

Universidade de São Paulo
Instituto de Química de São Carlos

Sheila Barreto Guterres

**Busca de biomarcadores para
esquizofrenia em plaquetas utilizando
Eletroforese diferencial em gel
bidimensional (2D-DIGE) e
espectrometria de massas**

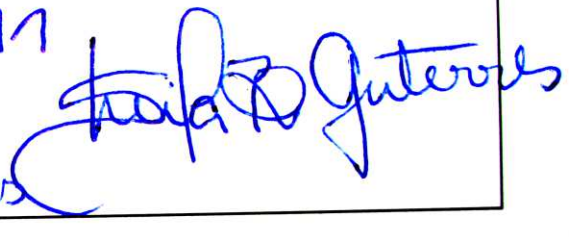
São Carlos
2011

Este exemplar foi revisado e alterado em relação à versão original, sob a exclusiva responsabilidade do autor.

São Carlos, 30 / 10 / 2011

Nome e Assinatura do Autor

Sheila Barreto Guterres



SHEILA BARRETO GUTERRES

**Busca de biomarcadores para esquizofrenia em
plaquetas utilizando Eletroforese diferencial em
gel bidimensional (2D-DIGE) e espectrometria
de massas**

Tese apresentada ao Instituto de Química
de São Carlos da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Doutor
em Ciências.

Área de Concentração: Química Analítica

Orientador: Prof. Dr. Emanuel Carrilho

São Carlos
2011

Dedico este trabalho com muito amor aos meus pais João e Maria Teresa, aos meus irmãos Carlos Alberto, Gilberto, Cláudia e Wagner e aos meus sobrinhos Jhony, Jhenifer e Nicolas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por dar o suporte fundamental para o início e o fim desse trabalho, pois sem a ajuda dEle nada teria sido realizado.

Agradeço a Deus pelas oportunidades, que são chances, convites ao trabalho com a recompensa da aquisição de conhecimento e experiência e que, por isso, exigem esforço. O esforço verdadeiro consome o corpo e a alma e, para mantê-lo, é necessário força.

Agradeço a Deus pela força que recebi para não desistir nos momentos em que o esforço parecia não adiantar ou quando as coisas não dependiam de mim, mas sim da vontade alheia. Mas depois do limiar da força, veio a exaustão.

Agradeço a Deus pelas pessoas maravilhosas que tenho em minha vida. Nos momentos de desânimo, quando prostrava minha cabeça, meus olhos se enchiam de lágrimas e nada mais conseguia me erguer, minha família e meus amigos me levantaram com o poder do amor, expresso através do carinho e da ternura que me faziam sentir amada, sentir que, independentemente do resultado, estariam comigo e isso me ajudou a continuar. Mostraram-me o lado positivo de tudo e que o esforço derradeiro, realizado nos momentos de exaustão, é que esculpe a nossa alma, deixando-a mais valorosa.

Com todo o meu esforço, toda a minha boa vontade, toda minha inteligência e capacidade, eu jamais conseguiria começar e terminar sem as dádivas de Deus: as oportunidades, a força e as pessoas maravilhosas que existem em minha vida. Depois dessa experiência, tenho absoluta certeza que ninguém conquista nada sozinho e que essas dádivas são estendidas a todos os seres humanos, que não existe ninguém melhor ou pior, mais ou menos merecedor.

Portanto, nos momentos de dúvidas vou olhar a vida de maneira mais ampla, para reconhecer as futuras oportunidades; nos momentos de dificuldade, ampliar a sensibilidade e a fé para sentir a força; e, em todos os outros momentos, amar meus familiares e amigos, pois eles são a expressão maior da bondade divina em minha vida.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Emanuel Carrilho, pela oportunidade de trabalho, confiança, amizade e a orientação.

Agradeço aos Prof. Dr. Wagner Farid Gattaz, Prof. Dr. José César Rosa, Prof. Dr. Mário Sérgio Palma, Prof. Dr. Otávio Thiemann, Prof. Dra. Andrea Schmitt, Prof. Dr. Christopher Gerner, Prof. Dr. Andreas Rizzi, Prof. Dr. Ivo Wolf, Dra. Maria Zellner e Prof. Dr. Gert Lubec pela valiosa colaboração e contribuição nesse trabalho.

Agradeço à FAPESP pelo apoio financeiro recebido através da bolsa de doutorado e de projetos de auxílio à pesquisa.

Agradeço à Agência Austríaca para Mobilidade e Cooperação Internacional na Educação, Ciência e Pesquisa (OeAD – Österreichischer Austauschdienst), pela bolsa concedida pelo Programa Ernest Mach.

Agradeço a Rejane Spiegelberg Planer e Guilherme Spiegelberg pela contribuição financeira doada ao trabalho.

Agradeço aos meus pais João Gonçalves Guterres e Maria Tereza B. Guterres, meus irmãos Carlos Alberto B. Guterres, Gilberto B. Guterres, Cláudia L. G. Guterres, Wagner B. Guterres, meus sobrinhos Jhony F. Guterres, Jhenifer F. Guterres e Nicolas Guterres e meus primos Lindomar B. Souza e Odonia B. Souza, pelo amor, carinho, compreensão e ajuda que foram fundamentais no decorrer de todo os meus estudos; por ser meus amores, alegrarem minha vida, aguentarem meus sermões e minhas chatices.

