadilha de íons”.

A figura 11a apresenta o esquema básico de um IT tridimensional. Os íons transferidos para o analisador são aprisionados por meio da ação de três eletrodos hiperbólicos (um eletrodo tipo *ring* e dois do tipo *endcap*), que permitem a criação de um campo elétrico quadrupolar tridimensional que, por sua vez, mantém os íons em uma órbita estável no seu interior (DASS, 2007). Já a figura 11b representa o IT linear que, diferentemente do 3D-IT, apresenta quatro barras hiperbólicas as quais fazem com que os íons sejam aprisionados numa posição axial ao longo das barras.

Somado a isto, os IT são tipicamente preenchidos com gás hélio à pressão de 10^{-3} Torr e as colisões com as moléculas de hélio “amortecem” a energia cinética dos íons, ajudando a centralizar a trajetória dos mesmos (CANAS, 2006; DASS 2007). Em seguida, os íons são ejetados para fora do analisador pela aplicação de uma rampa crescente de rádio-frequência (RF), que consequentemente desestabiliza os íons, ejetando-os em direção ao detector de forma crescente, de acordo com seus valores de m/z (CANAS; LOPEZ-FERRER; RAMOS-FERNANDEZ et al., 2006; DASS, 2007; HOFFMANN; STROOBANT, 2007).

Figura 11. Representações esquemáticas de analisadores do tipo Ion-trap. Em **a**, um *Ion-trap* 3D e em **b**, um *Ion-trap* Linear (modificado DASS, 2007).

2.5.3 DETECTORES

Os detectores representam a porção final dos espectrômetros de massas. Estes funcionam por meio da conversão dos feixes de íons em sinais elétricos, que podem ser amplificados, armazenados e traduzidos em dados que sejam rapidamente interpretados pelos olhos humanos ou ainda em uma série de pulsos que possam ser monitorados e contados. Os principais detectores são o Copo de Faraday e os Multiplicadores de Elétrons.

2.5.3.1 Copo de Faraday (Faraday cup)

O copo de Faraday opera no princípio de que uma mudança da carga em uma placa de metal resulta em um fluxo de elétrons, e, conseqüentemente, é gerada uma corrente elétrica. Um íon que atinja a superfície da placa induz a ejeção de vários elétrons. Esta emissão temporária de elétrons induz uma corrente no copo e cria uma pequena amplificação da corrente gerada pela colisão do íon no copo. As principais vantagens dos detectores deste tipo são o baixo custo, a simplicidade mecânica e elétrica e a resposta independente da energia, da massa e da natureza química dos íons (PORTO, 2006; DASS, 2007).

2.5.3.2 Multiplicadores de Elétrons

Um multiplicador de elétrons é um dos meios mais simples e mais utilizados atualmente para se detectar íons. Neste tipo de detector, utiliza-se uma série de placas coletoras de íons em série, mantidos em potencial crescente. Os íons atingem a superfície da primeira placa, resultando na transmissão de elétrons. Estes, por sua vez, são atraídos pela segunda placa, onde são gerados novos elétrons, resultando em uma cascata de elétrons (figura 12). O ganho típico da amplificação da corrente gerada pela cascata de elétrons é da ordem de 1.000.000 de vezes. As principais vantagens dos multiplicadores de elétrons são a extrema

sensibilidade, que permite a detecção de até um único íon, o tempo de resposta curto (da ordem de nanossegundos) e o baixo nível de ruído (DASS, 2007).

Figura 12. Representação esquemática de um detector tipo multiplicador de elétrons (Dass, 2007).

2.6 PROTEÔMICA APLICADA À TOXICOLOGIA

A alta sensibilidade da tecnologia proteômica tem sido evidente na detecção de alterações na expressão proteica com quantidades menores e mais precocemente quando comparada com métodos convencionais, como a histologia e a análise química.

Cutler e colaboradores (CUTLER et al., 1999) realizaram um estudo para avaliar a toxicidade glomerular em ratos provocada pelo *Puromycin aminonucleoside* (PAN). O PAN produz mudanças em ratos semelhantes às que ocorrem em humanos, e tem sido amplamente usado na investigação do mecanismo que contribui para proteinúria em doenças glomerulares humanas. Os ratos receberam uma dose única de PAN e as proteínas urinárias foram analisadas durante o período de nefrotoxicidade. A eletroforese 2D da urina permitiu um melhor entendimento da natureza e progressão da proteinúria associada com toxicidade glomerular. A proteinúria foi detectada precocemente, com 32 h, quando comparada com outros métodos como a ressonância magnética nuclear, na qual alterações do perfil foram observadas após 120 a 240 h apenas.

A utilização da proteômica para avaliar a toxicidade do fluoreto é algo extremamente recente na literatura, tendo sido publicado até agora apenas quatro manuscritos. O primeiro trabalho publicado foi realizado por Thongboonkerd e

colaboradores (THONGBOONKERD et al., 2002), onde foi avaliado se o fluoreto produziria alterações no padrão de expressão protéica de *Streptococcus pyogenes*. Para isso, as bactérias foram expostas a 5 mM de fluoreto de sódio. A análise proteômica revelou que o fluoreto afetou proteínas relacionadas aos mecanismos de defesa, virulência e imunogenicidade do *S. pyogenes*.

A fim de investigar quais proteínas renais teriam seu perfil alterado após tratamento com fluoreto, Xu e colaboradores (XU et al., 2005), trataram ratos *wistar* por 8 semanas com água de beber contendo 100 ppm de fluoreto. A 2DE revelou que um total de 148 *spots* apresentaram diferença no padrão de expressão entre os grupos tratado e controle. A MS revelou a existência de proteínas envolvidas com a proliferação celular, o metabolismo e estresse oxidativo. Com o intuito de investigar os processos moleculares envolvidos na fluorose esquelética, esse mesmo grupo avaliou as possíveis alterações causadas pelo fluoreto em osteoblastos *in vitro*. Para isso, células da calvária foram expostas a 2 ppm de fluoreto de sódio por 72 h. As proteínas dos osteoblastos foram extraídas e submetidas a 2-DE e identificação por MS. A análise revelou que, dos 493 *spots* presentes, 28 mostraram-se diferencialmente expressos. Dos 28 *spots*, 12 foram identificados. As proteínas identificadas foram associadas à proliferação e metabolismo celular, e no dobramento oxidativo de proteínas (XU; JING; LI, 2008)

Mais recentemente, Kobayashi e colaboradores (KOBAYASHI; LEITE; SILVA et al., 2009) avaliaram a expressão diferencial de proteínas renais de ratos submetidos a tratamento crônico com fluoreto. Porém, neste caso os animais ingeriram água contendo 5 ou 50 ppm de fluoreto, que são doses equivalentes a 1 e 5 ppm, respectivamente, para humanos. A análise proteômica demonstrou alteração em 30 *spots* no grupo de 50 ppm quando comparado ao controle, e 17 *spots* no grupo de 5 ppm também quando comparado ao controle. As proteínas identificadas por espectrometria de massa foram divididas em três categorias funcionais: proteínas relacionadas à detoxificação; proteínas relacionadas ao metabolismo e proteínas envolvidas com *housekeeping*.

Entretanto, nenhum trabalho até o momento avaliou a expressão protéica diferencial em animais expostos à intoxicação aguda pelo fluoreto. Este conhecimento é de grande valia para o melhor entendimento dos processos envolvidos na intoxicação, bem como para a busca por biomarcadores para esta

intoxicação, além de poder contribuir para a identificação de possíveis alvos terapêuticos.

3 PROPOSTAÇÃO

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo principal desse trabalho foi comparar, em modelo de roedores, o perfil de expressão de proteínas presentes em tecidos renais saudáveis e afetados por intoxicação aguda com fluoreto, utilizando, como ferramentas analíticas 2DE e LC-ESI-MS/MS.

Como complementação, foi ainda avaliada a concentração de fluoreto no sangue e nos rins dos animais.

4 ΜΑΣΕΡΙΑ Ε ΜΕΘΟΔΟΣ

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO, TRATAMENTO DOS ANIMAIS E COLETA DE AMOSTRAS

Este estudo foi devidamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas com Animais da FOB-USP, Processo 14/2005 (Anexo I).

Os animais foram obtidos do Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, onde permaneceram em caixas plásticas em grupos de 3 durante todo o período experimental. Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*, Wistar) machos que receberam, desde o desmame, água deionizada e ração AIN-93 até completarem 75 dias de vida.

A ração fornecida aos animais foi a AIN-93, com baixo teor de fluoreto (menor que 3 µg/g). Isto foi necessário, pois em estudos prévios realizados em nosso laboratório, as rações comerciais têm demonstrado ter teores de F superiores a 20 µg/g (BUZALAF et al., 2004b; BUZALAF et al., 2005).

Ao completarem 75 dias, os animais foram então submetidos à ingestão de uma solução contendo 18 g F/L (na forma de NaF), via gavagem gástrica, a fim de se obterem as seguintes doses de fluoreto: grupo controle, grupo T1 (50 mgF/Kg) e grupo T2 (100 mgF/Kg). As tabelas 2, 3 e 4 trazem o peso corporal e o volume de solução ingerido pelos mesmos. Para o cálculo do volume a ser ingerido pelo animal foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\frac{\text{Peso (Kg)} \times [\text{F}]}{18}$$

Onde:
 Peso (Kg) = peso animal
 [F] = concentração de F desejada (50 ou 100 mgF/Kg)

Decorridas 2 h após a ingestão, os animais foram eutanasiados, a cavidade peritoneal e depois a torácica foram expostas, o coração foi puncionado com agulha, e o sangue colhido utilizando tubos para coleta de sangue a vácuo (Becton Dickinson, Plymouth, Devon, England) e imediatamente submetido a centrifugação a 3500 rpm por 10 minutos (FANEM modelo Excelsa II 206 BL, São Paulo, SP, Brasil)

para obtenção do plasma. Foram coletados em média 5 mL de sangue para obtenção de 2 mL de plasma. Em seguida, os rins foram coletados, a cápsula removida e os rins destinados à análise de fluoreto foram armazenados a -20°C, enquanto que aqueles destinados à análise proteômica após remoção da cápsula, foram lavados em tampão fosfato gelado, contendo inibidores de protease, e imediatamente armazenado em nitrogênio líquido.

Tabela 2- Peso corporal (g) dos animais do grupo controle e o volume de água deionizada ingerido

Animal	Peso (g)	Volume de água ingerido (mL)
1	255	2,0
2	236	2,0
3	248	2,0
4	229	2,0
5	244	2,0
6	240	2,0

Tabela 3- Peso corporal (g) dos animais do grupo 50 mgF/Kg e o volume de solução fluoretada (18 g F/L) ingerido

Animal	Peso (g)	Volume de solução ingerido (mL)
1	264	0,74
2	278	0,77
3	224	0,62
4	255	0,71
5	281	0,78
6	286	0,79

Tabela 4- Peso corporal (g) dos animais do Grupo 100 mgF/Kg e o volume de solução fluoretada (18 g F/L) ingerido

Animal	Peso (g)	Volume de solução
		ingerido (mL)
1	290	1,61
2	227	1,26
3	264	1,47
4	235	1,30
5	270	1,50
6	252	1,40

4.2 DOSAGENS DE FLUORETO

4.2.1 PLASMA

Para análise do fluoreto no plasma, foram utilizados 200 μ L do mesmo, que foi submetido a uma pré-difusão, pois, por se tratar de um fluido biológico, o plasma contém CO_2 , que deve ser eliminado. Para tanto, a amostra de plasma foi colocada na placa de petri Falcon (Becton Dickinson, Lincoln Park, NJ) e sobre ela foi colocado ácido sulfúrico saturado (HMDS) num volume que correspondia a 15% do volume da amostra de plasma. Este ácido sulfúrico (chamado de ácido aquecido) foi previamente aquecido até que o seu volume fosse reduzido pela metade, a fim de eliminar qualquer fluoreto residual que pudesse contaminar a amostra. Após a adição do ácido aquecido, as placas foram deixadas abertas por 15 minutos para a saída do CO_2 , o volume das mesmas então foi completado para 2 mL com água deionizada e a difusão seguiu normalmente como descrita por Taves (TAVES, 1968) modificado por Whitford (WHITFORD, 1996).

Para a difusão, 50 μ L de NaOH 0,05 M foram distribuídos em 3 gotas na tampa destas placas. As placas foram então fechadas, seladas com vaselina, e por um orifício feito previamente na tampa foi colocado hexametil-disiloxano (Aldrich, 2,0

mL em ácido sulfúrico 3 M). Este orifício foi imediatamente selado com vaselina e parafilme. As placas foram colocadas numa mesa agitadora orbital plana (Nova Técnica, modelo NT 145, Piracicaba, SP, Brasil) em velocidade 2-3, durante a noite. No dia seguinte as tampas foram removidas, invertidas e as gotas de NaOH combinadas numa única gota. O NaOH foi tamponado pela adição de 25 μ L de ácido acético 0,2 M, e o volume total foi ajustado para 75 μ L com água deionizada, usando uma pipeta automática (10-100 μ L). A gota, contendo todo o fluoreto, foi analisada com eletrodo Orion 9409 (Orion Research, Cambridge, MA, EUA) e um microeletrodo de referência calomelano Accumet (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, EUA), ambos acoplados ao potenciômetro Orion modelo EA 940 (Orion Research, Cambridge, MA, EUA), sendo estes mantidos unidos através de bandas de borracha durante a leitura, e colocados em contato com a gota na parte interna da tampa da placa, conforme mostrado na figura 13.

Figura 13. Sequência da dosagem de fluoreto nas amostras de plasma e rim.

4.2.2 RINS

Após pesagem do rim, o mesmo foi homogeneizado em água ultrapura na proporção de 250 mg de tecido para 2,5 mL de água, utilizando o Homogenizador tipo Potter MA 102 (Marconi, Piracicaba, SP, Brasil). A homogeneização foi conduzida por 2 minutos como mostrado na figura 14. Para análise de fluoreto no rim, foi utilizado um volume da amostra correspondente a 500 mg de tecido renal. Esses volumes foram pipetados em uma placa de petri Falcon (Becton Dickinson, Lincoln Park, NJ) e foram submetidos à difusão facilitada por HMDS como descrito para o plasma, porém sem a pré-difusão.

Figura 14. Homogeneização do tecido renal para determinação da concentração de fluoreto.

4.3 ANÁLISE PROTEÔMICA

4.3.1 PREPARO DA AMOSTRA

Para a obtenção de géis de boa qualidade, o preparo da amostra deve resultar na completa solubilização, desagregação, desnaturação e redução das proteínas presentes na amostra. Para isso, as amostras foram pesadas e transferidas individualmente para um cadinho contendo nitrogênio líquido (N_2) e moídas com auxílio de um pistilo (figura 15). A baixa temperatura proporcionada pelo N_2 previne a degradação de componentes da amostra e, ao final do processo, amostras pulverizadas e com aspecto homogêneo são obtidas.

Figura 15 - Homogeneização do tecido renal em N₂ para posterior extração das proteínas.

Após homogeneização do tecido, adicionou-se um tampão de extração contendo uréia 7 M, tiouréia 2 M, CHAPS 4 %, DTT 1 %, anfólitos carregadores 0,5 % pH 3-10 e um coquetel de inibidores de proteases. Após 1 hora de incubação em gelo, misturando ocasionalmente, o homogenato foi centrifugado a 15.000 x rpm por 30 min a 4°C (Sorvall RC2-B, Sorvall Instruments, Newtown, CN, USA) e o sobrenadante coletado (GE-HEALTHCARE, 2004) modificado.

Com o intuito de remover o excesso de sais e outros contaminantes que pudessem resultar em géis de baixa qualidade, utilizou-se o kit *PlusOne 2D Clean-up* (GE Healthcare, Uppsala, Suécia), que contém agentes precipitantes e coprecipitantes que auxiliam na remoção desses contaminantes, resultando em géis mais limpos. Foram utilizados 200 µL de amostra com o protocolo recomendado pelo fabricante.

Depois de realizadas a precipitação e limpeza das amostras, o *pellet* obtido foi ressuspenso em 200 µL de solução de re-hidratação contendo uréia 7 M, tiouréia 2 M, CHAPS 2%, anfólito carreador pH 3-10 0,5% e 0,002 % de azul de bromofenol, e no momento do uso, foram adicionados 7 mg de DTT para cada 2,5 mL de tampão de re-hidratação (GE-HEALTHCARE, 2004).

As proteínas foram quantificadas utilizando-se o kit *Quick Start™ Bradford Protein Assay* (Bio-rad, Hercules, CA, EUA) baseado no método de Bradford (BRADFORD, 1976), em triplicata. Para cada reação utilizaram-se 2,5 µL de amostra e 1,0 mL do reagente de coloração e após incubação por 10 minutos em temperatura ambiente, as absorbâncias foram determinadas a 595 nm em espectrofotômetro. As concentrações protéicas foram calculadas através da

comparação com uma curva padrão contendo concentrações conhecidas de proteína de soro bovino (BSA). Seguidamente à quantificação, cerca de 1000 µg de proteínas de cada um dos seis animais de cada grupo foram combinadas para formar um *pool* por grupo, totalizando 3 amostras (uma de cada grupo experimental) a serem carregadas na eletroforese bidimensional. Tal procedimento foi realizado para minimizar a variabilidade individual (TILTON et al., 2007). Novamente foi feita a quantificação de proteínas, como descrito anteriormente. As concentrações de proteína em µg/µL encontradas para cada amostra de tecido renal estão demonstradas na terceira coluna da tabela 5 e os volumes de amostra aplicados nos géis, na quarta coluna.

Tabela 5- Dosagem de proteínas do homogenato renal, e volume de amostra utilizado para obtenção do *pool*

Grupos	A ^{595 nm}	[proteína] µg/µL	Vol. (µL) equivalente a 1000 µg
Controle	0,768	20,16	49,60
T1	0,836	22,44	44,57
T2	0,893	24,33	41,10

Controle – animais que receberam água deionizada

T1 – animais que receberam 50 mg F/Kg peso

T2 – animais que receberam 100 mg F/Kg peso

4.3.2 ELETROFORESE BI-DIMENSIONAL

4.3.2.1 Focalização Isoelétrica (Primeira Dimensão)

As proteínas foram primeiramente separadas de acordo com seu ponto isoelétrico (pI), através de focalização isoelétrica (IEF), utilizando o sistema *Ettan IPGphor 3* (GE Healthcare, Uppsala, Suécia), figura 16. A caracterização das proteínas presentes na amostra foi realizada com tiras IPG de 24 cm e gradiente de

pH 3-10. As fitas IPG foram re-hidratadas durante 15 h a 20°C em 450 µL de solução de re-hidratação contendo aproximadamente 1000 µg de proteínas. Sobre as fitas IPG acrescentaram-se 3 mL de óleo mineral (*cover Fluid*, GE Healthcare, Uppsala, Suécia) para evitar evaporação dos reagentes durante o processo de re-hidratação. A focalização isoeletrica foi realizada nas seguintes condições: 500 V por 1 h, 1.000 V por 1 h e, por fim, 10.000 V até atingir 40.000 V.

Figura 16. Sistema de focalização isoeletrica Ettan IPGphor 3 e *Ettan IPGphor Cup Loading Manifold* (GE Healthcare, Uppsala, Suécia) carregado com as amostras.

4.3.2.2 Eletroforese SDS-PAGE (Segunda Dimensão)

Após a focalização, as tiras foram removidas do *manifold*, lavadas com água deionizada e equilibradas em uma solução tampão de equilíbrio contendo 1 % (p/v) DTT por 30 minutos, e em seguida, para alquilação, no mesmo tampão contendo 2,5 % (p/v) de iodoacetamida (IAA) por 30 minutos.

