



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PESCA

MARIA NÁGILA CARNEIRO MATOS

INVESTIGAÇÃO DO PERFIL PROTEÔMICO DE *Oreochromis niloticus* (TILÁPIA DO NILO): IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS RELACIONADAS AO ESTRESSE CAUSADO POR AMÔNIA.

FORTALEZA

2016

MARIA NÁGILA CARNEIRO MATOS

INVESTIGAÇÃO DO PERFIL PROTEÔMICO DE TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*): IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS RELACIONADAS AO ESTRESSE CAUSADO POR AMÔNIA

Tese de Doutorado apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, como parte de requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Engenharia de Pesca. Área de concentração: Biotecnologia e Genética de Recursos Aquáticos.

Orientador: Prof. Dr. Celso Shiniti Nagano

FORTALEZA

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Matos, Maria Nágila Carneiro.

Investigação do perfil proteômico de *Oreochromis niloticus* (Tilápia do Nilo) : Identificação de proteínas relacionadas ao estresse causado por amônia. / Maria Nágila Carneiro Matos. – 2016.

107 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2016.

Orientação: Prof. Dr. Celso Shiniti Nagano.

1. Tilápia. 2. Amônia. 3. Proteômica. 4. Biomarcadores. 5. Lectina. I. Título.

CDD 639.2

MARIA NÁGILA CARNEIRO MATOS

INVESTIGAÇÃO DO PERFIL PROTEÔMICO DE TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*): IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS RELACIONADAS AO ESTRESSE INDUZIDO POR AMÔNIA.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, como parte de requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Engenharia de Pesca. Área de concentração: Biotecnologia de Recursos Aquáticos.

Aprovada em: 26/08/2016

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Celso Shiniti Nagano (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Rodrigo Maranguape Silva da Cunha
Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA)

Prof. Dr. Alexandre Holanda Sampaio
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Mayron Alves de Vasconcelos
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. João Garcia Alves Filho
Faculdades Inta

A Deus,

Aos meus pais, Osterno e Maria Carneiro

Ao meu esposo Daniel

AGRADECIMENTOS

A DEUS pelo o dom da vida, por me conceder sabedoria, força, ânimo e fé para superar todos os obstáculos e por me proporcionar momentos de alegrias e felicidades.

Aos meus pais (José Osterno e Maria Carneiro) por todo o amor, carinho, educação e ensinamentos que me passaram, vocês são a razão da minha existência, amo incondicionalmente.

Ao meu esposo Daniel pelo seu apoio, amor, companheirismo e dedicação. Sou muito grata por ter sido paciente e ter compreendido a minha ausência durante esses anos, você é meu presente de DEUS.

Ao meu orientador, Celso Shiniti Nagano, pelos seus ensinamentos, orientação, confiança, compreensão, paciência e pelo exemplo de profissional que és.

Ao Prof. Gustavo Hitzschky Fernandes Vieira (*In memoriam*) pela orientação e acompanhamento dos primeiros passos dados na pesquisa científica, que DEUS o conceda junto dele.

Ao Prof. Rodrigo Maranguape Silva da Cunha por ter disponibilizado o NUBIS para a realização da análise proteômica, por seu apoio, amizade e ensinamentos.

Ao Prof. Marcelo Sá pela colaboração e por ter disponibilizado os peixes tilápia do Nilo para os experimentos de proteômica.

Ao Rômulo pelos ensinamentos, contribuição e disponibilidade sempre prestada para a conclusão desse trabalho.

Ao Prof. Edson Teixeira e Mayron Vasconcelos pelas atividades biológicas da lectina.

Aos estudantes Paulo e Lucas pela ajuda nas inúmeras amostras para digestão proteolítica.

A Gracy pela ajuda nas cromatografias e por sua amizade.

A Suzete pela amizade e ajuda sempre prestada.

