

Avaliação de selênio em proteínas de amostras de plasma de tilápia do Nilo utilizando 2D PAGE-SRXRF-GFAAS

Fábio A. Silva (PG)¹, Renato de C. F. Neves (PG)¹, Marcelo A. O. da Silva (PG)², Felipe A. dos Santos* (PG)¹, Paula M. Lima (PG)¹, Marco A. Z. Arruda (PQ)^{2,4}, Pedro de M. Padilha (PQ)^{3,4}

1. UNESP-FMVZ-Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Botucatu-SP; 2. UNICAMP-Instituto de Química, Campinas-SP; 3. UNESP – Instituto de Biociências, Botucatu-SP; 4. INCT de Bioanalítica – IQ/UNICAMP, Campinas – SP. (*)santos_felipe1@yahoo.com.br

Palavras Chave: Selênio, metaloproteínas, 2D PAGE, SRXRF, GFAAS.

Introdução

Estima-se que aproximadamente 40% de todas as proteínas dos organismos vivos necessitam de um metal/metaloide para apresentar atividade biológica [1]. Dentre os elementos que apresentam forte ligação às proteínas, mais frequentemente, estão os metais de transição, como ferro, cobre, zinco, cobalto e como metaloide destaca-se o selênio. [1]. O selênio é um micronutriente presente nos tecidos do corpo. Estudos quali-quantitativos do selênio em proteínas do sangue e dos tecidos dos organismos vivos são importantes em relação à concentração relativa desse elemento para manter a atividade da glutatona peroxidase em vários tecidos [1,2]. Com base no exposto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar selênio em spots protéicos de amostras de plasma de tilápia do Nilo, separadas por 2D PAGE, utilizando SRXRF e GFAAS.

As amostras de plasma foram separadas do sangue por centrifugação em centrífuga refrigerada e tratadas com kits para remoção de albumina. Posteriormente as proteínas presentes na amostra foram precipitadas com acetona na proporção 1:4. Os precipitados foram solubilizados em tampão específico, aplicados em fitas de IOF com gel pré-fabricado com anfólitos imobilizados (pH 4 a 7). Depois de hidratadas por 12 h as fitas foram levadas ao sistema de IOF para corrida em primeira dimensão. Após essa etapa, as fitas foram equilibradas em tampão específico por 15 minutos e aplicadas em géis de poliácridamida a 10% m/v juntamente com padrões de massa molar, para corrida em segunda dimensão. Ao término das etapas de separações (feitas em triplicata), os spots protéicos foram fixados no gel e corados com Coomassie Blue. Em seguida, os spots foram recortados do gel e secos com lâmpada infravermelha para análise do selênio por SRXRF. Finalmente, os spots que apresentaram selênio foram mineralizados em forno de microondas para quantificação do analito por GFAAS.

Resultados e Discussão

A análise dos espectros de fluorescência obtidos por SRXRF indicaram selênio em três spots protéicos com massas molares de 30,14; 49,18

e 65,82 kDa e pontos isoelétricos igual a 6,82; 6,56 e 5,96 respectivamente. Nesse spots também foram detectados a presença de enxofre, o que sugere que essas proteínas apresentam cadeias laterais com grupos tióis (base mole), que apresentam grande afinidade por ácidos moles, como no caso, o selênio na forma R-Se⁺ [3]. Os valores das concentrações de selênio estão sumarizados na Tabela 1. Esses dados permitiram estimar a porcentagem de moléculas de proteínas contendo selênio e o número de átomos desse elemento por spot protéico, resultados também apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Concentração de selênio nos spots protéicos, estimativa da porcentagem de proteína contendo selênio e número de átomos de selênio por spot protéico.

Spot (kDa)	Se mg g ⁻¹	Moléculas de Proteínas (%)	Átomos de Se (10 ¹³)
30,14	4,15	190	1,80
49,18	3,74	370	3,50
65,82	0,72	315	2,90

Conclusões

Os resultados obtidos nas determinações de selênio por SRXRF e GFAAS permitem inferir que os spots protéicos de massa molar 30,14, 49,18 e 65,82 apresentam de 1 a 2 e de 3 a 4 átomos de selênio por molécula de proteína, respectivamente. Dessa forma, pode-se sugerir que esses spots protéicos são metaloproteínas ou proteínas de metal ligante.

Agradecimentos

FAPESP (Processo 59778-0), ao CNPq (Processos: 474371/2007-7 e 300302/2008-8) e ao LNLS.

¹ Garcia, J. S.; Magalhães, C. S.; Arruda, M. A. Z. *Talanta* **2006**, 69, 1.

² Haraguchi, H. *J. Anal. At. Spectrom.* **2004**, 19, 5.

³ Pearson, R.G. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 3533.