A eletroforese de segunda dimensão foi realizada em gel vertical homogêneo de 12,5% de acrilamida (255 mm X 200 mm X 1,5 mm). Depois de equilibradas, as tiras foram inseridas sobre o gel de acrilamida e fixadas com uma solução pré-aquecida de 0,5% (p/v) de agarose solubilizada em tampão de corrida Laemmli (LAEMMLI, 1970). A separação eletroforética das proteínas foi conduzida no sistema *Ettan DALTsix* (GE Healthcare, Uppsala, Suécia) a 20 °C (figura 17). No primeiro estágio utilizou-se uma corrente fixa de 80 V, 15 mA/gel e 100 W por 1 h, para migração das proteínas da tira IPG para o gel. Já no segundo estágio, a corrida

foi conduzida com corrente constante de 500 V, 60 mA/gel e 100 W a 20°C, até que o azul de bromofenol atingisse o fundo do gel (aproximadamente 5 h).

Figura 17- Segunda dimensão em géis SDS-PAGE 12,5% (200 mm X 255 mm X 1,5 mm), no sistema *Ettan DALTsix* (GE Healthcare, Uppsala, Suécia).

4.3.3 VISUALIZAÇÃO E ANÁLISE DE IMAGENS DA ELETROFORESE BI-DIMENSIONAL

As proteínas separadas por 2DE foram visualizadas através da coloração por *Coomassie Brilliant Blue G-250* (USB, Cleveland, OH, EUA), realizada de acordo com o protocolo de Candiano e colaboradores (CANDIANO; BRUSCHI; MUSANTE et al., 2004). Para isso, ao fim da corrida, o gel foi colocado em solução fixadora contendo ácido fosfórico 1,3 % e metanol 20 % durante 1 h, para prevenir a mobilidade das proteínas no gel e lavar os anfólitos. Então, os mesmos foram lavados com água deionizada e deixados por 24 h em solução de coloração contendo 10 % de ácido fosfórico, 10 % de sulfato de amônio, 0,12 % de *Coomassie Brilliant Blue G-250* e 20 % de metanol. Por fim, os géis foram lavados com água deionizada e armazenados em solução de ácido acético 7%. Os géis corados foram digitalizados com resolução de 300 dpi com auxílio do programa *LabScan 6.0* (GE Healthcare, Uppsala, Suécia) no *ImageScanner™ III* (GE Healthcare, Uppsala, Suécia). Para a análise das imagens, foi adotado o programa *ImageMaster 2D Platinum 7.0* (GE Healthcare, Uppsala, Suécia).

A detecção dos *spots* e a determinação do seu volume foram realizadas de modo automático adotando-se os seguintes parâmetros: *smooth* = 4, área mínima =

5 e saliência = 110. Dentro de cada grupo, o gel com o maior número de *spots* foi escolhido como gel de referência e em seguida foi efetuado o *match gels*, uma comparação entre os *spots* das réplicas de cada grupo. Após esse passo, foram realizadas correções com a adição e remoção manual dos *spots*. Com as correções devidamente efetuadas, procedeu-se à análise das classes, que forneceu a diferença estatística entre os grupos experimentais.

Pelo programa também foram estimados os pontos isoelétricos e as massas moleculares de cada *spot*. Para determinar diferenças na expressão protéica, foram consideradas as alterações no valor de % de volume. O uso da % de volume implica na normalização do *spot*, pois para calcular a % de volume, considera-se o volume total de todos os *spots* no gel. Assim, minimizam-se as variações decorrentes da quantidade de proteína aplicada e do procedimento de coloração.

4.3.4. PREPARO DAS AMOSTRAS PARA ESPECTROMETRIA DE MASSA

Após análise pelo *software*, os *spots* de interesse foram excisados dos géis e preparados para espectrometria de massas de acordo com Andrade (ANDRADE, 2006). Para isso, duas folhas brancas de EVA foram coladas sobre uma bancada com boa iluminação, e em cima destas, foram posicionadas três placas de vidro. As triplicatas de cada grupo foram então posicionadas sobre cada placa e com o auxílio de ponteiros universais de 1000 μL e 200 μL , das quais as pontas foram retiradas em diferentes alturas para proporcionar diferentes diâmetros, os *spots* foram excisados (figura 18). As peças excisadas foram cortadas em segmentos de aproximadamente 1 mm^3 , transferidas para tubos de 2,0 mL contendo 200 μL de ácido acético 5% e armazenadas a 4 $^{\circ}\text{C}$ até o passo seguinte.

Figura 18- Excisão e recorte dos *spots* selecionados para espectrometria de massa. Os *spots* provenientes dos 3 géis obtidos para cada grupo são inicialmente captados com uma ponteira plástica. Depois, são cortados em fragmentos de cerca 1 mm³ com lâmina de bisturi.

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

Depois de desidratados, os *spots* foram submetidos à redução e alquilação. Para isso, foram inicialmente reidratados com DTT 20 mM em AMBIC 50 mM e incubados por 40 minutos a 56°C. O excesso de líquido foi removido e substituído por IAA 55 mM em AMBIC 50 mM. Após 30 minutos no escuro, em temperatura ambiente, o líquido foi removido, os fragmentos foram lavados em AMBIC 25 mM e em seguida desidratados em ACN 100%. A ACN foi descartada e o resíduo remanescente no gel foi deixado evaporar em temperatura ambiente.

Para a digestão das proteínas, os fragmentos de gel foram reidratados com 15 µL de solução contendo 150 ng de tripsina (*Trypsin Gold Mass Spectrometry*, Promega, Madison, WI, EUA) em AMBIC 25 mM por 15 minutos para que a tripsina pudesse penetrar no gel. Em seguida, adicionaram-se 50 µL de AMBIC 25 mM para total cobertura dos *spots* e incubou-se a 37°C por 14 h. Ao fim de 14 h, a ação da

tripsina foi interrompida pela adição de 15 µL de solução bloqueadora (ACN 50% v/v e ácido fórmico 5% v/v). Os peptídeos foram eluídos da acrilamida com duas lavagens de 15 minutos com solução de eluição A (ACN 50% v/v e ácido fórmico 1% v/v), uma lavagem de 15 minutos com solução de eluição B (metanol 60% v/v e ácido fórmico 1% v/v) e mais duas lavagens com ACN 100%, a 45°C sob sonicação. O aparelho de sonicação usado foi um ULTRA-SOM de banho (Branson, modelo 2510, Danbury, CT, EUA) com 40 KHz de frequência fixa e potência de 30 W. A solução contendo os peptídeos extraídos foi submetida a secagem em um concentrador a vácuo (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) à temperatura ambiente, por 2-3 h e então o tubo foi armazenado a -20 °C até a realização do sequenciamento.

4.3.5 SEQUENCIAMENTO DAS PROTEÍNAS

4.3.5.1 LC/MS/MS

Os peptídeos foram solubilizados em 12 µL de ácido fórmico 0,1% e transferidos para tubos específicos para realização da espectrometria de massas. O sequenciamento das proteínas foi conduzido em plataforma LC-MS/MS em espectrômetro de massas com fonte de ionização por ESI e analisador de massas híbrido Q-TOF Ultima API (Waters, Milford, MA, EUA), acoplado ao sistema nanoAcquity Ultra Performance LC (Waters, Milford, MA, EUA).

4.3.5.2 Análise dos espectros de massas e identificação das Proteínas

Os espectros MS/MS gerados pelo sequenciamento dos peptídeos de cada amostra foram analisados utilizando-se o algoritmo do programa MASCOT MS/MS *Ion Search* v.1.9 (www.matrixscience.com).

De uma maneira geral, os *softwares* de busca correlacionam os espectros de massa de fragmentação de peptídeos com sequências de aminoácidos de proteínas registradas em bancos de dados. Os parâmetros utilizados na busca estão demonstrados na Figura 19.

MASCOT MS/MS Ions Search

Your name Aline de Lima **Email** a.lima@usp.br

Search title Proteínas Grupo A

Database NCBIInr

Taxonomy Rattus

Enzyme Trypsin **Allow up to** 1 missed cleavages

Fixed modifications Biotin (K), Biotin (N-term), Carbamidomethyl (C), Carbamyl (K), Carbamyl (N-term)

Variable modifications Oxidation (HW), Oxidation (M), Phospho (ST), Phospho (Y), Propionamide (C)

Quantitation None

Peptide tol. ± 0.1 Da # ¹³C 0 **MS/MS tol. ±** 0.1 Da

Peptide charge 2+ and 3+ **Monoisotopic** ☒ **Average** ☐

Data file C:\Users\Aline\Desktop\fla 1.jp

Data format Micromass (.PKL) **Precursor** m/z

Instrument ESI-QUAD-TOF **Error tolerant** ☐

Decoy ☐ **Report top** AUTO hits

Figura 19 – Seleção dos parâmetros de busca de íons MS/MS no programa MASCOT

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise dos dados de concentração de flúor no plasma e nos rins, foi utilizado o software *Graph Pad InStat* (Versão 3.0, para Windows, Graphpad Software, San Diego Califórnia USA). Inicialmente foram checadas a normalidade e a homogeneidade dos dados, utilizando-se os testes de *Kolmogorov-Smirnov* e *Bartlett*, respectivamente. Tanto para o plasma quanto para os rins, os dados passaram no teste de normalidade, mas não no teste de homogeneidade. Então, os dados, após transformação logarítmica, foram analisados por análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de *Tukey* para comparações individuais. O nível de significância adotado em todos os casos foi 5%.

Para verificar a diferença estatística entre os *spots* foi realizado o teste de ANOVA através do programa *ImageMaster 2D platinum* versão 7.0. O nível de significância adotado foi de 5%.

5 RESULTS & DISCUSSION

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISE DE FLUORETO

A DL_{50} (dose que uma vez ingerida espera-se que leve ao óbito 50% dos animais) para ratos é em torno de 90-100 mgF/Kg de peso corporal (GRUNINGER et al., 1988; WHITFORD; BIRDSOING-WHITFORD; FINIDORI, 1990). No presente trabalho, duas doses foram utilizadas. A dose de 50 mgF/Kg de peso corporal pode ser considerada uma dose alta, mas não letal, enquanto que a dose de 100 mgF/Kg de peso corporal é uma dose letal. No caso de doses agudas letais, a morte dos animais geralmente acontece depois de 2 h da ingestão de fluoreto (WHITFORD; LECOMPTE, 1983). Uma vez que no presente estudo uma das doses utilizadas era em torno da DL_{50} , optou-se por realizar a eutanásia dos animais depois de 2 h a fim de se evitar morte espontânea e permitir as análises plasmáticas e renais. Esta estratégia foi bem sucedida, uma vez que nenhum animal veio a óbito espontâneo.

A tabela 6 mostra os valores da concentração média de fluoreto encontrada no plasma e nos rins dos animais. Para o plasma, foi observado um efeito dose resposta após a administração de fluoreto. A ANOVA revelou diferenças significativas entre os grupos ($F=309,46$, $p<0,0001$). O teste de *Tukey* encontrou diferenças significativas entre o grupo controle e os experimentais ($p<0,001$), bem como entre os grupos experimentais ($p<0,01$). As concentrações plasmáticas de fluoreto encontradas no presente trabalho foram um pouco mais altas que aquelas observadas em estudo anteriores com protocolo semelhante. No estudo de Buzalaf e colaboradores (BUZALAF et al., 2004c) as concentrações plasmáticas de fluoreto encontradas nos ratos que receberam 45 e 90 mgF/Kg de peso corporal e foram eutanasiados após 2 h foram de $3,857\pm1,864$ e $6,937\pm2,859$ $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Em outro estudo com um protocolo similar, para os animais que receberam 50 mgF/Kg de peso corporal, as concentrações plasmáticas de fluoreto foram de $3,349\pm1,280$ $\mu\text{g/mL}$ ((BUZALAF; CAROSELLI; CARDOSO DE OLIVEIRA et al., 2004b) e em outro onde a dose administrada foi de 100 mgF/Kg peso corporal, os valores encontrados foram $7,149\pm0,360$ $\mu\text{g/mL}$ (LEITE; CAROSELLI; MARIA et al., 2008). Embora os valores encontrados no presente estudo e nos estudos acima

descritos sejam da mesma ordem de grandeza, as razões para estas diferenças encontradas não são aparentes.

Como descrito para o plasma, também foi observada uma dose resposta para o tecido renal, o que era esperado pelo fato de os rins serem responsáveis pela eliminação e reabsorção de íons e eletrólitos (KOOLMAN; RÖHM, 2005). De fato, os rins são grandes responsáveis pela redução dos níveis plasmáticos de flúor após sua ingestão, sendo que, em indivíduos adultos, estima-se que 50% de uma dose de flúor ingerida são eliminados do sangue através da urina, enquanto que os outros 50% são incorporados aos tecidos calcificados (WHITFORD, 1996). À semelhança do padrão observado para os níveis plasmáticos de fluoreto, a ANOVA detectou diferença significativa entre os grupos ($F=175,97$, $p<0,0001$) e o teste de *Tukey* revelou que o grupo controle diferiu significativamente dos grupos experimentais ($p<0,001$) e estes diferiram significativamente um do outro ($p<0,01$). Na literatura não há dados de concentrações de fluoreto nos rins após administração aguda nas doses administradas e no tempo de morte utilizado no presente estudo, de forma que não há como fazer comparações com os valores encontrados no presente estudo.

Tabela 6 - Concentração média ($\pm$ EP) de fluoreto no plasma e rins dos animais, após administração de doses únicas de fluoreto por gavagem gástrica

Dose de F administrada (mg F/Kg peso corporal)	[F] no plasma $\mu\text{g/mL}$	[F] no rim $\mu\text{g/g}$
Controle (H_2O Deionizada)	$0,10\pm0,01^a$	$0,03\pm0,01^a$
T1 - 50 mg F/Kg	$8,19\pm1,67^b$	$0,96\pm0,14^b$
T2 - 100 mg F/Kg	$19,39\pm3,07^c$	$2,32\pm0,19^c$

Médias seguidas por letras distintas nas mesmas colunas indicam diferenças significativas entre os grupos (ANOVA após transformação logarítmica, $p<0,01$).

5.2 ANÁLISE PROTEÔMICA

5.2.1. ANÁLISE DAS IMAGENS

A boa reprodutibilidade dos géis, ou seja, a semelhança do perfil protéico entre as réplicas é essencial para a sua análise comparativa, pois possibilita a visualização dos perfis protéicos diferentes e facilita a sobreposição das imagens feitas no programa de análise dos mesmos. De maneira geral, o protocolo de extração escolhido foi bastante satisfatório e apesar de ser um método longo e laborioso, possibilitou a remoção de uma grande quantidade de interferentes garantindo géis de boa qualidade, o que pode ser observado através da presença de proteínas ácidas, básicas, de alta e de baixa MM. Ainda no intuito de se obterem de boas réplicas, foi feita uma combinação de amostras de seis animais diferentes, como sugerido por Tilton e colaboradores (TILTON; HAIDACHER; LEJEUNE et al., 2007) que possibilitou a obtenção de géis bastante semelhantes entre si. Deste modo, quando se compararam as imagens dos géis obtidas no presente trabalho com aquelas obtidas por Tilton et al. (2007), que também avaliaram o perfil proteico renal, podemos observar a presença de grupos de proteínas com características de MM e pI semelhantes àsquelas obtidas por esses pesquisadores (figura 20).

Figura 20: Perfil proteômico obtido a partir de extrato renal. Em *a*, o resultado obtido por Tilton e colaboradores (2007) e em *b*, o resultado obtido neste estudo.

Com relação à concentração de proteína, foram carregados 1000 µg/gel do *pool* de proteínas. Essa quantidade de proteína foi suficiente para garantir uma boa

visualização, mesmos de *spots* pouco abundantes. Foi obtido um total de 12 géis (figura 21), dos quais foi separada uma triplica de cada condição para análise comparativa no *software*.

Figura 21 - Géis bidimensionais representativos de proteínas renais de ratos dos grupos controle, grupo tratado com 50 mgF/Kg (T1) e tratado com 100 mgF/Kg (T2). As proteínas foram focalizadas em *strips* de 24 cm e faixa de pH 3-10 linear, e em seguida separadas pela massa molecular em gel de poliacrilamida 12,5% e coradas com azul de *Coomassie* coloidal G250.

Após a detecção automática realizada pelo programa *Image Master 2D Platinum 7.0* (GE Healthcare), foi realizada uma edição manual com correção, adição e remoção dos *spots*, que resultou em um total de 675 *spots* detectados para o grupo controle, 690 para o grupo T1 e 566 para o grupo T2. Depois de realizada a detecção, foram efetuadas três comparações (*matches*) sendo uma entre os grupos controle e T1, uma entre controle e T2 e por fim a comparação entre T1 e T2. Foi observada uma boa correlação entre os géis ($R=0,91$), sendo um reflexo positivo de todos os cuidados tomados com o preparo dos mesmos.

5.2.2. ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE OS GRUPOS

Durante a análise diferencial, foi possível verificar que 662 *spots* foram coincidentes entre os grupos controle e T1. A figura 22 apresenta os *spots* de ambos os tratamentos sobrepostos, sendo o grupo controle em azul e o T1 em vermelho. Dentre estes *spots* comuns aos dois grupos, a ANOVA revelou que 192 encontravam-se diferencialmente expressos ($p < 0,05$) (figura 23). A análise qualitativa revelou que 13 *spots* estavam presentes apenas no grupo controle (figura 24) e outros 28 estavam presentes apenas no grupo T1 (figura 25).

Figura 22. Gel representativo contendo os *spots* comuns aos dois grupos sobrepostos. Em azul estão representados os *spots* do grupo controle e em vermelho os *spots* pertencentes ao grupo T1 (50 mgF/Kg)

Figura 23 - Géis bidimensionais obtidos a partir da focalização isoeletrica em tiras de pH 3-10, 24 cm, e corados em azul de *coomassie* coloidal. Os *spots* circundados em verde apresentam diferença de expressão entre os grupos controle (A) e T1 (B).

Figura 24 - Géis bidimensionais obtidos a partir da focalização isoeletrica em tiras de pH 3-10, 24 cm, e corados em azul de *coomassie* coloidal. Os *spots* circundados em verde estavam presentes apenas no controle (A) quando comparado com grupo T1 (B).

Figura 25 - Géis bidimensionais obtidos a partir da focalização isoeletrica em tiras de pH 3-10, 24 cm, e corados em azul de *coomassie* coloidal. Os spots circundados em verde estavam presentes apenas no grupo T1 (A), quando comparado ao controle (B).

Quando se compararam os grupos controle e T2, foi encontrado um total de 552 *spots* comuns aos dois grupos, representados na figura 26, onde os *spots* de ambos os tratamentos estão sobrepostos, sendo o grupo controle representado em azul e o T2, em vermelho. Dos 552 *spots* comuns, a ANOVA revelou que 182 apresentaram-se diferencialmente expressos ($p < 0,05$, figura 27). A análise qualitativa revelou que 123 *spots* estavam presentes apenas no grupo controle (figura 28) enquanto que 14 *spots* estavam presentes apenas no grupo T2 (figura 29).

Figura 26. Gel representativo contendo os *spots* comuns aos dois grupos sobrepostos. Em azul estão representados os *spots* do grupo controle e em vermelho os *spots* pertencentes ao grupo T2 (100 mgF/Kg).

Figura 27 - Géis bidimensionais obtidos a partir da focalização isoeétrica em tiras de pH 3-10, 24 cm, e corados em azul de *coomassie* coloidal. Os *spots* circundados em verde apresentam diferença de expressão entre os grupos controle (A) e T2 (B).

Figura 28 - Géis bidimensionais obtidos a partir da focalização isoeletrica em tiras de pH 3-10, 24 cm, e corados em azul de *coomassie* coloidal. Os spots circundados em verde estavam presentes apenas no grupo controle (A), quando comparado ao T2 (B).

Figura 29 - Géis bidimensionais obtidos a partir da focalização isoeletrica em tiras de pH 3-10, 24 cm, e corados em azul de *coomassie* coloidal. Os *spots* circundados em verde estavam presentes apenas no grupo T2 (A), quando comparado ao controle (B).

Por fim, ao se compararem as imagens dos grupos T1 e T2, 558 *spots* estavam presentes em ambos os grupos (figura 30). Destes, a ANOVA revelou que 245 *spots* mostraram-se com expressão diferencial ($p < 0,05$, figura 31). A análise qualitativa entre esses grupos revelou ainda que 132 *spots* estavam ausentes no grupo T2 (figura 32), dos quais 114 também estavam ausentes no grupo controle. Ao se observarem os dados obtidos a partir da comparação entre os grupos controle e T1, pode-se notar que dos 114 *spots* ausentes no T2, 18 *spots* também estavam ausentes no grupo controle, tratando-se, portanto, de *spots* exclusivos do grupo T1.