Aos amigos do Biomar-Lab: Renata, Rômulo, Suzete, Gracy, Lucas, Paulo, André, Winnie, Hildi, Alexandra, Jefferson, Dayara, Renato, Túlio e David pelo apoio, amizade e pôr os dias de trabalho compartilhados.

Aos amigos do NUBIS: Katiane, Nyanne, Flávia, Paulo, Carlos, Rafael, Nívea e Erivan pela boa receptividade e pelos bons momentos de trabalho.

As minhas amigas-irmãs: Joice, Verônica, Mônica e Telma por me fazer conhecer o verdadeiro sentido de amizade, companheirismo, solidariedade, humildade, união e fraternidade. Sou muito feliz de ter pessoas como vocês ao meu lado, que se alegram e vibram a cada vitória conquistada.

Aos meus irmãos queridos: Antonia Lúcia, Marcleide, Reginaldo, Dágina, Daiane, Washington e Mateus pelo o afeto, apoio, unidade e companheirismo.

Aos meus sobrinhos que amo tanto: Luis Emanuel, Samily, Luis Gabriel, Isabely, Mirela, João Paulo, Milena, Maísa e Miguel pelos momentos de risadas e afeto.

Aos amigos queridos: Sâmia, Moemia, Raulzito, Ricardo, João Garcia, Daniel de Brito, Tatiana Maria, Cleane, Gleiciane, Simone, Clareane, Ivanice, Claudia, Luciana, Mayara Torquato, André, Nélia, Viviane e Wagner pelo apoio, ensinamentos, amizade e pelos bons momentos de descontração.

À CAPES pelo apoio financeiro.

À Universidade Federal do Ceará por contribuir na minha formação profissional.

Aos funcionários e professores do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca.

Enfim, a todas as pessoas que contribuíram direto ou indiretamente para a realização desse trabalho.

“O cientista não é o homem que fornece as verdadeiras respostas; é quem faz as verdadeiras perguntas”. (Claude Lévi-Strauss).

RESUMO

A investigação do proteoma é um componente essencial para fornecer informações acerca das proteínas envolvidas em estresses. O presente trabalho tem o objetivo de determinar possíveis alterações no perfil de expressão de proteínas induzidas por estresse com amônia, em tecido hepático e branquial de *Oreochromis niloticus* (Tilápia do Nilo) e identificar possíveis biomarcadores relacionados a esse estresse, bem como, isolar e caracterizar uma lectina identificada no tecido hepático de tilápia. Os peixes foram cultivados em sistema *outdoor* e divididos em dois grupos: grupo experimental (que não recebeu aeração mecânica) grupo controle (que recebeu aeração mecânica da água). Foram utilizados 10 peixes de cada grupo para análise proteômica. O perfil das proteínas foi obtido através da técnica de eletroforese bidimensional e a identificação por espectrometria de massas. Para o isolamento e caracterização da lectina foi utilizado peixes comercialmente disponíveis. A análise proteômica comparativa revelou alteração na expressão de 24 *spots* no fígado e 6 *spots* em brânquias do grupo experimental. Os *spots* diferencialmente expressos foram submetidos à análise de espectrometria de massas, com identificação resultante de 5 proteínas para fígado e nenhuma para brânquias. As proteínas com nível de expressão alterado no fígado estão envolvidas na estrutura celular, transdução de sinal, modificação proteica, metabolismo e transporte, as quais podem ser fortes candidatas a biomarcadores de estresse por amônia. Estas podem estar relacionadas à recuperação e proteção celular, evitando danos severos na célula. Esses resultados podem fornecer uma melhor compreensão sobre as proteínas que estão envolvidas na resposta ao estresse estudado. Também foi isolada uma lectina do fígado de tilápia a partir da combinação das cromatografias de afinidade e troca iônica, apresentando um peso molecular estimado por SDS-PAGE em 26 kDa, foi inibida com mais eficiência pelo açúcar 4-Nitrofenil β -Galactopiranosídeo, inibindo a atividade lectínica a uma concentração de 1.562 mM, exibiu toxicidade a náuplios de *Artemia sp* após 48 horas e apresentou interferência na formação de biofilmes nas concentrações de 31,25 e 62,5 $\mu\text{g/mL}$ para *Staphylococcus aureus* e de 125 e 250 $\mu\text{g/mL}$ para *Escherichia coli* e inibiu significativamente o número de células viáveis nas bactérias testadas.