Ainda no quesito qualitativo para a comparação entre T1 e T2, foi observado que o grupo T1 apresentava 8 *spots* ausentes em relação a T2 ($p < 0,05$, Figura 33), dos quais 4 também não foram encontrados no grupo controle, quando se comparou este ao grupo T2. Para os 4 restantes, apesar de estarem presentes no grupo controle, a ANOVA não apontou diferenças estatisticamente significativas quando comparados ao grupo T2.

Figura 30. Gel representativo contendo os *spots* comuns aos dois grupos sobrepostos. Em azul estão representados os *spots* do grupo T1 (50 mgF/Kg) e em vermelho os *spots* pertencentes ao grupo T2 (100 mgF/Kg).

Figura 31 - Géis bidimensionais obtidos a partir da focalização isoeétrica em tiras de pH 3-10, 24 cm, e corados em azul de *coomassie* coloidal. Os *spots* circundados em verde apresentam diferença de expressão entre os grupos T1 (A) e T2 (B).

Figura 32 - Géis bidimensionais obtidos a partir da focalização isoeétrica em tiras de pH 3-10, 24 cm, e corados em azul de *coomassie* coloidal. Os *spots* circundados em verde estavam presentes apenas no grupo T1 (A), quando comparado ao T2 (B).

Figura 33 - Géis bidimensionais obtidos a partir da focalização isoeletrica em tiras de pH 3-10, 24 cm, e corados em azul de *coomassie* coloidal. Os *spots* circundados em verde estavam presentes apenas no grupo T1 (A), quando comparado ao T2 (B).

A quantidade de *spots* encontrados, bem como as diferenças entre os grupos, assemelham-se aos resultados obtidos por Xu e colaboradores (2005). Neste trabalho, os autores forneceram água contendo 100 ppm de F durante 8 semanas aos animais, ou seja, os mesmos foram expostos cronicamente ao fluoreto. A análise proteômica do tecido renal revelou 624 *spots* para o grupo controle e 776 *spots* para o grupo tratado. Após as análises, os autores encontraram 429 *spots* comuns aos dois grupos, dos quais 149 apresentaram-se diferencialmente expressos. Ao contrário do observado em nosso trabalho, esses autores não encontraram *spots* ausentes ou exclusivos. Mais recentemente, foi publicado outro estudo envolvendo análise proteômica em rins de ratos após exposição crônica ao fluoreto (5 ou 50 ppm F por 60 dias). Este estudo encontrou cerca de 590 *spots* comuns aos grupos, porém, demonstrou que o fluoreto causou uma mudança de expressão em 30 *spots*. Quando se compararam os grupos controle e 50 ppm, e em 17 *spots* quando se analisaram os grupos controle e 5 ppm (KOBAYASHI et al. 2009). Deste modo, os achados do presente estudo corroboram com os já existentes na literatura, reforçando que o fluoreto pode induzir mudança no padrão de expressão protéica no tecido renal quando administrado em doses elevadas, sejam elas de forma crônica ou aguda.

5.2.3. PROTEÍNAS IDENTIFICADAS

Até o momento, 35 *spots* foram submetidos à espectrometria de massas, sendo que aproximadamente 91,4% desses *spots* apresentaram similaridade com proteínas do banco de dados NCBI e SWISS PROT. Das proteínas identificadas, a grande maioria apresentou similaridade com proteínas da espécie *Rattus norvegicus*, tendo apenas uma apresentado similaridade com proteína da espécie *Mus musculus*. Isto se deve ao fato do grande número de sequências já depositadas nos bancos de dados públicos para aquela espécie.

Desses *spots* submetidos à MS, 53,1% estavam presentes nos três grupos, 12,5% pertenciam apenas aos grupos T1 e T2, 3,1% apenas aos grupos controle e T1, 12,5% pertenciam exclusivamente ao grupo controle, 12,5% eram exclusivos do grupo T1 e 6,3% eram exclusivos ao grupo T2 (figura 34).

Figura 34. Gráfico representando a distribuição entre os grupos dos *spots* de proteínas submetidos à MS.

Após a identificação, pôde-se observar a presença de múltiplos *spots* para a mesma proteína, como é o caso da *Alpha-2μ-globulin* que estava presente em 4 *spots* (26, 28, 35 e 678) localizados em diferentes posições no gel. Essas variações nos pI e MM podem ser reflexo de eventos celulares tais como modificações pós-traducionais, variações alélicas de um mesmo gene (isoformas), mecanismos de *splicing* alternativo e modificações químicas promovidas durante o preparo de amostras (PORUBLEVA et al., 2001; ANDRADE, 2006). A presença de múltiplos *spots* para uma mesma proteína já foi relatada em trabalhos prévios envolvendo extrato renal (TIAN et al., 2008; YU et al., 2008), e é exemplificada na figura 35.

Figura 35. Proteínas do extrato renal, identificadas como múltiplos *spots* (circundados em verde). É possível perceber que há uma variação tanto no PI, quanto na MM da proteína *Alpha-2-μ-globulin*.

Os espectros foram analisados utilizando-se o algoritmo do programa MASCOT. Cada espectro foi analisado individualmente, e o resultado obtido na forma de *score*, indicando a probabilidade daquele *match* não ser um evento aleatório. Assim o resultado é fornecido na forma de um gráfico de barras, no qual existe um valor limite (*score* limite), e quando os *matches* estão acima deste valor, considera-se que a probabilidade deste evento ser randômico é muito baixa (<5%). No presente estudo, o valor considerado limite foi de 32 ($p < 0,05$), como exemplificado na figura 36, que traz o gráfico obtido para o *spot* 700. As sequências das proteínas identificadas estão apresentadas no anexo II.

Figura 36. Gráfico obtido a partir do MASCOT para o *spot* 700. As barras presentes na área sombreada em verde não foram considerados *matches* significativos, uma vez que estão abaixo do valor limite. Porém, dois outros *matches* foram considerados significativos e provavelmente apresentam coincidência com alguma proteína.

As proteínas identificadas foram classificadas em 5 categorias funcionais de acordo com Rison e colaboradores (RISON; HODGMAN; THORNTON, 2000) (figura 37). A categoria “metabolismo e energia” reuniu a maior parte das proteínas (40% ou 12 proteínas).

Já a categoria “processos celulares” reuniu 13% das proteínas (4), cujas funções envolvem principalmente defesa do organismo e regulação intracelular.

Um número expressivo de proteínas foi observado na categoria “transporte” (20% ou 6 proteínas), que agrupa proteínas envolvidas no transporte de macromoléculas, bem como no transporte de pequenas moléculas e íons.

Na categoria “estrutura e organização estrutural”, que reúne proteínas com funções relacionadas ao citoesqueleto e membrana celular, foram identificadas 17% das proteínas (5).

Por fim, os 10% das proteínas restantes (3) pertenciam à categoria “vias de informação”, que abriga proteínas envolvidas nos processos de síntese/degradação de DNA e RNA.

Figura 37. Distribuição funcional das proteínas identificadas a partir de extrato renal. Foi adotado o esquema de classificação de Rison (2000).

5.2.3.1. Proteínas Relacionadas ao metabolismo

Como mencionado anteriormente, essa categoria abrangeu a maior parte das proteínas, corroborando com os achados obtidos por Xu e colaboradores (2005) e Kobayashi et al. (2009), onde a maioria das proteínas identificadas em tecido renal após exposição crônica ao fluoreto, também pertenciam a esta categoria. Enquadram-se nesta categoria proteínas relacionadas ao metabolismo de aminoácidos, carboidratos, compostos secundários, lipídeos e ácidos graxos, nitrogênio, pequenas moléculas e síntese de energia (RISON; HODGMAN; THORNTON, 2000).

Dentre as proteínas identificadas, incluiu-se a *Adenosylhomocysteinase* (*AdoHcyase*) (EC 3.3.1.1), uma enzima altamente conservada em procariotos e eucariotos, ubiquamente distribuída nos tecidos animais, que está relacionada ao metabolismo de aminoácidos e à regulação dos processos de transmetilação. Em ratos, as mais altas taxas de atividade desta enzima foram encontradas em fígado, seguido pelo pâncreas, rins, glândula adrenal e cérebro (FINKELSTEIN; HARRIS, 1973; ELORANTA, 1977). Nos rins, apresenta-se uniformemente distribuída, sugerindo que as atividades de metilação estejam presentes por todo o tecido

(KLOOR et al., 2000). Essa enzima catalisa a hidrólise reversível da S-Adenosilomocisteína (AdoHcy) em homocisteína (Hcy) e adenosina (Ado). A AdoHcy é resultante de todas as reações de transmetilação da S-adenosilmetionina (AdoMet) (figura 38) (PALMER; ABELES, 1979; TURNER et al., 2000). A acumulação de AdoHcy no organismo afeta as metiltransferases AdoMet-dependentes pela redução da produção de homocisteína, que pode ser novamente metilada dando origem à metionina, a qual, por sua vez, é convertida em AdoMet às expensas de ATP. A inibição das reações de transmetilação afeta a eficiência da expressão gênica em diversos níveis, incluindo a metilação de regiões promotoras, capeamento do RNAm e consequentemente sua estabilidade, exportação para o citoplasma e início da tradução (PERNA et al., 2001; KLOOR; OSSWALD, 2004). Tem sido demonstrado que em condições patológicas como hipóxia e injúrias teciduais, a quantidade de AdoHcy aumenta significativamente, levando a uma diminuição do potencial de metilação dentro da célula (KLOOR et al., 2002; HERMES et al., 2004). Assim a AdoHcyase é uma enzima essencial no metabolismo de aminoácidos bem como na regulação dos processos de transmetilação e síntese protéica. No presente trabalho, a AdoHcyase apresentou-se ausente nos grupos tratados, o que é coincidente com a redução no número total de *spots* protéicos presentes nos grupos tratados quando comparados ao controle.

Figura 38. Via metabólica da *Adenosylhomocysteinase*, S-adenosilmetionina e homocisteína

Também foi identificada a enzima *UDP-glucose 6-dehydrogenase* (EC 1.1.1.22), que catalisa a reação NAD^+ dependente que converte a UDP-glicose em

UDP-glicuronato, o qual, por sua vez, é um precursor dos resíduos glicuronato de polissacarídeos ácidos como os glicosaminoglicanos (hialuronato e condroitin sulfato). Além disso, o UDP-glicuronato também está envolvido na detoxicação e na excreção de compostos orgânicos estranhos ao organismo. O UDP-glicuronato é doador de glicuronosil empregado por uma família de enzimas detoxificantes (como a UDP-glicuronosil transferase) que agem sobre várias drogas não polares, toxinas ambientais e carcinogênicos, convertendo-as em derivados polares mais facilmente removidos da circulação para a urina através dos rins (LIND et al., 1999; NELSON; COX, 2002). Baseado neste contexto seria de se supor que tal enzima estivesse com expressão aumentada nos grupos submetidos à intoxicação pelo fluoreto, porém a mesma estava ausente nos dois grupos experimentais. Nos trabalhos de Xu e colaboradores (2005) e Kobayashi e colaboradores (2009) também não foi relatada alteração na expressão da mesma.

Outra enzima identificada no presente estudo foi a *Alcohol dehydrogenase* [NADP+] (ADH), também conhecida como aldeído redutase (EC 1.1.1.2). Esta enzima catalisa a redução NADPH-dependente de uma variedade de aldeídos aromáticos e alifáticos aos álcoois correspondentes. Também catalisa a redução do mevaldato ao ácido mevalônico, do gliceraldeído ao glicerol e a reação de redução NADPH-dependente do *3-deoxyglucosone* (3-DG), agindo, portanto, sobre diferentes substratos. Esta enzima foi bastante estudada por sua importância no processo de diabetes, onde podem ocorrer modificações de proteínas pelo excesso de glicose. Os resíduos metabólicos provenientes do metabolismo da glicose e frutose podem se unir a proteínas, modificando-as ou levando à formação de ligações cruzadas entre as cadeias moleculares de proteínas poliméricas, originando os produtos finais de glicosilação avançada (AGEs) (MONNIER; CERAMI, 1981; TAKAHASHI et al., 1995; KUSUNOKI et al., 2003). A glicosilação e a formação de ligações cruzadas entre as cadeias moleculares das proteínas reduzem sua flexibilidade, sua elasticidade e a sua funcionalidade. Além disso, as modificações químicas resultantes da glicosilação e das ligações cruzadas, podem disparar reações inflamatórias e auto-imunes. O 3-DG é um potente agente glicosilador e formador de ligações cruzadas, produzido através da degradação dos produtos de Amadori provenientes da reação da Maillard (KATO; SHIN; HAYASE, 1987; TAKAHASHI; LU; MYINT et al., 1995). Tem, portanto, propriedades altamente tóxicas para as células e

está associado a complicações severas do diabetes, incluindo nefropatia, retinopatia e neuropatias (RAHBAR et al., 1999). Daí a importância da ADH, uma vez que esta enzima catalisa a redução do 3-DG, promovendo assim a desintoxicação do organismo (TAKAHASHI, 1995). No estudo de Kobayashi e colaboradores (2009) foi observada uma diminuição na expressão da ADH em rins de ratos submetidos cronicamente a 50 ppm de fluoreto através da água de beber quando comparados ao controle. No presente estudo, entretanto, foi observada ausência de ADH no grupo controle a aumento de sua expressão nos grupos tratados, de maneira dose-dependente. No caso de uma exposição aguda ao fluoreto, o aumento na expressão da ADH poderia estar relacionado a uma tentativa de desintoxicação do organismo. Mais recentemente, alguns autores têm sugerido que a ADH presente no córtex renal atua no metabolismo do inositol. Nesta via, a enzima inositol oxigenase catalisa a formação do D-glicuronato a partir do mioinositol. O D-glicuronato formado será convertido em gluconato pela ADH (ARNER et al., 2001; BARSKI et al., 2005). O gluconato gerado pode ser oxidado a 3-ceto-L-gulonato, o qual, por sua vez, será descarboxilado a L-xilulose. A L-Xilulose é convertida em D-xilulose podendo ser então utilizada na via das pentoses (BARSKI; PAPUSHA; IVANOVA et al., 2005; WAMELINK, 2008). Como mencionado acima, o D-glicuronato pode ainda ser utilizado por enzimas detoxicantes (NELSON; COX, 2002), facilitando a remoção de compostos não polares do organismo. Uma vez que a *UDP-glucose 6-dehydrogenase* estava ausente nos grupos experimentais, o aumento da expressão de ADH nestes grupos pode ser uma tentativa de compensação do organismo a fim de permitir a transformação de compostos tóxicos não polares em compostos hidrossolúveis, que poderão ser eliminados através da urina.

A *Aldehyde dehydrogenase mitochondrial* (ALDH2) (EC 1.2.1.3), é uma enzima mitocondrial que catalisa de maneira irreversível a oxidação de um aldeído na presença de NAD⁺ e água a um ácido e NADH e foi identificada através da MS para os *spots* 688 e 624. Os aldeídos são produtos intermediários de muitas reações (metabolismo de aminoácidos, aminas biogênicas, carboidratos, vitaminas esteróides e lipídeos), tendo como principal fonte a oxidação dos alcoóis pela ADH ($\text{Álcool} + \text{NAD}^+ \rightleftharpoons \text{aldeído ou cetona} + \text{NADH} + \text{H}^+$), sendo os mesmos eliminados através da ALDH2 (LINDAHL, 1992). Em adição, os aldeídos são os mais importantes produtos finais da peroxidação lipídica, uma vez que eles são altamente eletrofílicos e reagem com biomoléculas, como proteínas e ácidos nucleicos

(CONKLIN; PROUGH; BHATANAGAR, 2007). A mitocôndria é uma grande fonte de espécies reativas de oxigênio (EROs) e um alvo para peroxidação lipídica. Assim, a ALDH2 tem sido implicada nos processos antioxidantes celulares porque sua deficiência aumenta o estresse oxidativo (OHSAWA et al., 2003; OHTA et al., 2004), o que poderia contribuir para os danos oxidativos causados pelo fluoreto já amplamente descritos (GUAN; WANG; XIAO et al., 1998; SHIVASHANKARA et al., 2002; CHOUHAN; FLORA, 2008). Nos rins, a ALDH2 está presente em quantidades significativas (DIPPLE; CRABB, 1993). Como os aldeídos podem ser oriundos de diversas reações, as células dos túbulos proximais necessitam de grande poder de oxidação destes compostos, uma vez que os mesmos são potencialmente tóxicos. Deste modo, a presença de ALDH2 nos tecidos renais torna-se indispensável. No presente trabalho, esta enzima teve sua atividade reduzida no grupo T2 quando comparado aos grupos T1 e controle. Aqui cabe destacar que a dose de 100 mg fluoreto por Kg de peso corporal é uma dose letal e a maioria das mortes dos animais geralmente ocorre depois de 2 horas da exposição (WHITFORD, 1996). Por este motivo os animais foram eutanasiados 2 horas após a administração de fluoreto, para evitar a morte espontânea. Então, é de esperar que a baixa expressão desta enzima esteja relacionada com o esgotamento do organismo frente aos efeitos tóxicos do fluoreto administrado em dose letal e isto levaria a um acúmulo de produtos tóxicos na célula, como os aldeídos, contribuindo para a falência do organismo.

A carnitina (*3-hydroxy-4-N-trimethylaminobutyric acid*) é um aminoácido ramificado não essencial, envolvido no metabolismo dos ácidos graxos (AG), uma vez que possui a capacidade de transportar longas cadeias de AG do citosol para a matriz mitocondrial, onde ocorrerá a β -oxidação. Em adição, a carnitina regula a razão Coenzima A(CoA)/acil-CoA na mitocôndria e esta modulação reduz o acúmulo dos grupamentos tóxicos acil-CoA e mantém a produção de energia. A carnitina pode ser obtida a partir da dieta ou ser sintetizada no organismo a partir da lisina e metionina, sendo os rins e o fígado os principais órgãos responsáveis pela sua síntese (FLANAGAN et al., 2010), na qual a *trimethyllysine* é inicialmente hidroxilada pela *trimethyllysine hydroxylase*. Depois disto, o β -hydroxytrimethyllysine resultante é clivado por uma aldolase específica em 4-trimethylaminobutyraldehyde e glicina. O 4-trimethylaminobutyraldehyde é subsequentemente oxidado pela enzima 4-

trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase (TMABA-DH) (Vlies, 2006) (EC 1.2.1.47) para formar *4-butyrobetaine* (HULSE; HENDERSON, 1980). No último passo, *4-butyrobetaine* é hidroxilado por uma segunda hidroxilase (*4-butyrobetaine hydroxylase*), produzindo a L-carnitina (ENGLARD, 1979; REBOUCHE; ENGEL, 1980; BREMER, 1983). No presente trabalho, a biossíntese de carnitina provavelmente foi comprometida no grupo T2, uma vez que a TMABA-DH apresentou sua expressão significativamente reduzida neste grupo quando comparado aos grupos controle e T1, os quais não diferiram entre si. Vários trabalhos têm relatado que em casos de falha renal aguda causada por diferentes medicamentos há uma redução nos níveis renais de carnitina pelo aumento da sua excreção urinária e que a suplementação com este aminoácido poderia reduzir a severidade do quadro por aumentar a razão CoA-SH/acetil-CoA e a produção de ATP (AL-SHABANAH et al., 2010; FLANAGAN; SIMMONS; VEHIGE et al., 2010).

O NAD (nicotinamida adenina dinucleotídeo) é um cofator essencial tanto para o metabolismo energético quanto para a transdução de sinal. O seu papel no equilíbrio redox no metabolismo tem sido bastante descrito em processos como reparo de DNA e vias de sinalização dependentes do cálcio (LIN; GUARENTE, 2003). Sua síntese se dá por duas grandes vias: a partir do triptofano (síntese *de novo*) ou por reciclagem de produtos de degradação do NAD (via de salvamento) (MAGNI et al., 1999), como nicotinamida, quinolinato e nicotinato. Esses três precursores podem ser transferidos para a fosforibosilpirofosfato pelas respectivas fosforibosil transferases (KUCHARCZYK et al., 1998; SHIN et al., 2005) resultando em mononucleotídeos que por fim serão convertidos a dinucleotídeos, culminando, em todos os casos, com a produção de NAD. No presente trabalho, observou-se a ausência da enzima *Nicotinate phosphoribosyltransferase* (NAPRT1) (EC 2.4.2.11), que catalisa a reação do nicotinato em fosforibosilpirofosfato, nos grupos controle e T2 (100 mgF/kg), enquanto que a enzima estava presente no grupo T1. É possível que nos grupos controle e T2 a enzima estava presente, mas não foi detectada pela sensibilidade da técnica. De qualquer forma, os níveis detectáveis em T1 podem estar relacionados a uma tentativa do organismo em tornar o metabolismo energético e as vias de sinalização celular mais eficientes, a fim de contornar a toxicidade causada pela dose subletal de fluoreto (50 mg/Kg peso corporal). O mesmo perfil de expressão foi obtido para a *4-aminobutyrate aminotransferase mitochondrial* (GABA-T) (EC 2.6.1.19), que é um homodímero localizado na matriz

mitocondrial o qual catalisa, entre outras reações, a conversão do *4-aminobutyrate* em *succinate semialdehyde*, tendo como cofator o pirididoxal fosfato (BRAUNSTEIN, 1960). O *succinate semialdehyde* pode posteriormente ser convertido em *succinate* (intermediário do ciclo de Krebs) pela ação das *succinate semialdehyde dehydrogenases* NAD^+ ou NADP^+ -dependentes. O aumento de expressão da (GABA-T) no grupo T1 pode ser um mecanismo de aceleração da produção energética celular, a fim de combater a toxicidade do fluoreto. Isto é consistente com a redução na expressão da *ATP synthase mitochondrial* neste grupo em relação ao controle e T2. Outra enzima relacionada com produção energética cuja expressão foi detectada como alterada no presente estudo foi a *Pyruvate dehydrogenase complex component E2* (PDC-E2) (EC 2.3.1.12). O complexo da piruvato desidrogenase, que contém múltiplas cópias de 3 componentes enzimáticos (*pyruvate dehydrogenase-E1*, *dihydrolipoamide acetyltransferase-E2* e *lipoamide dehydrogenase-E3*) catalisa a conversão do piruvato em acetil-CoA e CO_2 , regulando, desta maneira, o fluxo metabólico (NELSON; COX, 2002). No presente estudo, foi observada uma redução significativa e dose-dependente da atividade da PDC-E2 nos casos de tratamento com fluoreto, o que pode contribuir para a redução da produção energética celular através da diminuição da formação de acetil-CoA.

A *ATP synthase mitochondrial* (EC 3.6.3.14) é uma ATPase composta por dois domínios estruturais do tipo F (F_0F_1). A porção F_0 é um complexo integral de membrana localizado na membrana interna mitocondrial, envolvido na translocação dos prótons provenientes da cadeia respiratória. Já a porção F_1 é um complexo extramembranar voltado para a matriz mitocondrial, formado por nove subunidades de 5 tipos diferentes, com composição $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ (WALKER et al., 1985; COLLINSON et al., 1994; NELSON; COX, 2002). As subunidades α e β são estruturalmente similares, dispostas de modo a formar uma estrutura similar aos gomos de uma laranja. Cada subunidade apresenta 3 domínios: um N-terminal pequeno, um domínio de ligação a nucleotídeo e um domínio C-terminal helicoidal. Porém, apenas a subunidade β apresenta mudanças conformacionais, designadas β -vazia, β -ADP e β -ATP, sendo essas mudanças cruciais para a síntese de ATP, uma vez que as unidades α e β giram, catalisando, assim a formação do ATP. O mecanismo proposto é que uma subunidade β começa na conformação β -ADP, que tem afinidade pelo ADP e P_i presente no meio, que quando se ligam, mudam a

conformação para β -ATP, o qual, por sua vez, liga firmemente e estabiliza o ATP, promovendo assim o equilíbrio do ADP+Pi com o ATP na superfície da enzima. Por fim, a subunidade muda para a conformação β -vazia, que possui uma baixa afinidade ao ATP o qual então deixa a superfície da enzima. O giro das subunidades é impulsionado pelo fluxo de prótons que passam através de F_0 (NELSON; COX, 2002; LEYVA; BIANCHET; AMZEL, 2003). No presente trabalho, foram identificadas, nos *spots* 683, 308 e 43, as subunidades α e β (F_1) e O (F_0), respectivamente. Foi observada uma subexpressão significativa dessas subunidades nos grupos T1 e T2 comparados ao controle. Deste modo, a exposição aguda a altas doses de fluoreto levaria a uma redução na síntese de ATP levaria a uma redução na síntese de ATP, acarretando em prejuízos energéticos ao organismo, e consequentemente afetando todas as funções celulares ATP-dependentes. Também vale a pena notar que a expressão de *ATP synthase mitochondrial* em T2 foi significativamente maior que aquela observada para T1 e isto poderia ajudar a explicar por que não houve detecção da *GABA-T* em T2.

A *Glyoxylate reductase/ hidroxypyruvate reductase* (GRHPR) (Ec 1.1.1.81) é uma enzima que catalisa reações de redução do glioxilato a glicolato e do hidroxipiruvato a D-glicerato, bem como a oxidação do D-glicerato em hidroxipiruvato, na presença de NADP. O glioxilato, quando metabolizado pela lactato desidrogenase produz o oxalato, que em altas concentrações leva à formação de cálculos renais ou ainda à falência renal (MDLULI et al., 2005; BOOTH et al., 2006). O fluoreto é capaz de acelerar a precipitação de sais de fosfato de cálcio, sendo esta a base para sua utilização na prevenção da cárie dentária (BUZALAF; CARDOSO, 2008). Tem sido relatado ainda que ratos que receberam dieta ricas em fluoreto (23 mg/Kg) por 10 semanas tiveram maior incidência de cristalúria e pedras na bexiga, compostas principalmente por oxalato de cálcio (ANASUYA, 1982). Neste estudo, a *Grhpr* estava ausente no grupo controle e presente nos tratados com fluoreto. O fato de estar ausente no grupo controle pode ser consequência da presença de baixas concentrações no nível basal, que não puderam ser detectadas pela sensibilidade da técnica. Sua presença nos grupos tratados com fluoreto sugere uma tentativa de evitar a formação do adicional de oxalato, uma vez que há uma tendência para formação do mesmo na presença de altas doses de fluoreto.

Os esfingolípídeos são importantes componentes da porção externa das membranas de células eucarióticas. Os gangliosídeos são glicoesfingolípídeos contendo um ou mais resíduos de ácido siálico, que são degradados por uma ação sequencial de hexoglicosidases lisossomais (LI et al., 1973). Tem sido demonstrado que a conversão do Gangliosídeo GM2 em GM3 pela hexosaminidase A (Hex A) necessita da presença de 3 produtos gênicos: dois são as subunidades α e β da Hex A e o terceiro é um cofator de baixo peso molecular não enzimático, chamado *GM2 activator protein* (GM2AP) (LI; MANSSON; VANIER et al., 1973; HECHTMAN, 1977; CONZELMANN; SANDHOFF, 1979; MUNDEL et al., 1999). O GM3 é o gangliosídeo mais abundante em membrana de células musculares e está envolvido em processos como migração, proliferação e apoptose. Também é bastante abundante nos rins, onde os resíduos de ácido siálico são de grande importância, uma vez que suas propriedades físico-químicas estão envolvidas na manutenção da barreira de filtração dos glomérulos (MOHOS; SKOZA, 1969). Mais recentemente, foi demonstrado que a diminuição dos níveis de gangliosídios GM3 nos rins resulta em uma hipertrofia glomerular e proteinúria (KWAK et al., 2003). No presente trabalho a GM2 protein activator apresentou-se subexpressa nos grupos tratados de maneira dose-dependente. Baseado no exposto, pode-se supor que a redução da GM2AP possa levar a uma redução dos níveis renais de GM3, o que consequentemente danos glomerulares e proteinúria, que têm sido relatados em casos de intoxicação aguda pelo fluoreto (TAKAGI; SHIRAKI, 1982; USUDA et al., 1998; USUDA et al., 1999; DOTE et al., 2000).

A enzima *Plasma glutamate carboxypeptidase* (PGCP), também conhecida como *liver annexin-like protein 1* (LAL-1) (EC 3.4.17.-) foi inicialmente identificada em plasma humano, clonada e caracterizada em 1999 (GINGRAS et al., 1999). Posteriormente, foi clonado um novo gene que se apresentava superexpresso na regeneração do fígado com um domínio N-terminal *annexin-like* e outro domínio aminopeptidase, que recebeu o nome de gene *liver-annexin-like-1 (lal-1)*. Sua sequência de aminoácidos deduzida apresentou uma homologia significativa com a PGCP (DELLA FAZIA et al., 2002). A PGCP não é uniformemente expressa em tecidos humanos. É abundante em placenta, rins e plasma, mas tem baixos níveis de expressão no músculo, fígado e fibroblastos da pele e não é detectada em leucócitos (GINGRAS; RICHARD; EL-ALFY et al., 1999). Trata-se, entretanto, de

uma proteína ainda pouco estudada, provavelmente relacionada com a hidrólise de peptídeos circulantes (GINGRAS; RICHARD; EL-ALFY et al., 1999) ou revascularização na regeneração tecidual (DELLA FAZIA; PIOBBICO; BARTOLI et al., 2002). No presente estudo, foi observada uma diminuição significativa na expressão da enzima no grupo T2 quando comparado aos grupos controle e T1, que não tiveram diferença significativa na expressão entre si. Devido à escassez de informações na literatura acerca do papel fisiológico desta enzima, é difícil antecipar qual seria o seu papel no tecido renal durante a intoxicação aguda por fluoreto.

De uma maneira geral, os resultados sugerem que o metabolismo é significativamente alterado quando da exposição a doses agudas de fluoreto. Proteínas e enzimas envolvidas em diversas vias de produção energética são afetadas, observando-se em alguns casos a ativação de vias compensatórias. Em síntese, as alterações observadas sugerem um déficit de produção de energia no metabolismo celular, que ocorre de maneira dose-dependente. Adicionalmente, algumas vias envolvidas em detoxicação também são alteradas pela exposição ao fluoreto.

5.2.3.2 Proteínas Relacionadas a Vias de Informação

A MS revelou ainda a existência de 3 proteínas pertencentes à categoria “vias de informação”. Esta classe de proteínas abriga aquelas envolvidas nos processos de síntese/degradação de DNA e RNA.

A *Ribonuclease UK114*, também chamada de *perchloric acid-soluble protein* (PSP) (EC 3.1.-.-) é uma endoribonuclease responsável pela inibição da tradução, por clivar o RNAm, podendo estar localizada no citoplasma, núcleo ou membrana. É, portanto, um potente inibidor da síntese protéica, por clivar ligações fosfodiéster apenas em RNA de fita simples. Já foi descrita em fígado e rim (ASAGI et al., 1998; MORISHITA et al., 1999). Na presença de fluoreto, foi observado um aumento significativo, dose-dependente, na expressão desta enzima, o que, em conjunto com os achados relativos à subexpressão de *AdoHcyase* nos grupos tratados, deve contribuir para a redução no número total de *spots* protéicos presentes nos grupos tratados quando comparados ao controle e também para a redução na expressão de várias outras proteínas.

Também foi identificada o *Elongation factor 1-alpha 1* (EF-1- α -1), uma proteína de alongação que promove a ligação GTP-dependente de um aminoacil-tRNA ao ribossomo (HERSHEY, 1991). A sequência de aminoácidos das proteínas da família à qual a proteína EF-1- α -1 pertence é altamente conservada entre as diferentes espécies, sendo a metade N-terminal a porção mais conservada, uma vez que se trata da região de ligação do GTP (DEVER; GLYNIAS; MERRICK, 1987; WOOLLEY; CLARK, 1989). O processo de alongação inicia-se com a ligação do aminoacil-tRNA ao complexo GTP-EF-1- α -1, gerando um complexo aminoacil-tRNA-EF-1- α -1-GTP que se ligará ao sítio A (aminoacil) do ribossomo. Essa ligação é acompanhada pela hidrólise do GTP em GDP + Pi, liberando assim o complexo EF-1- α -1-GDP. Além de participar da tradução, o EF-1- α -1 forma complexos com outros componentes celulares como tubulina e actina (BEKTAS et al., 1994; CONDEELIS, 1995) e atuar em processos celulares, incluindo a embriogênese, senescência, transformação oncogênica, proliferação e organização do citoesqueleto celular (GANGWANI et al., 1998). Foi relatada a superexpressão de RNAm do EF-1- α -1 em células com potencial metastático, quando comparadas a células não metastáticas. Foi proposto que uma fraca associação do EF-1- α -1 com a actina poderia estar relacionada com o potencial metastático, uma vez que altearia a organização da actina citoesquelética e a tradução do RNAm (EDMONDS et al., 1996). Recentemente, foi demonstrado o seu envolvimento em eventos apoptóticos induzidos por estresse oxidativo. Tal envolvimento foi demonstrado em linhagem de cardiomiócitos, onde os níveis de EF-1- α -1 aumentaram sobremaneira após o tratamento com peróxido de hidrogênio, sugerindo que a superexpressão da EF-1- α -1 desempenha um importante papel na execução da morte programada em resposta ao estresse oxidativo (DUTTAROY et al., 1998; CHEN et al., 2000). Os dados obtidos no presente estudo para essa proteína revelaram o aumento de sua expressão apenas no grupo T2, quando comparado com o controle. O mesmo perfil não foi observado para o grupo T1, que não diferiu significativamente do controle, embora tenha tido expressão não significativamente diferente do T2. Como já mencionado anteriormente, o fluoreto pode promover o aumento do estresse oxidativo em humanos e animais experimentais (GUAN; WANG; XIAO et al., 1998; SHIVASHANKARA; SHIVARAJASHANKARA; BHAT et al., 2002; CHOUHAN; FLORA, 2008). Deste modo, como a quantidade de fluoreto ingerida pelo T2 é

considerada uma dose letal, os níveis de estresse oxidativo presentes no grupo T2 devem ter levado ao aumento da expressão da EF-1- α -1, o que poderia acarretar no aumento de eventos apoptóticos no tecido renal.

A *Abhydrolase domain-containing protein 14B* (ABHD14B) (EC 3.-.-.-) pertence à família das ABDH14, dentro da superfamília das hidrolases AB. De acordo com a base de dados *Uniprot*, por similaridade de sequência, teria atividade de hidrolase *in vitro* sobre o p-nitrofenilbutirato e poderia ativar a transcrição. Entretanto, não foram encontrados trabalhos experimentais relacionados a esta proteína. A mesma mostrou um aumento de expressão dose-dependente com o tratamento agudo por fluoreto, mas devido à ausência de informações na literatura acerca do seu papel fisiológico e substratos biológicos não é possível propor o seu papel na intoxicação aguda por fluoreto.

Os resultados sugerem, portanto, que a intoxicação aguda por altas doses de fluoreto é capaz de interferir nos processos de transcrição e tradução gênica.

5.2.3.3 Proteínas relacionadas com “Processo celulares”

Dentro desta categoria podem-se incluir as proteínas relacionadas à divisão e regulação celular, bem como aquelas relacionadas aos mecanismos de defesa contra os mais diversos estresses.

Uma proteína relacionada com detoxicação foi também identificada na categoria de proteínas envolvidas em processos celulares. A *aflatoxin B1 aldehyde reductase member 3* (AFBR1-AR) (EC 1.-.-.-). A proteção do fígado contra os efeitos tóxicos e carcinogênicos da *aflatoxin B1* pode ser ativada pela indução da enzima *aflatoxin B1 aldehyde reductase* (AFB1-AR). Essa enzima de desintoxicação pertence à superfamília das aldo-ceto-redutases (ELLIS et al., 1993) e foi identificada por Witzmann e colaboradores (WITZMANN et al., 1998) como um potencial biomarcador para estudos de toxicidade renal. Entretanto, o AFB1 (*aflatoxin B1*) não é o único substrato dessa enzima. Recentes análises genômicas, isolamento do DNAC e caracterização de enzimas recombinantes sugeriram que, em humanos, seis membros da superfamília das aldo-ceto-redutases, incluindo dois tipos de AFBR1-AR estão envolvidos no metabolismo redutor de compostos xenobióticos carbonila. O acúmulo de dados sobre as enzimas humanas permite

novas visões sobre os seus papéis nas reações celulares e moleculares, incluindo o metabolismo de xenobióticos (MATSUNAGA; SHINTANI; HARA, 2006). O substrato endógeno para a AFB1-AR humana não é conhecido, e a AFB1-AR de ratos tem baixa afinidade pelo seu substrato endógeno, o semialdeído succínico (ELLIS; JUDAH; NEAL et al., 1993). Xu et al. (2005) observaram que a administração de 100 ppm fluoreto em ratos aumentou a expressão da enzima *rhodanese* no tecido renal. Essa enzima converte o cianato inorgânico para uma forma menos tóxica, o ânion tiocianato. Este, por sua vez está relacionado com a indução da expressão da enzima AFB1-AR no fígado e em vários tecidos extra-hepáticos (WROBEL et al., 2004). Uma super expressão da AFB1-AR foi relatada recentemente na urina dos ratos tratados com 50 ppm por 42 dias, quando comparados com o controle (KOBAYASHI; LEITE; SILVA et al., 2009; KOBAYASHI et al., In press). No presente trabalho, a AFB1-AR não foi detectada no grupo controle e apresentou um aumento dose-dependente com a exposição ao fluoreto.

Foi encontrada uma superexpressão da enzima *Peroxiredoxin-2 (PRDX2)* (EC 1.11.1.15) apenas no grupo T2, quando comparado ao controle e T1. A PRX2 é uma proteína localizada no citoplasma, pertencente ao grupo das proteínas detentoras de *thiol*. Suas principais funções estão relacionadas à proteção celular contra o estresse oxidativo, modulação da sinalização intracelular e regulação da proliferação celular. Catalisa a redução de H_2O_2 e hidroxiperoxídeos em água e álcool respectivamente (ZHAO et al., 2009).

Outra enzima identificada que também está envolvida no estresse oxidativo foi a *Superoxide dismutase-Cu-Zn (SOD1)* (EC 1.15.1.1). A SOD1 está localizada no citoplasma e apresenta cobre e zinco em seu sítio catalítico. Sua função é catalisar a dismutação do radical superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio (NOZIK-GRAYCK; SULIMAN; PIANTADOSI, 2005). Foi demonstrado que essa enzima tem sua abundância drasticamente reduzida em rim de ratos acometidos pelo processo patológico de falha renal crônica, o que culmina com o acúmulo de ROS (VAZIRI et al., 2003). No presente trabalho, a expressão desta enzima não foi detectada nos géis do grupo T2, quando este foi comparado ao controle e ao T1, ao passo que a expressão da mesma em T1 não diferiu quando comparado ao controle.

Glutathione S-transferase alpha-4 (GST-K) (EC 2.5.1.18) pertence a uma superfamília de glutatona cuja principal função é a biotransformação dos

compostos eletrofílicos, gerados intracelularmente ou encontradas na forma de xenobióticos (ALIN et al., 1989). As GSTs geralmente se encontram no meio biológico como homo ou heterodímeros, apresentando dois sítios ativos por dímero cujas atividades são independentes uma da outra. Cada sítio ativo consiste no mínimo de duas regiões de ligação, um para a glutathione (GSH) que é muito específica para este tripeptídeo, e outro sítio de ligação com menor especificidade para os eletrófilos (DANIELSON; MANNERVIK, 1985). As GSTs são, portanto, enzimas fundamentais no processo de detoxificação de xenobióticos e radicais livres. Foi encontrada uma subexpressão significativa desta proteína nos grupos T1 e T2 quando comparados ao controle, embora tenha havido um aumento de sua expressão em T2 quando comparado a T1.