Palavras Chaves: Tilápia. Amônia. Proteômica. Biomarcadores. Lectina

ABSTRACT

The investigation of the proteome is an essential component to provide information about the proteins involved in stress. This study aims to determine possible changes in the expression profile of proteins induced by stress with ammonia in liver and gill tissues of *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia) and identify potential biomarkers related to stress, as well, purify a lectin identified in the liver of tilapia. The fish were grown in outdoor system and divided into two groups: negative control (they received no mechanical aeration) positive control (which received mechanical aeration of water). 10 fishes from each group were used for proteomic analysis. The proteins profiles were obtained by two-dimensional electrophoresis and identified by mass spectrometry. Lectin was isolated from liver of commercially available fish. Comparative proteomic analysis revealed changes in the expression of 24 spots in the liver and 6 spots in the gills at the negative control. The differentially expressed spots were subjected to analysis of mass spectrometry, with resulting identification of 5 proteins for liver and in gills were not identified. The altered expression levels proteins in the liver are involved in cell structure, signal transduction, protein modification, metabolism and transport, which can be strong candidates for ammonia biomarkers stress. This may be related to the recovery and cell protection by preventing severe damage to the cell. These results may provide a better understanding of the proteins that are involved in the stress response studied. It has also been isolated lectin of tilapia liver from the combination of affinity and ion exchange chromatographies, having a molecular weight estimated by SDS-PAGE at 26 kDa, was inhibited more efficiently by the 4-Nitrophenyl β -Galactopironoside sugar, inhibiting the lectin activity at a concentration of 1,562 mM, exhibited toxicity at *Artemia* sp after 48 hours and showed interference in the formation of biofilms in concentrations of 31,25 and 62 5 μ g/mL for *Staphylococcus aureus* and 125 and 250 μ g/mL for *Escherichia coli* and inhibited significantly the number of viable cells in the tested bacteria.

Key words: Tilapia. Ammonia. Proteomics. Biomarkers. Lectin

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01-	Perfil de proteínas de brânquias de tilápia do Nilo através de 2-DE.....	37
Figura 02-	Perfil de proteínas de fígado de tilápia do Nilo através de 2-DE.....	38
Figura 03 -	Gráfico de dispersão das replicatas dos géis de brânquias do grupo experimental.....	39
Figura 04 -	Gráfico de dispersão das replicatas dos géis de brânquias do grupo controle	39
Figura 05 -	Gráfico de dispersão das replicatas dos géis de fígado do grupo experimental.....	40
Figura 06 -	Gráfico de dispersão das replicatas dos géis de fígado do grupo controle.....	40
Figura 07-	Distribuição do número médio de <i>spots</i> de acordo com ponto isoelétrico (pI) do grupo experimental (GE) e grupo controle (GC) em brânquias de tilápia do Nilo.....	41
Figura 08 -	Distribuição do número médio de <i>spots</i> de acordo com ponto isoelétrico (pI) do grupo experimental (GE) e grupo controle (GC) em fígado de tilápia do Nilo.....	41
Figura 09 -	Distribuição do número médio de <i>spots</i> em relação à massa molecular do grupo experimental (GE) e grupo controle (GC) em brânquias de tilápia do Nilo.....	42
Figura 10 -	Distribuição do número médio de <i>spots</i> em relação à massa molecular do grupo experimental (GE) e grupo controle (GC) em fígado de tilápia do Nilo.....	42
Figura 11 -	Proteínas diferencialmente expressas em fígado de tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) identificadas a partir de análise por espectrometria de massas (ESI/QUAD/TOF).....	54
Figura 12 -	Proteínas diferencialmente expressas em brânquias de tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) identificadas a partir de análise por espectrometria de massas (ESI/QUAD/TOF).....	57
Figura 13 -	Cromatografia de afinidade em matriz agarose-lactose.....	76
Figura 14 -	Cromatografia de troca iônica em matriz de DEAE Sephacel.....	77
Figura 15 -	Efeito do pH sobre a atividade hemaglutinante de ONL.....	79
Figura 16 -	Efeito da temperatura sobre a atividade hemaglutinante de ONL....	80
Figura 17 -	Eletroforese em gel de poliacrilamida a 15% na presença de SDS (SDS-PAGE).....	81