Várias enzimas envolvidas no equilíbrio oxidante/antioxidante do organismo têm sua expressão alterada pela exposição a altas doses de fluoreto, como a SOD1, GST-K e PRDX2 e a ALDH2, mencionada no tópico anterior. É interessante notar que algumas destas enzimas têm sua expressão reduzida, ou mesmo se encontram ausentes na presença da alta dose de fluoreto, enquanto que outras têm sua expressão aumentada. Esses resultados ajudam a entender melhor o processo de geração de estresse oxidativo induzido pelo fluoreto, já amplamente descrito na literatura (GUAN; WANG; XIAO et al., 1998; ANURADHA; KANNO; HIRANO, 2001; CHOUHAN; FLORA, 2008). Entretanto, são inovadores, uma vez que a maioria dos trabalhos descritos na literatura se preocupou em avaliar a inibição de enzimas anti-oxidantes pelo fluoreto, e não alteração na sua expressão. Em adição, estes achados permitem que se faça um inter-relação entre diferentes vias no organismo, uma vez que, como mencionado anteriormente, o estresse oxidativo induz o aumento da expressão de fatores de alongação do RNAm, como o EF-1- α -1. Aliás, esta possibilidade de permitir o estudo do panorama completo de expressão protéica em organismos é uma das grandes vantagens da proteômica.

5.2.3.4 Proteínas pertencentes à categoria “Transporte de moléculas”

Esta classe está representada por proteínas que participam do transporte de moléculas. Dentro desta categoria foi identificada a *Selenium-binding protein 1* (SBP1) uma proteína de 56 KDa que se expressa em vários tipos celulares,

incluindo o coração, fígado, rim, pulmão e intestino. Tem sido sugerido que sua função é mediar o transporte intracelular de selênio (PORAT; SAGIV; ELAZAR, 2000). Nos mamíferos, o selênio é um nutriente essencial, que é incorporado no seleno-aminoácidos (Se-Cys), sendo necessário à tradução de várias proteínas envolvidas na defesa celular e regulação hormonal (BEHNE; KYRIAKOPOULOS, 2001), podendo também se ligar a proteínas como a SBP1. Em adição, também tem sido atribuído à SBP1 um papel no transporte de proteínas no complexo de Golgi (PORAT; SAGIV; ELAZAR, 2000). Tem sido ainda sugerido que sua expressão, bem como a de sua homóloga (SBP2) é induzida, juntamente com outras enzimas que metabolizam drogas, por hidrocarbonetos aromáticos (ISHII et al., 1996), o que é consistente com o papel desta enzima na defesa intracelular contra drogas tóxicas e metais pesados e ainda atuar contra um sensor da presença de xenobióticos reativos no citoplasma (COHEN et al., 1997). No presente estudo, a SBP1 não foi detectada no grupo controle, mas sim nos grupos T1 e T2, sugerindo que sua expressão tenha sido induzida pelo excesso de fluoreto.

No presente trabalho, houve um aumento significativo na quantidade de albumina sérica no grupo T2 quando comparado aos grupos controle e T1. Isto deve ter sido devido ao extravasamento de albumina para o tecido renal devido à alta dose de fluoreto. Apesar de os níveis plasmáticos médios de fluoreto no grupo T2 terem sido em torno de 19 ppm, tem sido relatado, em cultura de células, que a adição de cerca de 170 ppm de fluoreto provoca disfunção da barreira endotelial, o que levaria ao extravasamento de proteínas plasmáticas (WANG et al., 2001).

A *fatty acid-binding protein, heart* (H-FABP) é uma proteína citoplasmática de baixa massa molecular relativa, envolvida no transporte de ácidos graxos de cadeia longa da membrana plasmática para os sítios de β -oxidação (PELSERS; HERMENS; GLATZ, 2005), que tem sido detectada em tecidos com metabolismo ativo de ácidos graxos, como fígado, intestino, coração e rins (KIMURA et al., 1991). Os rins são órgãos ativamente envolvidos no metabolismo de ácidos graxos, pois têm uma baixa capacidade glicolítica, e dependem da oxidação dos ácidos graxos para obtenção de energia (WEIDEMANN; KREBS, 1969). Em adição, as FABP também têm um papel na redução do estresse oxidativo, na ligação a produtos de oxidação de ácidos graxos e na limitação dos efeitos tóxicos de intermediários oxidativos nas membranas (WANG et al., 2005). Suas propriedades antioxidantes

despertaram interesse na utilização destas proteínas como potenciais marcadores tecido-específicos de injúria. Assim, recentemente têm sido utilizadas biomarcadores para detecção de injúria renal crônica (KAMIJO et al., 2004; KAMIJO et al., 2006) (NAKAMURA; SUGAYA; KOIDE, 2007) e aguda (NAKAMURA et al., 2006; YAMAMOTO et al., 2007; PORTILLA et al., 2008), bem como preditores do prognóstico em casos de doença renal aguda, sendo que níveis aumentados desta proteína na urina são indicadores de prognóstico desfavorável (FERGUSON et al., 2010). No presente estudo, a H-FABP apresentou-se significativamente subexpressa em T1 quando comparado com controle, indicando um prejuízo na obtenção de energia e combate ao estresse oxidativo. Adicionalmente, sua diminuição a nível renal poderia ser devida a um aumento de sua excreção urinária (que não foi avaliada no presente estudo), o que é um indicativo de injúria renal aguda. Entretanto, não houve redução na sua expressão em T2.

Duas proteínas da família das globinas e envolvidas no transporte do oxigênio também tiveram sua expressão alterada na presença do fluoreto: *O beta-2 globin* (MGC72973) e *Hemoglobin subunit alpha-1/2* (HBA1). Ambas tiveram um perfil consistente de expressão frente aos tratamentos com fluoreto, ou seja, tiveram expressão significativamente reduzida na presença dos mesmos em relação ao controle, mas não foi observado efeito dose-resposta.

A *major urinary protein*, também conhecida como *alpha-2u-globulin* (α_2 - μ G) é uma proteína secretória de 18.7 kDa sintetizada pelo fígado, mas os níveis séricos são muito baixos, pelo fato de ser rapidamente removida da circulação pelos rins (HAARS; PITOT, 1979), através de um mecanismo de interação de seus grupos catiônicos com sítios aniônicos nas membranas de borda rugosa (NEUHAUS, 1986). Pode ser clivada, originando a *15.5 kDa fatty acid-binding protein*. α_2 -Globulin, Portanto, sua presença no rim se deve à incorporação endocítica nos túbulos proximais. A α - μ G passa prontamente pela membrana basal dos glomérulos, sendo encontrada somente na urina de ratos machos maduros, estando ausente na urina de ratas fêmeas. A síntese de a α_2 - μ G é regulada por um complexo hormonal, composto pela tiroxina, testosterona, glicocorticóides e somatotropina (KURTZ et al., 1976; ROY et al., 1976; ROY; DOWBENKO, 1977). Foi sugerido que uma das funções da α_2 - μ G seria proteger a espermatogênese do dano induzido pelo estrógeno (ROY; BYRD; BISWAS et al., 1976). Animais castrados tiveram seus

níveis de α_2 - μ G reduzidos no soro e no fígado. A administração de dihidrotestosterona para animais machos castrados resultou no aumento dos níveis da α_2 - μ G no soro e fígado, acompanhado por um aumento paralelo no nível de RNAm da α_2 - μ G (KURTZ; SIPPEL; ANSAH-YIADOM et al., 1976). Estudos têm demonstrado que a exposição ao fluoreto nas doses disponíveis na água de beber em áreas endêmicas de fluoreto (10–20 ppm), leva à inibição da gametogênese testicular e esteroidogênese, em associação com estresse oxidativo no testículo, próstata e epidídimo (GHOSH et al., 2002; SARKAR; MAITI; GHOSH, 2006). Os níveis plasmáticos de testosterona, FSH (hormônio folículo estimulante) e LH (hormônio luteinizante) reduziram significativamente nos ratos tratados com doses de 20 mg F/Kg/dia durante 28 dias, quando comparados com o controle (SARKAR; MAITI; GHOSH, 2006). A redução desses hormônios pelo F, levaria a uma redução da síntese da α_2 - μ G. No presente estudo, foi encontrada uma sub-expressão não dose-dependente de α_2 - μ G nos grupos tratados em relação ao controle. Redução na expressão de α_2 - μ G também tem sido relatada em rins de ratos expostos ao chumbo (WITZMANN et al., 1999).

5.2.3.5 Proteínas pertencentes à categoria de “Estrutura e organização celular”

Cinco proteínas pertencentes à categoria de estrutura e organização tiveram sua expressão alterada mediante a exposição aguda ao fluoreto. O citoesqueleto consiste em várias redes de bastões estruturais altamente organizados que percorrem cada célula. Cada rede é feita de um dentre 3 tipos de bastões: filamentos intermediários (formados, nos tecidos mesenquimais, pela vimentina), microfilamentos (formados pela actina) e microtúbulos (formados pela tubulina). Existe ainda a vilina, que está provavelmente envolvida na conexão das estruturas acima descritas com a membrana plasmática (GRIFFITHS et al., 2008).

Heterodímeros de tubulina formados de α - e β -tubulina (cada uma com cerca de 50 kDa) são os componentes estruturais básicos que constituem os microtúbulos. Os microtúbulos são tubos ocos, com aproximadamente 25 nm de diâmetro que radiam a partir do centro organizador de microtúbulos localizado no centrôssomo no citoplasma de células em interfase. Estão envolvidos em vários processos celulares,

que incluem movimentação celular, transporte intracelular e divisão celular (VERHEY; GAERTIG, 2007). No presente estudo, 3 cadeias de α -tubulina apresentaram-se subexpressas mediante tratamento agudo com fluoreto. A *tubulin alpha-4A chain* (TUBA4) foi detectada apenas no grupo controle, enquanto que a *tubulin alpha-1C chain* (TUBA6) e a *tubulin alpha-8 chain* (TUBA8) apresentaram-se com expressão diminuída no grupo T2 quando comparado ao controle e T1. Por outro lado, houve um aumento na expressão de vimentina (*vimentin*) e de *ezrin* (vilina) no grupo T2 quando comparado ao T1 e controle, que não diferiram entre si.

Portanto, a exposição aguda ao fluoreto, especialmente na dose mais alta, foi capaz de alterar a expressão de diferentes proteínas relacionadas com a estrutura e organização celular.

Em síntese, apesar do pequeno número de proteínas que puderam ser identificadas até o momento, dentre as várias detectadas com expressão diferencial mediante o tratamento agudo com fluoreto, foi possível observar que proteínas pertencentes a todas as categorias funcionais foram observadas com expressão alterada. É fundamental ressaltar que as doses de fluoreto empregadas no presente estudo e que levaram a estas alterações são muito maiores que aquelas utilizadas em Odontologia para o controle da cárie dentária, incluindo a fluoretação das águas de abastecimento público e a adição de fluoreto a dentifrícios e produtos de aplicação tópica, que são medidas consideradas eficientes e seguras para o controle da cárie dentária (MCDONAGH et al., 2000; MARINHO, 2009; WALSH et al., 2010).

6 CONCLUSÃO

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização da técnica de gavagem gástrica em animais mostrou-se bastante eficiente para a realização de estudos envolvendo intoxicações agudas pelo fluoreto. Para a concentração de fluoreto no plasma e rins foi verificado um aumento dose-dependente nesses tecidos, de acordo com a quantidade de fluoreto ingerida. Em combinação com a proteômica, a compreensão dos mecanismos moleculares da ação do fluoreto no organismo mostrou-se bastante relevante, pois na literatura há poucos trabalhos relacionados aos efeitos tóxicos deste elemento.

As proteínas identificadas até o momento indicam que o fluoreto é capaz de agir em diversos processos celulares, que vão desde alterações em vias metabólicas importantes, como o metabolismo de aminoácidos, bem como naquelas importantes para a manutenção da estrutura celular. No entanto, devido ao grande número de *spots* que restam para serem identificados, qualquer conclusão específica sobre as possíveis vias alteradas deve ser analisada com mais profundidade, uma vez que a célula, quando submetida a um estresse, pode ativar diferentes mecanismos para compensar a deficiência de uma determinada proteína.

Deste modo, o presente trabalho, abre novas fronteiras para o estudo sobre os mecanismos moleculares envolvidos no processo de intoxicação pelo fluoreto.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ABIKO, Y., et al., (2001). "Immunohistochemical localization of amelogenin in human odontogenic tumors, using a polyclonal antibody against bovine amelogenin." *Med Electron Microsc* **34**: 185-89.
- AL-SHABANAH, O. A., et al., (2010). "Increased urinary losses of carnitine and decreased intramitochondrial coenzyme A in gentamicin-induced acute renal failure in rats." *Nephrol Dial Transplant* **25**(1): 69-76.
- ALIN, P., et al., (1989). "Cytosolic glutathione transferases from rat liver. Primary structure of class alpha glutathione transferase 8-8 and characterization of low-abundance class Mu glutathione transferases." *Biochem J* **261**(2): 531-9.
- ANASUYA, A., (1982). "Role of fluoride in formation of urinary calculi: studies in rats." *J Nutr* **112**(9): 1787-95.
- ANDRADE, A. (2006). Sequenciamento, identificação e análise das proteínas do caule de mudas de *Eucalyptus grandis*. PAULO, U. D. S.
- ANURADHA, C. D., et al., (2001). "Oxidative damage to mitochondria is a preliminary step to caspase-3 activation in fluoride-induced apoptosis in HL-60 cells." *Free Radic Biol Med* **31**(3): 367-73.
- ARNER, R. J., et al., (2001). "myo-Inositol oxygenase: molecular cloning and expression of a unique enzyme that oxidizes myo-inositol and D-chiro-inositol." *Biochem J* **360**(Pt 2): 313-20.
- ASAGI, K., et al., (1998). "Purification, characterization and differentiation-dependent expression of a perchloric acid soluble protein from rat kidney." *Nephron* **79**(1): 80-90.
- ATKINSON, A. J., et al., (2001). "Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework." *Clin Pharmacol Ther* **69**(3): 89-95.
- BARSKI, O. A., et al., (2005). "Developmental expression and function of aldehyde reductase in proximal tubules of the kidney." *Am J Physiol Renal Physiol* **289**(1): F200-7.
- BAYKOV, A. A., et al., (1992). "A two-step mechanism of fluoride inhibition of rat liver inorganic pyrophosphatase." *Arch Biochem Biophys* **294**(1): 238-43.
- BEHNE, D. and KYRIAKOPOULOS, A., (2001). "Mammalian selenium-containing proteins." *Annu Rev Nutr* **21**: 453-73.
- BEKTAS, M., et al., (1994). "Interactions of eukaryotic elongation factor 2 with actin: a possible link between protein synthetic machinery and cytoskeleton." *FEBS Lett* **356**(1): 89-93.
- BOOTH, M. P., et al., (2006). "Structural basis of substrate specificity in human glyoxylate reductase/hydroxypyruvate reductase." *J Mol Biol* **360**(1): 178-89.
- BRADFORD, M. M., (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* **72**: 248-54.
- BRAUNSTEIN, A. E. The enzymes. The enzymes 22. BOYER PD, L. H., MYRBÄCK CK New York, Academic Press, (1960). 113-81.
- BREMER, J., (1983). "Carnitine--metabolism and functions." *Physiol Rev* **63**(4): 1420-80.
- BUZALAF, M. A. and CARDOSO, V. E. S. Destinos do fluoreto no organismo. Fluoreto e Saúde Bucal. BUZALAF, M. A. Bauru(2008).
- BUZALAF, M. A., et al., (2004a). "Nail and bone surface as biomarkers for acute fluoride exposure in rats." *J Anal Toxicol* **28**(4): 249-52.
- BUZALAF, M. A., et al., (2005). "Bone surface and whole bone as biomarkers for acute fluoride exposure." *J Anal Toxicol* **29**(8): 810-3.
- BUZALAF, M. A. R., et al., (2004b). "Nail and bone surface as biomarkers for acute fluoride exposure in rats." *J Anal Toxicol* **28**(4): 249-52.
- BUZALAF, M. A. R., et al., (2004c). "Nail and bone surface as indicators of acute exposure to fluoride in rats." *J. Appl Oral Sci* **12**(4): 171-76.
- CANAS, B., et al., (2006). "Mass spectrometry technologies for proteomics." *Brief Funct Genomic Proteomic* **4**(4): 295-320.
- CANDIANO, G., et al., (2004). "Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis." *Electrophoresis* **25**(9): 1327-33.

- CANTU, M. D. (2007). Análise proteômica diferencial aplicada para o estudo da morte súbita dos citros. São Carlos, Universidade de São Paulo. **Doutorado**.
- CHEN, E., et al., (2000). "Rapid up-regulation of peptide elongation factor EF-1 α protein levels is an immediate early event during oxidative stress-induced apoptosis." *Exp Cell Res* **259**(1): 140-8.
- CHOUHAN, S. and FLORA, S. J., (2008). "Effects of fluoride on the tissue oxidative stress and apoptosis in rats: biochemical assays supported by IR spectroscopy data." *Toxicology* **254**(1-2): 61-7.
- CITTANOVA, M. L., et al., (1996). "Fluoride ion toxicity in human kidney collecting duct cells." *Anesthesiology* **84**(2): 428-35.
- COHEN, S. D., et al., (1997). "Selective protein covalent binding and target organ toxicity." *Toxicol Appl Pharmacol* **143**(1): 1-12.
- COLLINSON, I. R., et al., (1994). "ATP synthase from bovine heart mitochondria: identification by proteolysis of sites in F₀ exposed by removal of F₁ and the oligomycin-sensitivity conferral protein." *Biochem J* **303** (Pt 2): 639-45.
- CONDEELIS, J., (1995). "Elongation factor 1 α , translation and the cytoskeleton." *Trends Biochem Sci* **20**(5): 169-70.
- CONKLIN, D., et al., (2007). "Aldehyde metabolism in the cardiovascular system." *Mol Biosyst* **3**(2): 136-50.
- CONZELMANN, E. and SANDHOFF, K., (1979). "Purification and characterization of an activator protein for the degradation of glycolipids GM2 and GA2 by hexosaminidase A." *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* **360**(12): 1837-49.
- CUTLER, P., et al., (1999). "An integrated proteomic approach to studying glomerular nephrotoxicity." *Electrophoresis* **20**(18): 3647-58.
- DANIELSON, U. H. and MANNERVIK, B., (1985). "Kinetic independence of the subunits of cytosolic glutathione transferase from the rat." *Biochem J* **231**(2): 263-7.
- DASS, C. Fundamentals of contemporary mass spectrometry. Hoboken, Wiley-interscience, (2007).
- DELLA FAZIA, M. A., et al., (2002). "Ial-1: a differentially expressed novel gene during proliferation in liver regeneration and in hepatoma cells." *Genes Cells* **7**(11): 1183-90.
- DEVER, T. E., et al., (1987). "GTP-binding domain: three consensus sequence elements with distinct spacing." *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(7): 1814-8.
- DIPPLE, K. M. and CRABB, D. W., (1993). "The mitochondrial aldehyde dehydrogenase gene resides in an HTF island but is expressed in a tissue-specific manner." *Biochem Biophys Res Commun* **193**(1): 420-7.
- DOTE, T., et al., (2000). "Toxicokinetics of intravenous fluoride in rats with renal damage caused by high-dose fluoride exposure." *Int Arch Occup Environ Health* **73 Suppl**: S90-2.
- DUKES, M. N. G. Fluoride. Side Effects of Drugs. DUKES, M. N. G. Oxford, Excerpta Medica, (1980). 354.
- DUTTARROY, A., et al., (1998). "Apoptosis rate can be accelerated or decelerated by overexpression or reduction of the level of elongation factor-1 α ." *Exp Cell Res* **238**(1): 168-76.
- EDMONDS, B. T., et al., (1996). "Elongation factor-1 α is an overexpressed actin binding protein in metastatic rat mammary adenocarcinoma." *J Cell Sci* **109** (Pt 11): 2705-14.
- EICHLER, H. G., et al., (1982). "Accidental ingestion of NaF tablets by children--report of a poison control center and one case." *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol* **20**(7): 334-8.
- EKSTRAND, J. Fluoride metabolism. Fluoride in dentistry. FEJERSKOV, O., EKSTRAND, J. and BURT, B. A. Copenhagen, Munksgaard, (1996). 55-68.
- EKSTRAND, J., et al., (1977). "Absence of protein-bound fluoride from human and blood plasma." *Arch Oral Biol* **22**(4): 229-32.
- EKSTRAND, J., et al., (1990). "Pharmacokinetics of fluoride in man and its clinical relevance." *J Dent Res* **69 Spec No**: 550-5; discussion 56-7.
- ELLIS, E. M., et al., (1993). "An ethoxyquin-inducible aldehyde reductase from rat liver that metabolizes aflatoxin B1 defines a subfamily of aldo-keto reductases." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(21): 10350-4.