Figura 18 -	Estimativa da massa molecular por cromatografia de gel filtração	82
Figura 19 -	Efeito da ONL no crescimento planctônico das bactérias <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25175) e <i>Escherichia coli</i> (ATCC11303) em diferentes concentrações.....	83
Figura 20 -	Efeito da ONL na formação da biomassa de biofilmes (A) e do número de células viáveis (B) em <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25175) e <i>Escherichia coli</i> (ATCC11303) em diferentes concentrações.....	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Proteínas de brânquias de tilápia do Nilo, referentes ao grupo experimental identificadas por espectrometria de massas (ESI/QUAD/TOF).....	44
Tabela 2 -	Proteínas de fígado de tilápia do Nilo, referentes ao grupo experimental identificadas por espectrometria de massas (ESI/QUAD/TOF).....	50
Tabela 3 -	Inibição da atividade hemaglutinante por carboidratos e glicoproteína..	78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNOCS	Departamento Nacional de Obras Contra as Secas
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
pH	Potencial Hidrogeniônico
MPA	Ministério da Pesca e Aquicultura
NH ₃	Amônia
NAT	Nitrogênio Amoniacal Total
pK	Constante de Equilíbrio
Rh	Glicoproteínas Rhesus
ATP	Adenosina Trifosfato
NMDA	N-metil-D-aspartato
Ca ⁺²	Cálcio
NH ₄ ⁺	Íon Amônio
NO	Óxido Nítrico
2-DE	Eletroforese Bidimensional
MS	Espectrometria de Massas
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
IPG	Gradiente de pH Imobilizado
ESI	Ionização por Eletrospray
MALDI	Ionização/Dessorção a Laser Auxiliado por Matriz
Cu	Cobre
LCTA	Laboratório de Ciência e Tecnologia Aquícola
CaCO ₃	Carbonato de cálcio
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
O ₂ D	Oxigênio Dissolvido
CHAPS	Ciclohexilaminodimetilamônio Propano Sulfonato
DTT	Ditiotreitol
TCA	Ácido Tricloroacético
V	Volt
Vh	Volt-hora
IAA	Iodeacetamida
ACN	Acetonitrila

MASCOT	Matrix Science
kDa	kiloDalton
NCBI	National Center for Biotechnology Information
FDA	Fatores de Despolimerização da Actina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
PDI	Proteína Dissulfeto Isomerase
GST	Glutathione-S-Transferase
PPIase	Peptidil-prolil-cis-trans-isomerase
ConA	Concanavalina A
DRC	Domínio de Reconhecimento a Carboidratos
RBLs	Lectinas ligantes de Ramnose
NaCl	Cloreto de Sódio
NH ₄ OH	Hidróxido de Amônio
ONL	<i>Oreochromis niloticus</i> Lectin
TSA	Ágar Triptona Soja
UFC	Unidade Formadora de Colônia
DEAE	Dietilaminoetil
SDS-PAGE	Eletofórese em gel de poliacrilamida em presença de dodecil sulfato de sódio