- ELORANTA, T. O., (1977). "Tissue distribution of S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine in the rat. Effect of age, sex and methionine administration on the metabolism of S-adenosylmethionine, S-adenosylhomocysteine and polyamines." *Biochem J* **166**(3): 521-9.
- ENGLARD, S., (1979). "Hydroxylation of gamma-butyrobetaine to carnitine in human and monkey tissues." *FEBS Lett* **102**(2): 297-300.
- FEJERSKOV, O., et al. The effect of fluoride on tooth mineralization. Fluoride in dentistry. FEJERSKOV, O., EKSTRAND, J. and BURT, B. A. Copenhagen, Munksgaard, (1996). 112-46.
- FERGUSON, M. A., et al., (2010). "Urinary liver-type fatty acid-binding protein predicts adverse outcomes in acute kidney injury." *Kidney Int* **77**(8): 708-14.
- FINKELSTEIN, J. D. and HARRIS, B., (1973). "Methionine metabolism in mammals: synthesis of S-adenosylhomocysteine in rat tissues." *Arch Biochem Biophys* **159**(1): 160-5.
- FLANAGAN, J. L., et al., (2010). "Role of carnitine in disease." *Nutr Metab (Lond)* **7**: 30.
- FRY, B. W., et al., (1973). "Fluorometabolites of methoxyflurane: serum concentrations and renal clearances." *Anesthesiology* **38**(1): 38-44.
- GANGWANI, L., et al., (1998). "Interaction of ZPR1 with translation elongation factor-1alpha in proliferating cells." *J Cell Biol* **143**(6): 1471-84.
- GE-HEALTHCARE. 2-D Electrophoresis: Principles and methods. Buckinghamshire GE Healthcare, (2004).
- GHOSH, D., et al., (2002). "Testicular toxicity in sodium fluoride treated rats: association with oxidative stress." *Reprod Toxicol* **16**(4): 385-90.
- GILLETTE, M. A., et al., (2005). "Place of pattern in proteomic biomarker discovery." *J Proteome Res* **4**(4): 1143-54.
- GINGRAS, R., et al., (1999). "Purification, cDNA cloning, and expression of a new human blood plasma glutamate carboxypeptidase homologous to N-acetyl-aspartyl-alpha-glutamate carboxypeptidase/prostate-specific membrane antigen." *J Biol Chem* **274**(17): 11742-50.
- GOLINSKY, A., (1981). "Fatal incidents of fluoride intoxication." *Can Dent Hyg* **15**(1): 14-6.
- GORG, A., et al., (2004). "Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics." *Proteomics* **4**(12): 3665-85.
- GRAVES, P. R. and HAYSTEAD, T. A., (2002). "Molecular biologist's guide to proteomics." *Microbiol Mol Biol Rev* **66**(1): 39-63; table of contents.
- GRIFFITHS, A. J. F., et al. Introdução à Genética. Rio de Janeiro, GUANABARA-KOOGAN, (2008).
- GRUNINGER, S. E., et al., (1988). "Acute oral toxicity of dentifrices fluoride in rats and mice." *J. Dent. Res.* **67**: 334.
- GUAN, Z. Z., et al., (1998). "Influence of chronic fluorosis on membrane lipids in rat brain." *Neurotoxicol Teratol* **20**(5): 537-42.
- HAARS, L. J. and PITOT, H. C., (1979). "alpha 2 micro-Globulin in the rat. The regulation of the appearance of multiple forms in vivo and in primary cultures of adult hepatocytes." *J Biol Chem* **254**(19): 9401-7.
- HANCOCK, W. S., (2003). "What is new in proteomics? Biomarkers." *J Proteome Res* **2**(5): 457.
- HAYNES, P. A. and YATES, J. R., 3RD, (2000). "Proteome profiling-pitfalls and progress." *Yeast* **17**(2): 81-7.
- HECHTMAN, P., (1977). "Characterization of an activating factor required for hydrolysis of Gm2 ganglioside catalyzed by hexosaminidase A." *Can J Biochem* **55**(4): 315-24.
- HERMES, M., et al., (2004). "Influence of an altered methylation potential on mRNA methylation and gene expression in HepG2 cells." *Exp Cell Res* **294**(2): 325-34.
- HERSHEY, J. W., (1991). "Translational control in mammalian cells." *Annu Rev Biochem* **60**: 717-55.
- HOFFMANN, E. and STROOBANT, V. Mass Spectrometry: Principles and Applications. Chichester, Wiley-Interscience, (2007).
- HULSE, J. D. and HENDERSON, L. M., (1980). "Carnitine biosynthesis. Purification of 4-N'-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase from beef liver." *J Biol Chem* **255**(3): 1146-51.

- ISHII, Y., et al., (1996). "Significant induction of a 54-kDa protein in rat liver with homologous alignment to mouse selenium binding protein by a coplanar polychlorinated biphenyl, 3,4,5,3',4'-pentachlorobiphenyl and 3-methylcholanthrene." *Toxicol Lett* **87**(1): 1-9.
- JANCKILA, A. J., et al., (1992). "Protein-tyrosine phosphatase activity of hairy cell tartrate-resistant acid phosphatase." *Leukemia* **6**(3): 199-203.
- KAMIJO, A., et al., (2004). "Urinary fatty acid-binding protein as a new clinical marker of the progression of chronic renal disease." *J Lab Clin Med* **143**(1): 23-30.
- KAMIJO, A., et al., (2006). "Urinary liver-type fatty acid binding protein as a useful biomarker in chronic kidney disease." *Mol Cell Biochem* **284**(1-2): 175-82.
- KARAS, M., et al., (1987). "Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds." *Int. J. Mass Spectrom.* **78**: 53-68.
- KATO, H., et al., (1987). "3-Deoxyglucosone crosslinks proteins under physiological conditions." *Agr Biol Chem* **51**: 2009-11.
- KIMURA, H., et al., (1991). "Primary structure and cellular distribution of two fatty acid-binding proteins in adult rat kidneys." *J Biol Chem* **266**(9): 5963-72.
- KLOOR, D., et al., (2002). "Tissue levels of S-adenosylhomocysteine in the rat kidney: effects of ischemia and homocysteine." *Biochem Pharmacol* **63**(4): 809-15.
- KLOOR, D. and OSSWALD, H., (2004). "S-Adenosylhomocysteine hydrolase as a target for intracellular adenosine action." *Trends Pharmacol Sci* **25**(6): 294-7.
- KLOOR, D., et al., (2000). "Localization of S-adenosylhomocysteine hydrolase in the rat kidney." *J Histochem Cytochem* **48**(2): 211-8.
- KLOSE, J., (1975). "Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals." *Humangenetik* **26**(3): 231-43.
- KOBAYASHI, C. A., et al., (2009). "Proteomic analysis of kidney in rats chronically exposed to fluoride." *Chem Biol Interact* **180**(2): 305-11.
- KOBAYASHI, C. A. N., et al., (In press). "Proteomic Analysis of Urine in Rats Chronically Exposed to Fluoride." *J BIOCHEM MOLECULAR TOXICOLOGY*.
- KOOLMAN, J. and RÖHM, K. H. *Bioquímica: Texto e atlas*. Porto Alegre, Artmed, (2005). 220-256.
- KRISHNAMACHARI, K. A., (1986). "Skeletal fluorosis in humans: a review of recent progress in the understanding of the disease." *Prog Food Nutr Sci* **10**(3-4): 279-314.
- KUCHARCZYK, R., et al., (1998). "The yeast gene YJR025c encodes a 3-hydroxyanthranilic acid dioxygenase and is involved in nicotinic acid biosynthesis." *FEBS Lett* **424**(3): 127-30.
- KURTZ, D. T., et al., (1976). "Effects of sex hormones on the level of the messenger RNA for the rat hepatic protein alpha 2u globulin." *J Biol Chem* **251**(12): 3594-8.
- KUSUNOKI, H., et al., (2003). "Relation between serum 3-deoxyglucosone and development of diabetic microangiopathy." *Diabetes Care* **26**(6): 1889-94.
- KWAK, D. H., et al., (2003). "Decreases of ganglioside GM3 in streptozotocin-induced diabetic glomeruli of rats." *Life Sci* **72**(17): 1997-2006.
- LAEMMLI, U. K., (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(5259): 680-5.
- LEITE, A. L. and BUZALAF, M. A. R. *Desfluoretação das águas. Fluoretos e saúde bucal*. BUZALAF, M. A. R. São Paulo, Santos, (2008). 299-316.
- LEITE, A. L., et al., (2008). "Kinetics of fluoride removal from plasma and bone of rats after chronic intake of fluoride." *Methods Find Exp Clin Pharmacol* **30**(3): 209-14.
- LEYVA, J. A., et al., (2003). "Understanding ATP synthesis: structure and mechanism of the F1-ATPase (Review)." *Mol Membr Biol* **20**(1): 27-33.
- LI, Y., (1993). "Fluoride: safety issues." *J Indiana Dent Assoc* **72**(3): 22-6.
- LI, Y. T., et al., (1973). "Structure of the major glucosamine-containing ganglioside of human tissues." *J Biol Chem* **248**(7): 2634-6.
- LIDBECK, W. L., et al., (1943). "Acute sodium fluoride poisoning." *Journal American Medical Association* **121**(11): 826-27.

- LIN, S. J. and GUARENTE, L., (2003). "Nicotinamide adenine dinucleotide, a metabolic regulator of transcription, longevity and disease." *Curr Opin Cell Biol* **15**(2): 241-6.
- LIND, T., et al., (1999). "cDNA cloning and expression of UDP-glucose dehydrogenase from bovine kidney." *Glycobiology* **9**(6): 595-600.
- LINDAHL, R., (1992). "Aldehyde dehydrogenases and their role in carcinogenesis." *Crit Rev Biochem Mol Biol* **27**(4-5): 283-335.
- MAGNI, G., et al., (1999). "Enzymology of NAD⁺ synthesis." *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **73**: 135-82, xi.
- MANN, M., et al., (1993). "Use of mass spectrometric molecular weight information to identify proteins in sequence databases." *Biol Mass Spectrom* **22**(6): 338-45.
- MARINHO, V. C., (2009). "Cochrane reviews of randomized trials of fluoride therapies for preventing dental caries." *Eur Arch Paediatr Dent* **10**(3): 183-91.
- MATSUNAGA, T., et al., (2006). "Multiplicity of mammalian reductases for xenobiotic carbonyl compounds." *Drug Metab Pharmacokinet* **21**(1): 1-18.
- MCDONAGH, M. S., et al., (2000). "Systematic review of water fluoridation." *BMJ* **321**(7265): 855-9.
- MDLULI, K., et al., (2005). "A preliminary account of the properties of recombinant human Glyoxylate reductase (GRHPR), LDHA and LDHB with glyoxylate, and their potential roles in its metabolism." *Biochim Biophys Acta* **1753**(2): 209-16.
- MOHOS, S. C. and SKOZA, L., (1969). "Glomerular sialoprotein." *Science* **164**(887): 1519-21.
- MONNIER, V. M. and CERAMI, A., (1981). "Nonenzymatic browning in vivo: possible process for aging of long-lived proteins." *Science* **211**(4481): 491-3.
- MORISHITA, R., et al., (1999). "Ribonuclease activity of rat liver perchloric acid-soluble protein, a potent inhibitor of protein synthesis." *J Biol Chem* **274**(29): 20688-92.
- MUNDEL, T. M., et al., (1999). "Ganglioside GM2-activator protein and vesicular transport in collecting duct intercalated cells." *J Am Soc Nephrol* **10**(3): 435-43.
- NAKAMURA, T., et al., (2006). "Effect of erythropoietin on urinary liver-type fatty-acid-binding protein in patients with chronic renal failure and anemia." *Am J Nephrol* **26**(3): 276-80.
- NAKAMURA, T., et al., (2007). "Angiotensin II receptor antagonist reduces urinary liver-type fatty acid-binding protein levels in patients with diabetic nephropathy and chronic renal failure." *Diabetologia* **50**(2): 490-2.
- NELSON, D. L. and COX, M. M. *Lehninger princípios de bioquímica*. São Paulo, Sarvier, (2002).
- NEUHAUS, O. W., (1986). "Renal reabsorption of low molecular weight proteins in adult male rats: alpha 2u-globulin." *Proc Soc Exp Biol Med* **182**(4): 531-9.
- NOZIK-GRAYCK, E., et al., (2005). "Extracellular superoxide dismutase." *Int J Biochem Cell Biol* **37**(12): 2466-71.
- O'FARRELL, P. H., (1975). "High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins." *J Biol Chem* **250**(10): 4007-21.
- OGILVIE, A. L., (1953). "Histologic findings in the kidney, liver, pancreas, adrenal, and thyroid glands of the rat following sodium fluoride administration." *J Dent Res* **32**(3): 386-97.
- OHSAWA, I., et al., (2003). "Deficiency in a mitochondrial aldehyde dehydrogenase increases vulnerability to oxidative stress in PC12 cells." *J Neurochem* **84**(5): 1110-7.
- OHTA, S., et al., (2004). "Mitochondrial ALDH2 deficiency as an oxidative stress." *Ann N Y Acad Sci* **1011**: 36-44.
- PALMER, J. L. and ABELES, R. H., (1979). "The mechanism of action of S-adenosylhomocysteinase." *J Biol Chem* **254**(4): 1217-26.
- PEIXOTO, E. M. A., (1998). "Elemento químico flúor." *Química Nova* **8**: 43.
- PELSERS, M. M., et al., (2005). "Fatty acid-binding proteins as plasma markers of tissue injury." *Clin Chim Acta* **352**(1-2): 15-35.
- PERNA, A. F., et al., (2001). "Homocysteine and transmethyations in uremia." *Kidney Int Suppl* **78**: S230-3.

- PINKSE, M. W., et al., (1999). "Fluoride inhibition of bovine spleen purple acid phosphatase: characterization of a ternary enzyme-phosphate-fluoride complex as a model for the active enzyme-substrate-hydroxide complex." *Biochemistry* **38**(31): 9926-36.
- PORAT, A., et al., (2000). "A 56-kDa selenium-binding protein participates in intra-Golgi protein transport." *J Biol Chem* **275**(19): 14457-65.
- PORTILLA, D., et al., (2008). "Liver fatty acid-binding protein as a biomarker of acute kidney injury after cardiac surgery." *Kidney Int* **73**(4): 465-72.
- PORTO, P. (2006). Otimização da análise isotópica de UF₆ utilizando se a técnica de espectrometria de massas por quadrupolo. São Paulo, Universidade de São Paulo. **Mestre**: 128.
- PORUBLEVA, L., et al., (2001). "The proteome of maize leaves: use of gene sequences and expressed sequence tag data for identification of proteins with peptide mass fingerprints." *Electrophoresis* **22**(9): 1724-38.
- RAHBAR, S., et al., (1999). "Novel inhibitors of advanced glycation endproducts." *Biochem Biophys Res Commun* **262**(3): 651-6.
- RAO, H. V., et al., (1995). "A physiologically based pharmacokinetic model for fluoride uptake by bone." *Regul Toxicol Pharmacol* **22**(1): 30-42.
- REBOUCHE, C. J. and ENGEL, A. G., (1980). "Tissue distribution of carnitine biosynthetic enzymes in man." *Biochim Biophys Acta* **630**(1): 22-9.
- REFSNES, M., et al., (2003). "Fluoride-induced apoptosis in human epithelial lung cells (A549 cells): role of different G protein-linked signal systems." *Hum Exp Toxicol* **22**(3): 111-23.
- REFSNES, M., et al., (2001). "Mechanisms in fluoride-induced interleukin-8 synthesis in human lung epithelial cells." *Toxicology* **167**(2): 145-58.
- REINDERS, J. and SICKMANN, A. *Proteomics: Methods and protocols*. New York, Humana Press, (2002). 71-72.
- RISON, S. C., et al., (2000). "Comparison of functional annotation schemes for genomes." *Funct Integr Genomics* **1**(1): 56-69.
- ROELS, H., et al., (1993). "Markers of early renal changes induced by industrial pollutants. III. Application to workers exposed to cadmium." *Br J Ind Med* **50**(1): 37-48.
- ROY, A. K., et al., (1976). "Protection of spermatogenesis by alpha₂u globulin in rats treated with oestrogen." *Nature* **260**(5553): 719-21.
- ROY, A. K. and DOWBENKO, D. J., (1977). "Role of growth hormone in the multihormonal regulation of messenger RNA for alpha₂u globulin in the liver of hypophysectomized rats." *Biochemistry* **16**(17): 3918-22.
- SAMPAIO, F. C. Toxicidade crônica dos fluoretos. Fluoretos e saúde bucal. BUZALAF, M. A. R. São Paulo, Ed. Santos, (2008). 87-109.
- SARKAR, S. D., et al., (2006). "Management of fluoride induced testicular disorders by calcium and vitamin-E co-administration in the albino rat." *Reprod Toxicol* **22**(4): 606-12.
- SHANTHAKUMARI, D., et al., (2004). "Effect of fluoride intoxication on lipidperoxidation and antioxidant status in experimental rats." *Toxicology* **204**(2-3): 219-28.
- SHIN, D. H., et al., (2005). "Crystal structure of a nicotinate phosphoribosyltransferase from *Thermoplasma acidophilum*." *J Biol Chem* **280**(18): 18326-35.
- SHIVASHANKARA, A. R., et al., (2002). "Lipid peroxidation and antioxidant defense systems in liver of rats in chronic fluoride toxicity." *Bull Environ Contam Toxicol* **68**(4): 612-6.
- SHULMAN, J. D. and WELLS, L. M., (1997). "Acute fluoride toxicity from ingesting home-use dental products in children, birth to 6 years of age." *J Public Health Dent* **57**(3): 150-8.
- SMITH, C. E. and NANJI, A., (1996). "Protein dynamics of amelogenesis." *Anat Rec* **245**(2): 186-207.
- SMITH, F. and EKSTRAND, J. The occurrence and the chemistry of fluoride. Fluoride in dentistry. FEJERSKOV, O., BURT, B. A. and EKSTRAND, J. (1996a). 17-26.
- SMITH, F. A. and EKSTRAND, J. The occurrence and the chemistry of fluoride. Fluoride in dentistry. FEJERSKOV, O., EKSTRAND, J. and BURT, B. A. Copenhagen, Munksgaard, (1996b).

- SOUZA, L. M. (2008). Aplicações da espectrometria de massas e da cromatografia líquida na caracterização estrutural de biomoléculas de baixa massa molecular. Curitiba, Universidade Federal do Paraná. **doutor**: 182.
- STRUNECKA, A., (2007). "Fluoride interactions: from molecule to disease." *Current signal transduction therapy* **2**: 190-213.
- SU, M., et al., (2003). "Amiodarone attenuates fluoride-induced hyperkalemia in vitro." *Acad Emerg Med* **10**(2): 105-9.
- TAKAGI, M. and SHIRAKI, S., (1982). "Acute sodium fluoride toxicity in the rat kidney." *Bull Tokyo Med Dent Univ* **29**(4): 123-30.
- TAKAHASHI, M., et al., (1995). "In vivo glycation of aldehyde reductase, a major 3-deoxyglucosone reducing enzyme: identification of glycation sites." *Biochemistry* **34**(4): 1433-8.
- TAKASE, I., et al., (2004). "Fatality due to acute fluoride poisoning in the workplace." *Leg Med (Tokyo)* **6**(3): 197-200.
- TAVES, D. R., (1968). "Determination of submicromolar concentrations of fluoride in biological samples." *Talanta* **15**(10): 1015-23.
- THIEDE, B., et al., (2005). "Peptide mass fingerprinting." *Methods* **35**(3): 237-47.
- THONGBOONKERD, V., (2004). "Proteomics in nephrology: current status and future directions." *Am J Nephrol* **24**(3): 360-78.
- THONGBOONKERD, V., et al., (2002). "Proteomic analysis reveals alterations in the renal kallikrein pathway during hypoxia-induced hypertension." *J Biol Chem* **277**(38): 34708-16.
- TIAN, Z., et al., (2008). "Renal regional proteomes in young Dahl salt-sensitive rats." *Hypertension* **51**(4): 899-904.
- TILTON, R. G., et al., (2007). "Diabetes-induced changes in the renal cortical proteome assessed with two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry." *Proteomics* **7**(10): 1729-42.
- TURNER, M. A., et al., (2000). "Structure and function of S-adenosylhomocysteine hydrolase." *Cell Biochem Biophys* **33**(2): 101-25.
- USUDA, K., et al., (1999). "Usefulness of the assessment of urinary enzyme leakage in monitoring acute fluoride nephrotoxicity." *Arch Toxicol* **73**(6): 346-51.
- USUDA, K., et al., (1998). "Urinary biomarkers monitoring for experimental fluoride nephrotoxicity." *Arch Toxicol* **72**(2): 104-9.
- VAZIRI, N. D., et al., (2003). "Oxidative stress and dysregulation of superoxide dismutase and NADPH oxidase in renal insufficiency." *Kidney Int* **63**(1): 179-85.
- VERHEY, K. J. and GAERTIG, J., (2007). "The tubulin code." *Cell Cycle* **6**(17): 2152-60.
- VLAHOU, A. and FOUNTOULAKIS, M., (2005). "Proteomic approaches in the search for disease biomarkers." *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **814**(1): 11-9.
- WALKER, J. E., et al., (1985). "Primary structure and subunit stoichiometry of F1-ATPase from bovine mitochondria." *J Mol Biol* **184**(4): 677-701.
- WALSH, T., et al., (2010). "Fluoride toothpastes of different concentrations for preventing dental caries in children and adolescents." *Cochrane Database Syst Rev*(1): CD007868.
- WAMELINK, M. M. C. (2008). Pentose phosphate pathway: biochemistry, metabolism and inherited defects. *Clinical Chemistry*. Amsterdam, VRIJE UNIVERSITEIT: 164.
- WANG, A. G., et al., (2004). "Effects of fluoride on lipid peroxidation, DNA damage and apoptosis in human embryo hepatocytes." *Biomed Environ Sci* **17**(2): 217-22.
- WANG, G., et al., (2005). "Antioxidative function of L-FABP in L-FABP stably transfected Chang liver cells." *Hepatology* **42**(4): 871-9.
- WANG, P., et al., (2001). "Mechanisms of sodium fluoride-induced endothelial cell barrier dysfunction: role of MLC phosphorylation." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **281**(6): L1472-83.
- WEIDEMANN, M. J. and KREBS, H. A., (1969). "Acceleration of gluconeogenesis from propionate by DL-carnitine in the rat kidney cortex." *Biochem J* **111**(1): 69-81.

- WESTERMEIER, R. and NAVEN, T. *Proteomics in Practice: A laboratory manual of proteome analysis* - Weinhein, ed. Wiley-VCH, (2002).
- WHITFORD, G. M., (1990). "The physiological and toxicological characteristics of fluoride." *J Dent Res* **69 Spec No**: 539-49; discussion 56-7.
- WHITFORD, G. M. *The metabolism and toxicity of fluoride*. Basel, Karger, (1996).
- WHITFORD, G. M. *Toxicidade aguda do fluoreto. Fluoretos e saúde bucal*. BUZALAF, M. A. R. São Paulo, Ed. Santos, (2008). 69-86.
- WHITFORD, G. M., et al., (1987). "Topical fluorides: effects on physiologic and biochemical processes." *J Dent Res* **66**(5): 1072-8.
- WHITFORD, G. M., et al., (1990). "Acute oral toxicity of sodium fluoride and monofluorophosphate separately or in combination in rats." *Caries Res* **24**(2): 121-6.
- WHITFORD, G. M. and LECOMPTE, E. J., (1983). "Acute fluoride toxicity: influence of gastric acidity." *J. Dent. Res.* **62**(spec. issue): 262.
- WHITFORD, G. M. and PASHLEY, D. H., (1984). "Fluoride absorption: the influence of gastric acidity." *Calcif Tissue Int* **36**(3): 302-7.
- WHITFORD, G. M. and TAVES, D. R., (1973). "Fluoride-induced diuresis: renal-tissue solute concentrations, functional, hemodynamic, and histologic correlates in the rat." *Anesthesiology* **39**(4): 416-27.
- WILKINS, M. R., et al., (1996). "Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it." *Biotechnol Genet Eng Rev* **13**: 19-50.
- WILKINS, M. R., et al. *Proteome research: New frontiers in funcional genomics, princples and practice*. . Berlin, Springer verlag, (1997). 243.
- WITZMANN, F. A., et al., (1998). "Differential expression of cytosolic proteins in the rat kidney cortex and medulla: preliminary proteomics." *Electrophoresis* **19**(14): 2491-7.
- WITZMANN, F. A., et al., (1999). "Regional protein alterations in rat kidneys induced by lead exposure." *Electrophoresis* **20**(4-5): 943-51.
- WOOLLEY, P. and CLARK, B. F. C., (1989). "Homologies in the structure of G-binding proteins : an analysis based on elongation factor EFTU." *Bio-technology* **7**: 913-20.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Fluorides and oral health*. Geneva, WHO technical report, (1994).
- WROBEL, M., et al., (2004). "Sulfurtransferases and cyanide detoxification in mouse liver, kidney, and brain." *Toxicol Mech Methods* **14**(6): 331-7.
- XU, H., et al., (2005). "Proteomic analysis of kidney in fluoride-treated rat." *Toxicol Lett* **160**(1): 69-75.
- XU, H., et al., (2008). "Proteomic analysis of osteoblasts exposed to fluoride in vitro." *Biol Trace Elem Res* **123**(1-3): 91-7.
- YAMAMOTO, T., et al., (2007). "Renal L-type fatty acid-binding protein in acute ischemic injury." *J Am Soc Nephrol* **18**(11): 2894-902.
- YU, M., et al., (2008). "Comparative analysis of renal protein expression in spontaneously hypertensive rat." *Clin Exp Hypertens* **30**(5): 315-25.
- ZAGER, R. A. and IWATA, M., (1997). "Inorganic fluoride. Divergent effects on human proximal tubular cell viability." *Am J Pathol* **150**(2): 735-45.
- ZALENY, J., (1917). "Instability of electrified liquid surface." *Physical Review* **10**(1): 1-6.
- ZHAO, W., et al., (2009). "Protection of peroxiredoxin II on oxidative stress-induced cardiomyocyte death and apoptosis." *Basic Res Cardiol* **104**(4): 377-89.

ANEXOS

Anexo I

Universidade de São Paulo Faculdade de Odontologia de Bauru

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)235-8000 – FAX (0XX14)223-4679

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

CEEPA-Proc. Nº 14/2005

Bauru, 20 de junho de 2005.

Senhora Professora,

O projeto de pesquisa encaminhado a esta Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, denominado **“Análise proteômica em fluidos corporais e tecidos moles em ratos submetidos a tratamento com flúor”**, de autoria de Cláudia Ayumi Nakai Kobayashi e Aline de Lima Leite, a ser desenvolvido sob sua orientação, foi enviado ao relator para avaliação.

Na reunião de **15 de junho de 2005** esta Comissão aprovou o parecer do relator, considerando que não existem infrações éticas.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Luís Antônio de Assis Taveira
Vice-Presidente da Comissão de Ética no
Ensino e Pesquisa em Animais

Ilm^a Sr^a Prof^a Dr^a Marília Afonso Rabelo Buzalaf
DD. Docente do Departamento de Ciências Biológicas

Anexo II – Relação das proteínas identificada

Os peptídeos pareados com a sequência da proteína estão mostrados em vermelho

Proteína: Adenosylhomocysteinase

Uniprot ID: P10760

pI/MM Teor. - 6,0/47538

pI/MM Exp. - 6,4/48000

```

1  ADKLPYKVAD  IGLAAWGRKA  LDIAENEMPG  LMRMREMYSA  SKPLKGARIA
51  GCLHMTVETA  VLIETLVALG  AEVRWSSCNI  FSTQDHAAAA  IAKAGIPVFA
101 WKGETDEEYL  WCIEQTLHFK  DGPLNMILDD  GGDLTNLIHT  KHPQLLSGIR
151 GISEETTTGV  HNLYKMMANG  ILKVPAINVN  DSVTKSKFDN  LYGCRESLID
201 GIKRATDVM  AGKVAVVAGY GDVVGKGCAQA  LRGFGARVII  TEIDPINALQ
251 AAMEGYEVT  MDEACKEGNI  FVTTTGCVDI  ILGRHFQMK  DDAIVCNIGH
301 FDVEIDVKWL  NENAVEKVNI  KPQVDRYLLK  NGHRIILLAE GRLVNLGCAM
351 GHPSFVMSNS  FTNQVMAQIE  LWTHPDKYPV  GVHFLPKKLD EAVAEHLGK
401 LNVKLTCLTE  KQAQYLGMP  NGPFKPDHYR  Y

```

Proteína: UDP-glucose 6-dehydrogenase

Uniprot ID: O70199

pI/MM Teor. - 7,4/54892

pI/MM Exp. - 7,8/57000

```

1  MVEIKKICCI  GAGYVGGPTC  SVIARMCP EI  RVTVVDVNEA  RINAWNSPTL
51  PIYEPGLKEV  VESCRGKNLF  FSTNIDDAIR  EADLVFISVN  TPTKTYGMGK
101 GRAADLKYIE  ACARRIVQNS  NGYKIVTEKS  TVPVRAAESI  RRIFDANTKP
151 NLNLQVLSNP  EFLAEGTAIK  DLKNPDRVLI  GGDETPEGQR  AVQALCAVYE
201 HWVPKEKILT  TNTWSSELSK  LAANAFLAQR  ISSINSISAL  CESTGADVEE
251 VATAIGMDQR  IGKFLKASV  GFGGGCFQKD  VLNLVYLCEA  LNLPEVARYW
301 QQVIDMNDYQ  RRRFASRIID SLFNTVTDKK IAILGFAFKK  DTGDTRESSS
351 IYISKYLMDE  GAHLHIYDPK  VPREQIVVDL  SHPGVSADDQ  VSRLVTISKD
401 PYEACDGAHA  LVICTEWMDF  KELDYERIEH  RMLKPAFIFD  GRRVLDGLHN
451 ELQTIGFQIE  TIGKKVSSKR  IPYTPGEIPK  FSLQDPPNKK  PKV

```

Proteína: GM2 activator protein

Uniprot ID: Q8CJH4

pI/MM Teor. - 6,1/21521

pI/MM Exp. - 4,6/26000

```

1  MRRVPLLLVL  GLLFVLGLLF  AGPVAPSRLI  SKRPSQLGGF  SWDNCDEGKD
51  PAVIKSLTLQ PDPIVVPGDV IVSAEGKTSI PLTSPQKVEL TVEKEVAGFW
101 VKIPCVEQLG  SCTYENVCDL  IDQYIPPGET  CPEPLHTYGL  PCHCPFKEGT
151 YSLPSSNFTV  PDLELP SWLS  TGNYRIQSIL SSGGKRLLACI  KIAASLKGR

```

Proteína: Mitochondrial aldehyde dehydrogenase 2**Uniprot ID: P11884****pI/MM Teor. - 6,6/56488****pI/MM Exp. - 6,0/57000**

1 MLRAALSTAR RGPRLSRLLS AAATSAVPAP NQQPEVFCNQ IFINNEWHDA
 51 VSKK**TFPTVN** **PSTGEVICQV** **AEGNKEDVDK** AVKAAQAAFQ LGSPWRRMDA
 101 SDRGRLLYRL **ADLIERDRTY** LAALETLDNG KPYVISYLV D LDMVLKCLRY
 151 **YAGWADKYHG** **KTIPIDGDFE** **SYTRHEPVG** CGQIIPWNFP LLMQAWK**LGP**
 201 **ALATGNVVVM** **KVAEQTPLTA** **LYVANLIKEA** **GFPPGVVNIV** **PGFGPTAGAA**
 251 **IASHEDVDKV** **AFTGSTEVGH** **LIQVAAGSSN** **LKRVTTLELGG** **KSPNIIMSDA**
 301 DMDWAVEQAH FALFFNQGC CCAGSR**TFVQ** **EDVYDEFVER** SVARAKSR**VV**
 351 **GNPFDSRTEQ** GPQVDETQFK **KILGYIKSGQ** QEGAK**LLCGG** **GAAADRGYFI**
 401 **QPTVFGDVKD** **GMTIAKEEIF** **GPVMQILKFK** **TIEEVVGRAN** NSK**YGLAAAV**
 451 **FTKDLDKANY** LSQALQAGTV WINCYDVFGA QSPFGGYKMS GSGR**ELGEYG**
 501 **LQAYTEVKTV** TVKVPQKNS

Proteína: 4-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase**Uniprot ID: Q9JLJ3****pI/MM Teor. - 6,5/53652****pI/MM Exp. - 6,0/57000**

1 MSTGTFFVVSQ PLNYRGGAR**V** **EPVDASGTEK** **AFEPATGREI** **ATFKCSGEKE**
 51 **VNLAVENAKA** AFKIWSKKS LERCQVLLEA ARIIKERRDE IAIMETINNG
 101 KSIFEARLDV DTSWQCLEY AGLAASMAGE HIQLPGGSFG YTRREPLGVC
 151 LGIGAWNYPF QIACWKSAPA LACGNAMIFK PSPFTPVSAL LLAEIYTKAG
 201 APNGLFNVVQ GGAATGQFLC QHRDVAK**VSF** **TGSVPTGMKI** MEMAAK**GIKP**
 251 **ITLELGGKSP** LIIFSDCNMK NAVKGALLAN FLTQGVCCN GTRVFVQ**KEI**
 301 **ADAFTKEVVR** QTQRIK**IGDP** **LLEDTRMGPL** **INAPHLERVL** GFVRSKEQ
 351 ATVLCGGEPY APEDPKLKHG YYMTPCILT CTDDMTVCVKE EIFGPVMSIL
 401 TFETEAHVLE **RANDTTFLA** **AGVFTRDIQR** AHRVAAELQA GTCYINNYNV
 451 SPVELPFGGY KKSFGGRENG RVTIEYYSQ KTVCEVMDV ESAF

Proteína: Nicotinate phosphoribosyltransferase**Uniprot ID: Q6XQN1****pI/MM Teor. - 5,8/58564****pI/MM Exp. - 6,2/53000**

1 MEMELDDQGR MVVRPLLTDL YQATMGLGYW RAGRACEEAE FELFFRHCPF
 51 GGSFALTAGL QDCIRFLRAF RLRDADVQFL ASVLPPDTPD AFFEHLRALD
 101 CSRVSVRALP EGSLAFPGVP LLQVSGPLLL VQLLETPLLC LVSYASLVAT
 151 NAARLRLIAG PDKR**LLEMGL** **RRAQGPDGGF** TASIYSYLG FDSSSNTLAG
 201 QLRGVPVAGT LAHSFITSFL GSEVPPDPML APASSEGPV DLPASVNLWL
 251 KHVCIYLGLE EREPHLGERA **AFVAYALAFP** **RAFQGLLDY** **SVRRSGLPNF**
 301 **LAVALALGEL** **GYRAVGVRD** **SGDLLQQAKE** IRGIFRTVGA EFQMPWLEFV
 351 PIAVSNNIDE KELARLAQKG SEVNVIGIT NVVTCPKQPS MGCYVKLVSV
 401 GGQPRIKLTE ESQKETLPGS KAAFRFLVSE GSLLLDLLQL AEPPPKAGQ
 451 ELRVWLQGAQ EPCTVKPAQV EPLLRLYLQ GQPYEPLPSL EESRAFAQQS
 501 LSRLRPAHKQ LQNPVYQVA LSEKLRLALVD SLSARGAL

Proteína: ATP synthase subunit alpha, mitochondrial

Uniprot ID: P15999

pI/MM Teor. - 9,2/59753

pI/MM Exp. - 8,7/53000

```

1 EFRTATGQIV AVIGAVVDVQ FDEGLPPILN ALEVQGRESR LVLEVAQHLG
51 ESTVRTIAMD GTEGLVRGQK VLD SGAPIKI PVGPETLGRI MNVIGEPIDE
101 RGIPIKTKQFA PIHAEAPEFI EMSVEQEILV TGIKVVDLLA PYAKGGKIGL
151 FGGAGVGKTV LIMELINNVA KAHGGYSVFA GVGERTREGN DLYHEMIESG
201 VINLKDATSK VALVYQGMNE PPGARARVAL TGLTVAEYFR DQEGQDVLLF
251 IDNIFRFTQA GSEVSALLGR IPSAVGYQPT LATDMGTMQE RITTTKKGSI
301 TSVQAIYVPA DDLTDPAPAT TFAHLDATTV LSRAIAELGI YPAVDPLDST
351 SRIMDPNIVG SEHYDVARGV QKILQDYKSL QDIIAILGMD ELSEEDKLTV
401 SRARKIQRFLL SQPFQVAEVF TGHMGKLVPL KETIKGFQQI LAGDYDHLPE
451 QAFYMGVPIE EAVAKADKLA EEHGS

```

Proteína: Glyoxylate reductase/ hidroxypyruvate reductase (Grhpr protein)

Uniprot ID: B0BN46

pI/MM Teor. - 8,1/35937

pI/MM Exp. - 7,3/38000

```

1 MFAAAGLVKP ARLMKVFVTG PLPAQGRAAL AQATDCEVEQ WNSDDPIPSK
51 DLEQGVAGAY GLLCRLSDRV DKKLLDAAGA NLRVISTLSV GVDHLALDEI
101 KKRGIRVGYT PGVLTDATAE LAVSLLLTTC RRLPEAIEEV KNGGWSSWSP
151 LWMCGYGLSE STVGIVGLGR IGQAIARRLK PFGVQRFLYT GRQPRPQEEA
201 EFQAEFVPIA QLAAESDFIV VCSLTPATR GLCNKDFQK MKNTAVFINI
251 SRGDVVNQED LYQALASQI AAAGLDVTPP EPLPPSHPLL TLKNCVILPH
301 IGSATYKTRN TMSLLAANNL LAGLRGEPMP SELKL

```

Proteína: 4-aminobutyrate aminotransferase, mitochondrial

Uniprot ID: P50554

pI/MM Teor. - 8,1/56455

pI/MM Exp. - 7,7/50000

```

1 MAFLLTTRRL VCSSQKNLHL FTPGSRYSIS AAAKVDFEFD YDGPLMKTEV
51 PGPRSQELMK QLNTIQNAEA VHFFCNYES RGNYLVDVDG NRMLDLYSQI
101 SSVPIGYNHP ALAKLVQQPQ NASTFINRPA LGILPPENFV DKLRESLMSV
151 APKGMCQLIT MACGSCSNEN AFKTIFMWYR SKERGQRGFS KEELETMCVN
201 QSPGCPDYSI LSFMGAFHGR TMGCLATTHS KAIHKIDIPS FDWPIAPFPR
251 LKYPLEEFVT DNQQEEARCL EEVEDLIVKY RKKKRTVAGI IVEPIQSEGG
301 DNHASDDFFR KLRDIARKHG CAFLVDEVQT GGGCTGKFWA HEHWGLDDPA
351 DVMSFSKMM TGGFFHKEEF RPSAPYRIFN TWLGDPSKNL LLAEVINIIK
401 REDLLNNVAH AGKTLLTGLL DLQAQYPQFV SRVRGRGTFC SFDTPDKAIR
451 NKLILILIARNK GVVLGCGGDK SIRFRPTLVF RDHHAHLFLN IFSGILADFK
501