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1 - PERFIL PROTEÔMICO DE TILÁPIA DO NILO (<i>Oreochromis niloticus</i>) SOB ESTRESSE DE AMÔNIA.....	17
1	INTRODUÇÃO.....	18
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	20
2.1	Produção de tilápia do Nilo no Brasil	20
2.2	Amônia em sistema de cultivo	21
2.2.1	<i>Toxicidade e efeitos da amônia em peixes.....</i>	23
2.3	Proteômica	27
2.3.1	<i>Análise proteômica em peixes</i>	28
3	OBJETIVOS	30
3.1	Objetivo Geral	30
3.2	Objetivo Específico	30
4	MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1	Animais Experimentais	31
4.2	Sistema de Cultivo	31
4.3	Extração de Proteínas.....	32
4.4	Eletroforese Bidimensional	33
4.5	Digestão proteolítica em gel e Identificação por Espectrometria de Massas.....	34
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
5.1	Qualidade da água de cultivo.....	36
5.2	Análise do perfil proteômico de brânquias e fígado de tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)	36
5.2.1	<i>Reprodutibilidade dos géis bidimensionais.....</i>	38
5.2.2	<i>Distribuição dos spots por ponto isoelétrico e massa molecular.....</i>	41
5.3	Perfil proteico de fígado de tilápia do Nilo.....	43
5.4	Perfil proteico de brânquias de tilápia do Nilo.....	49
5.5	Proteínas diferencialmente expressas em fígado de tilápia do Nilo.....	53
5.6	Proteínas diferencialmente expressas em brânquias de tilápia do Nilo.....	57
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	58
	CAPÍTULO 2 – Isolamento e caracterização parcial de uma lectina de fígado de tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>).....	59

1	INTRODUÇÃO.....	60
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	62
2.1	Lectinas.....	62
2.2	Lectinas Animais.....	63
2.3	Lectinas de Peixes.....	64
2.4	Lectinas da espécie <i>Oreochromis niloticus</i>	66
3	OBJETIVOS.....	67
3.1	Objetivo Geral.....	67
3.2	Objetivos Específicos.....	67
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	68
4.1	Coleta de tilápia do Nilo.....	68
4.2	Extração de proteínas totais do tecido hepático.....	68
4.3	Atividade Hemaglutinante.....	68
4.4	Inibição da atividade hemaglutinante por açúcares e glicoproteínas.....	69
4.5	Cromatografia de Afinidade em matriz de agarose-lactose.....	69
4.6	Cromatografia de troca iônica.....	69
4.7	Eletroforese e estimativa da massa molecular.....	70
4.8	Efeito do pH sobre a atividade hemaglutinante.....	70
4.9	Efeito do agente quelante (EDTA) sobre a atividade hemaglutinante.....	71
4.10	Efeito da temperatura sobre a atividade hemaglutinante.....	71
4.11	Determinação da massa molecular por espectrometria de massas.....	71
4.12	Sequenciamento de aminoácidos através da espectrometria de massas sequencial (MS/MS).....	72
4.13	Teste de toxicidade sobre náuplios de <i>Artemia</i> sp.....	73
4.14	Condições de cultivo dos micro-organismos.....	73
4.15	Atividade da lectina sobre o crescimento planctônico bacteriano.....	74
4.16	Ação da lectina sobre a formação de biofilme.....	74
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	76
5.1	Purificação da lectina.....	76
5.2	Atividade hemaglutinante e Inibição por açúcares.....	77
5.3	Efeitos do pH e da temperatura sobre a atividade hemaglutinante.....	79
5.4	Efeito do agente quelante (EDTA) sobre a atividade hemaglutinate.....	80
5.5	Eletroforese e estimativa da massa molecular.....	81
5.6	Ensaio da toxicidade sobre náuplios de <i>Artemia</i> sp.....	82

5.7	Ação da lectina sobre o crescimento planctônico bacteriano e a formação de biofilmes.....	83
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	87
	REFERÊNCIAS.....	88