```

Proteína: Alcohol dehydrogenase [NADP+]

Uniprot ID: P51635

pI/MM Teor. - 6,8/36505

pI/MM Exp. - 7,6/38000

```

1  MTASSVLLHT  GQKMPLIGLG  TWKSEPGQVK  AAIKYALSVG  YRHIDCASVY
51  GNETEIGEAL  KESVGAGKAV  PREELFVTSK  LWNTKHHPED  VEPAVRKTLA
101 DLQLEYLDLY  LMHWPYAFER  GDNPFPKNAD  GTVKYDSTHY  KETWKALEAL
151 VAKGLVKALG  LSNFSSRQID  DVLSVASVRP  AVLQVECHPY  LAQNELIAHC
201 QARGLEVTAY  SPLGSSDRAW  RHPDEPVLE  EPVVLALAEK  HGRSPAQILL
251 RWQVQRKVIC  IPKSITPSRI  LQNIQVDFDT  FSPEEMKQLD  ALNKNWRYIV
301 PMITVDGKRV  PRDAGHPLYP  FNDPY

```

Proteína: Plasma glutamate carboxypeptidase

Uniprot ID: Q6IRK9

pI/MM Teor. - 5,9/52041

pI/MM Exp. - 6,0/57000

```

1  MRFLFFLFVA  VVHLFSLGSG  KAIYKSGVSQ  RTFQEIKEEI  ANYEDVAKAI
51  INLAVYGKYQ  NRSYERLGLL  VDTVGPRLSG  SKNLEKAIQI  MYQNLQQDGL
101 ENVHLEQVRI  PHWERGEESA  VMVVPRIHKL  AILGLGGSIG  TPPEGITAEV
151 LVVASFVELQ  RRASEARGKI  VVYNQPYTDY  GKTVQYRERG  AVEAAKVGAV
201 ASLIRSVASF  SIYSPHTGHQ  GYQDGVPKIP  TACITIEDAE  MMSRMASRGD
251 KIVIHLKMGA  KTYPDTSFN  TVAEITGSKY  PEEVVLVSGH  LDSWDVGQGA
301 LDDGGGAFIS  WEALSLVKDL  GLRPKRTLRL  VLWTAEEQGG  VGASQYYELH
351 KANISKYSLV  MEADSGTFLP  TGLQFTGSDK  ARAIMKEVMS  LLQPLNITKV
401 FNDAEGTDIN  FWIQAGVPGA  SLRDDLYKYF  FFHSHGDTM  TAMDPKQMNV
451 AAAVWAVVAY  VVADMEEMPL  RS

```

Proteína: Peroxiredoxin-2

Uniprot ID: P35704

pI/MM Teor. - 5,3/21783

pI/MM Exp. - 5,1/24000

```

1  MASGNAHIGK  PAPDFTGTAV  VDGAFFEIKL  SDYRGKYVVL  FFYPLDFTFV
51  CPTETIAFSD  HAEDFRKLGC  EVLGVSVDQS  FTHLAWINTP  RKEGGLGPLN
101 IPLLADVTKS  LSQNYGVLKN  DEGIAYRGLF  IIDAKGVLRQ  ITVNDLPVGR
151 SVDEALRLVQ  AFQYTDEHGE  VCPAGWKPGS  DTIKPNVDDS  KEYFSKHN

```

Proteína: Superoxide dismutase [Cu-Zn]

Uniprot ID: Q6LDS4

pI/MM Teor. - 5,8/15709

pI/MM Exp. - 5,7/100000

```

1  MKAVCVLKGD  GPVQGVHFE  QKASGEPVVV  SGQITGLTEG  EHGFHVHGYG
51  DNTQGCTTAG  PHFNPHSKKH  GGPADDERHV  GDLGNVAAGK  DGVANVSIED
101 RVISLSGEHS  IIGRTMVVHE  KQDDLKGGN  EESTKTGNAG  SRLACGVIGI
151  AQ

```

Proteína: Glutathione S-transferase

Uniprot ID: P14942

pI/MM Teor. - 6,2/25509

pI/MM Exp. - 7,0/27000

```

1  MEAKPKLYYF QGRGRMESIR  WLLATAGVEF  EEEFLETREQ  YEKLQKDGCL
51  LFGQVPLVEI  DGMLLTQTRA ILSYLAAKHN  LYGKDLKERV  RIDMHADGTQ
101 DLMMMIIGAP  FKAPQEKEES  CALAVRRAKT  GYFPVFEEKIL  KDHGEAFLVG
151 NQLSWADIQL  LEAILMXXXX  SAPXLSXFPL  LSFYVLVKVS  KWTRAIRNVM
201 AGTLEKQRCK  NLPEKRLIFL

```

Proteína: Aflatoxin B1 aldehyde reductase member 3

Uniprot ID: P38918

pI/MM Teor. - 6,8/36747

pI/MM Exp. - 7,6/38000

```

1  MSQARPATVL  GAMEMGRRMD VTSSSASVRA  FLQRGHTEID  TAFVYANGQS
51  ETILGDLGLG  LGRSGCKVKI  ATKAAPMFGK  TLKPADVRFQ  LETSLKRLQC
101 PRVDLFYLFH  PDHGTPIEET  LQACHHVHQE  GKFVELGLSN  YVSWEVAEIC
151 TLCKKNGWIM  PTVYQGMYN  ITRQVETELF  PCLRHFGLRF YAFNPLAGGL
201 LTGRYKYQDK  DGKNPESRFF GNPFSQLYMD  RYWKEEHFNG  IALVEKALKT
251 TYGPTAPSMI SAAVRWMYHH  SQLKGTQGDA  VILGMSSELE  LEQNLALVEE
301 GPLEPAVVDA  FDQAWNLVAH  ECPNYFR

```

Proteína: Hemoglobin subunit alpha-1/2

Uniprot ID: P01946

pI/MM Teor. - 7,8/15328

pI/MM Exp. - 9,3/14000

```

1  MVLSADDKTN  IKNCWGKIGG  HGGEYGEEAL  QRMFAAFPTT  KTYFSHIDVS
51  PGSAQVKAHG  KKVADALAKA ADHVEDLPGA  LSTLSDLHAH  KLRVDPVNFK
101 FLSSHCLLVTL  ACHHPGDFTP  AMHASLDKFL  ASVSTVLTSK  YR

```

Proteína: Fatty acid-binding protein, heart

Uniprot ID: P07483

pI/MM Teor. - 5,9/14774

pI/MM Exp. - 5,6/14000

```

1  MADAFVGTWK LVDSKNFDDY MKSLGVGFAT RQVASMTKPT TIIEKNGDTI
51  TIKTHSTFKN TEISFQLGVE FDEVTADDRK VKSVVTLDGG KLVHVQKWDG
01  QETTLTRELS DGKLILTLTH GNVVSTRTYE KEA

```

Proteína: 0 beta-2 globin

Uniprot ID: Q62670

pI/MM Teor. - 6,7/15979

pI/MM Exp. - 8,1/14000

```

1  MVHLTDAEKA TVNGLWGKVN PVEIGAESLA SLVIVYPWTQ RYFSKFGDLS
51  SVSAIMGNPQ VKAHGEKVIN AFDDGLKHLD NLKGTFFASLS ELHCDKLHVD
101 PENFRLLGNS IVIMMGHHLG KEFTPSAQAA FQKVVAGVAS ALAHKYH

```

Proteína: Major urinary protein (Alpha-2u-globulin)

Uniprot ID: P02761

pI/MM Teor. - 5,8/20736

pI/MM Exp. - 5,9/16000

```

1  LLLLLCLGLTL VCGHAEAEASS TSGNLDVAKL NGDWFSIVVA SNKREKIEEN
51  GSMRVFMQHI DVLENSLGFK FRIKENGECR ELYLVAYKTP EDGEYFVEYD
101 GGNTFTILKT DYDRYVMFHL INFKNGETFQ LMVLYGRTKD LSSDIKEKFA
151 KLCEAHGITR DNIIDLTKTD RCLQARG

```

Proteína: Serum albumin

Uniprot ID: P02770

pI/MM Teor. - 6,0/68730

pI/MM Exp. - 5,8/68000

```

1  MKWVTFLLLL FISGSFAFSRG VFRREAHKSE IAHRFKDLGE QHFKGLVLIA
51  FSQYLQKCPY EEHIKLVQEV TDFAKTCVAD ENAENCCKSI HTLFGDKLCA
101 IPKLRDNYGE LADCCAKQEP ERNECFQHK DDNPNLPPFQ RPEAEAMCTS
151 FQENPTSFLG HYLHEVARRH PYFYAPELLY YAEKYNEVLT QCCTESDKAA
201 CLTPKLDPAVK EKALVAAVRQ RMKCSSMQRF GERAFAKAWAV ARMSQRFPNA
251 EFAEITKLAT DLTKINKECC HGDLLCADD RAELAKYMCE NQATISSKLQ
301 ACCDKPVLQK SQCLAEIEHD NIPADLPSIA ADFVEDKEVC KNYAEAKDVF

```

351 LGTFLYEYSR RHPDYSVSL LRLAK**KYEAT** **LEK**CCAEGDP PACYGTVLAE
 401 FQPLVEEPKN LVKTNCELYE **KLGEYGFQNA** **ILVRYTQKAP** **QVSTPTLVEA**
 451 **ARN**LGRVGTK CCTLP EAQRL PCVEDYLSAI LNRLCVLHEK TPVSEKVTKC
 501 CSGSLVERRP CFSALTVD ET YVPKEFKAET FTFHSDICTL PDKEKQIKKQ
 551 TALAELVKHK PKATEDQLKT VMGDFAQFVD KCCKAADKDN CFATEGPNLV
 601 ARSKEALA

Proteína: Selenium-binding protein 1

Uniprot ID: Q8VIF7

pI/MM Teor. - 6,1/52532

pI/MM Exp. - 6,2/53000

1 MATKCTKCGP GYATPLEAMK GPREEIVYLP CIYRNTGIEA PDYLATVDVD
 51 PKSPHYSQVI HRLPMPHLKD ELHHS GWNTC SSCFGDSTKS RDK**LILPSII**
 101 **SSRIYVVDVG** **SEPR**APKLHK VIEPNEIHAK CNLGNLHTSH CLASGEVMIS
 151 SLGDPQGNKG **GGFVLLDGET** **FEV**KGTWEKP GGEAPMGYDF WYQPRHNIMV
 201 STEWAAPNVF KDGFNPAHVE AGLYGSHIHV WDWQRHEIIQ TLQMK**DGLIP**
 251 **LEIR**FLHDPD ATQGFVGCAL SSNIQRFYKN EGGTWSVEKV IQVPSKKVKG
 301 WMLPEMPGLI TDILLSLDDR FLYFSNLWLG DIRQYDISNP KKPR**LTGQIF**
 351 **LGG**SI**VK**GGS VQVLEDQELT CQPEPLVVKG KRVPGGPQMI QLSLDGKRLY
 401 VTTSLYSAWD KQFYPNLIRE GSVMLQIDVD TANGGLK**LNP** **NFLVDFGKEP**
 451 **LGPALAH**ELR YPGGDCSSDI WI

Proteína: EZRIN

Uniprot ID: P31977

pI/MM Teor. - 5,8/69390

pI/MM Exp. - 5,8/68000

1 MPKPINVRVT TMDAELEFAI QPNTTGKQLF DQVVKITIGLR EVWYFGLQYV
 51 DNKGFPPTWLK LDKKVSAQEV RKENPVQFKF RAKFY PEDVA DELIQDITQK
 101 LFFLQVKEGI LSDEIYCPPE TAVLLGSYAV QAKFGDYNKE MHK**SGYLSSE**
 151 **RLIP**QRVMDQ HKLSRDQWED RIQVWHAHR GMLK**DSAMLE** **YLK**IAQDLEM
 201 YGINYFEIKN KKGTDLWLGV DALGLNIYEK DDKLTPK**IGF** **PWSEIR**NISF
 251 NDKKFVIKPI DKK**APDFV**FY **APRL**RINKRI LQLCMGNHEL YMRRRKPDIT
 301 EVQQMKAQAR EEKHQKQLER QQLETEKKRR ETVEREKEQM LREKEELMLR
 351 LQDFEQKTKR AEKELSEQIE **KALQLEE**ERR RAQEEAERLE ADRMAALRAK
 401 EELERQAQDQ IKSQEQLAAE LAEYTAK**IAL** **LEEAR**RRKED EVEEWQHRAK
 451 EAQDE

Proteína: Tubulin alpha-4A chain**Uniprot ID: P68368****pI/MM Teor. - 4,9/49924****pI/MM Exp. - 6,4/44000**

```

1  MRECISVHVG QAGVQMGNAC WELYCLEHGI QPDGQMPSDK TIGGGDDSF
51  TFFCETGAGK HVPRAVFVDL EPTVIDEIRN GPYRQLFHPE QLITGKEDAA
101 NNYARGHYTI GKEIIDPVLD RIRKLSQCT GLQGFLVFHS FGGGTGSGFT
151 SLLMERLSDV YGKSKLEFS IYPAPQVSTA VVEPYNSILT THTTLEHSDC
201 AFMVDNEAIY DICRRNLDIE RPTYTNLNL ISQIVSSITA SLRFDGALNV
251 DLTEFQTNLV PYPRIHFPLA TYAPVISA AEK AYHEQLSVAE ITNACFEPAN
301 QMVKCDPRHG KYMACCLLYR GDVVPKDVNA AIAAIKTKRS IQFVDWCPTG
351 FKVGINYQPP TVVPGGDLAK VQRAVCMLSN TTAIAEAWAR LDHKFDLMYA
401 KRAFBVHWYVG EGMEEGEFSE AREDMAALEK DYE EVGIDSY EDEDEGEE

```

Proteína: Tubulin alpha-1C chain**Uniprot ID: Q6AYZ1****pI/MM Teor. - 4,9/49937****pI/MM Exp. - 5,0/54000**

```

1  MRECISIHVG QAGVQIGNAC WELYCLEHGI QPDGQMPSDK TIGGGDDSFN
51  TFFSETGAGK HVPRAVFVDL EPTVIDEVRT GTYRQLFHPE QLITGKEDAA
101 NNYARGHYTI GKEIIDLVLD RIRKLADQCT GLQGFLVFHS FGGGTGSGFT
151 SLLMERLSDV YGKSKLEFS IYPAPQVSTA VVEPYNSILT THTTLEHSDC
201 AFMVDNEAIY DICRRNLDIE RPTYTNLNL ISQIVSSITA SLRFDGALNV
251 DLTEFQTNLV PYPRIHFPLA TYAPVISA AEK AYHEQLTVAE ITNACFEPAN
301 QMVKCDPRHG KYMACCLLYR GDVVPKDVNA AIATIKTKRT IQFVDWCPTG
351 FKVGINYQPP TVVPGGDLAR VQRAVCMLSN TTAIAEAWAR LDHKFDLMYA
401 KRAFBVHWYVG EGMEEGEFSE AREDMAALEK DYE EVGADSA EGDDEGEEY

```

Proteína: Tubulin alpha-8 chain**Uniprot ID: Q6AY56****pI/MM Teor. - 4,9/50037****pI/MM Exp. - 4,6/55000**

```

1  MRECISVHVG QAGVQMGNAC WELYCLEHGI QPDGQMPSDK TIGGGDDSF
51  TFFCETGAGK HVPRAVFVDL EPTVIDEIRN GPYRQLFHPE QLITGKEDAA
101 NNYARGHYTI GKEIIDPVLD RIRKLSQCT GLQGFLVFHS FGGGTGSGFT
151 SLLMERLSDV YGKSKLEFS IYPAPQVSTA VVEPYNSILT THTTLEHSDC
201 AFMVDNEAIY DICRRNLDIE RPTYTNLNL ISQIVSSITA SLRFDGALNV
251 DLTEFQTNLV PYPRIHFPLA TYAPVISA AEK AYHEQLSVAE ITNACFEPAN
301 QMVKCDPRHG KYMACCLLYR GDVVPKDVNA AIAAIKTKRS IQFVDWCPTG
351 FKVGINYQPP TVVPGGDLAK VQRAVCMLSN TTAIAEAWAR LDHKFDLMYA
401 KRAFBVHWYVG EGMEEGEFSE AREDMAALEK DYE EVGIDSY EDEDEGEE

```

Proteína: Vimentin
Uniprot ID: P31000
pI/MM Teor. - 5,0/53732
pI/MM Exp. - 5,0/54000

```

1  MSTRSVSSSS YRRMFGGSGT SSRPSSNRSY VTTSTRTYSL GSALRPSTSR
51  SLYSSSPGGA YVTRSSAVRL RSSMPGVRL QDSVDFSLAD AINTEFKNTR
101 TNEKVELQEL NDRFANYIDK VRFLEQQNKI LLAELEQLKG QGKSRLGDLY
151 EEMRELRRQ VDQLTNDKAR VEVERDNLA E DIMRLREKLQ E EMLQREEAE
201 STLQSFQDV DNASLARLDL ERKVESLQEE IAFCLKLHDE EIQLQAQIQ
251 EQHVQIDVDV SKPDLTAALR DVRQQYESVA AKNLQEAEEW YKSKFADLSE
301 AANRNNDALR QAKQESNEYR RQVQSLTCEV DALKGTNESL ERQMREMEEN
351 FALEAANYQD TIGRLQDEIQ NMKEEMARHL REYQDLLNVK MALDIEIATY
401 RKLLEGEESR ISLPLPNFSS LNLRETNL E LPLVDTHSKR TLLIKTVETR
451 DGQVINETSQ HHDDLE

```

Proteína: Abhydrolase domain-containing protein 14B
Uniprot ID: Q6DGG1
pI/MM Teor. - 5,6/22617
pI/MM Exp. - 5,6/25000

```

1  MANVELSEGT IQVRGQSLFF REARPGNGQA VRFSVLLH G IRFSSETWQN
51  LGTLHRLAEA GYRAVAIDL P GLGRSKEAAA PAPIGELAPG SFLAAVVDAL
101 ELGSLVVIS P SLSGMYALP F LVAPESQLR G YVPVAPICTD KINAADYARV
151 KTPTLIVYGD QDPMGSSSFQ H LKQLPNHRV LVMEGAGHPC YLDKPDEWHT
201 GLLDLFLQELA

```

Proteína: Ribonuclease UK114
Uniprot ID: P52759
pI/MM Teor. - 7,8/14303
pI/MM Exp. - 8,2/14000

```

1  MSSIIKRVIS TSKAPAAIGA YSQA VLVDR T IYVSGQIGMD PSSGQLVPGG
51  VAEEAKQALK NLGEILKAAG CDFTNVVKTT VLLADINDFG TVNEIYKTYF
101 QGNLPA R AAY QVAALPKGSR IEIEAIAVQG PFTTAGL

```

Proteína: Elongation factor 1-alpha 1
Uniprot ID: P62630
pI/MM Teor. - 9,1/50113
pI/MM Exp. - 4,6/55000

```

1  MGKEKTHINI VVIGHVDSGK STTTGH LIYK CGGIDKR TIE KFEKEAAEMG
51  KGSFKYAWVL DKLKAERERG ITIDISLWKF ETSKYVYTII DAPGHRDFIK

```

101 NMITGTSQAD CAVLIVAAGV GEFEAGISKV GQTR**EHALLA** **YTLGVK**QLIV
151 GVNKMDSTEP PYSQKR**YEEI** **VKEVSTYIKK** IGYNPDHVAF VPISGWNGDN
201 MLEPSANMPW FKGWKVTRKD GSASGTTLLE ALDCILPPTR PTDKPLR**LPL**
251 **QDVYKIGGIG** **TVPVGRVETG** **VLKPGMVVTF** **APVNVTTTEVK** SVEMHHEALS
301 EALPGDNVGF NVKNVSVKDV RRGNVAGDSK NDPPMEAAGF TAQVIILNHP
351 GQISAGYAPV LDCHTAHIAC KFAELKEKID RRSKKLEDG PKFLKSGDAA
401 IVDMPGKPM CVESFSDYPP LGRFAVRDMR QTVAVGVKA VDKKAAGAGK
451 VTKSAQKAQK AK