Agradeço aos meus amigos queridos: Arlete B. Ferreira, Yasuko Imasato, Brenno Amaro da Silveira Neto, Nayara Cavalcante, Carlos Siqueira Lima e Rafael Borro, os amigos do Projeto Criança, os amigos do Posto de Rua Eurípedes Barsanulfo, os amigos do Grupo do SEOB de quarta-feira e meu “Lehrer” Sebastian Poch, pelo carinho, amizade e sustentação nos momentos difíceis.

Agradeço aos meus queridos amigos Biômicos: Fayene Ribeiro, Jenifer Ferrenzini, Juliana Alberice, Juliane Borba, Karina Fraige, Maribel Funes, Nilson Antônio Assunção, Patrícia Eugênio, Regiane Travensolo, Rubiane Borba, Thiago Segatto e Thiago Mazzu, pela amizade, carinho, companheirismo, ajuda e diversão.

Agradeço aos queridos amigos que fiz em Viena: Hanna Leitner e Benjamim Kiefmann pelo convívio maravilhoso por todo o tempo em que estive lá. Rejane Spiegelberg, Josef Jackulak, Giza Hammerschmid, Márcio Guimarães, Ines e Lara Lombardi, Aldecy Papst, Natália, Guilherme Spiegelberg, Edmar e Carmen Teixeira, Simone Heinen e Reihard Wolfmayr, pela amizade e o carinho nos momentos difíceis.

Agradeço aos colegas do Laboratório de Bioanalítica, Microfabricação e Separações do IQSC e aos colegas do Laboratório de Cristalografia do IFSC pela amizade, ajuda e diversão.

Agradeço aos colegas do Platelab do Instituto de Fisiologia da Universidade Médica de Viena: Ellen, Michael, Roland, Sigrun, Bhuma, Mújgan e Andy e aos colegas do Laboratório de Proteômica do Instituto de Pesquisa do Câncer da Universidade Médica de Viena, Verena, Edith e Phillip, pela ajuda, os ensinamentos e a ótima convivência.

Agradeço às secretárias Vanessa Jarina, Maria Silvia de Guzzi Plepis e Andreia Cristina Cardozo de Moraes, que sempre trataram me com solicitude e gentileza.

RESUMO

A esquizofrenia é uma doença crônica, grave e incapacitante que afeta cerca de 24 milhões de pessoas em âmbito mundial. É caracterizada por uma desorganização no pensamento que prejudica a funcionalidade do indivíduo. Existem intervenções que são efetivas e contribuem para a diminuição da prevalência do transtorno, pois ajudam o portador a levar uma vida produtiva e integrada à sociedade, porém devem ser ministradas nos estágios iniciais da doença. No entanto, existe uma grande dificuldade em se diagnosticar a esquizofrenia precocemente devido à sua complexidade e às sutilezas dos seus sintomas apresentados antes do surgimento da psicose. O cérebro não é acessível a exames invasivos *in vivo* e por esse motivo a exploração de fluidos periféricos é de grande importância. As plaquetas e neurônios serotoninérgicos possuem características bioquímicas e morfológicas em comum que possibilitam a comparação entre a estrutura e a função de ambos e, por causa dessa similaridade, muitos trabalhos utilizam plaquetas como modelo para o estudo de doenças neuropsiquiátricas, inclusive a esquizofrenia. A detecção precoce da esquizofrenia é um objeto de investigação atual e relevante não somente para revolucionar os meios atuais de diagnóstico, mas também para desenvolver novos tratamentos aplicados aos estágios iniciais da doença, diferenciar os subgrupos de doentes e monitorar as intervenções preventivas. A proposta do presente trabalho é fazer o estudo da expressão de proteínas em plaquetas de pacientes esquizofrênicos e controles com o objetivo de identificar proteínas candidatas a biomarcadores utilizando técnicas proteômicas quantitativas e confiáveis, como 2D-DIGE e a espectrometria de massas.

ABSTRACT

Schizophrenia is a disabling, serious, and chronic illness, which affects about 24 million people worldwide. It is characterized by a severe disorganization of the thoughts that harms the social life of patients becoming them dependent of the family and/or government. There are effective treatments that contribute to decrease the prevalence of the disorder because they improve the life and social conditions of the patients, but they are only advantageous if the intervention is made in the early stages of the disease. It is difficult to obtain early diagnosis due to the complexity of the disease and its insidious symptoms before the beginning of the psychosis. The brain is not easily accessed in vivo and, because of this, it is very important to study the peripheral tissues like blood, which makes the use of the platelets very interesting. Furthermore, platelets and serotonergic neurons share biochemical and morphological characteristics that allows the comparison between structure and function of both. From these similarities many authors has used platelets as a neuron model to study many neurodegenerative diseases including schizophrenia. The early detection of schizophrenia is a current and suitable goal, not only to improve the early diagnosis but also to develop new treatments, differentiate the subtypes, and monitor the preventive interventions. The purpose of this project is to do a comparative screening of expressed proteins in platelets from schizophrenics and controls with the objective of finding differently expressed proteins that could be candidates to biomarkers using 2D-DIGE and mass spectrometry.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2DE ou 2D-PAGE – Eletroforese em Gel Bidimensional

2D-DIGE – Two Dimensional Differential Gel Electrophoresis

DPNT – Duração da Psicose não Tratada

PLA2 – Fosfolipase A2

iPLA2 – Fosfolipase A2 independente de cálcio

sPLA2 – Fosfolipase A2 secretada

cPLA2 – Fosfolipase A2 citosólica

IEF – Isoelectric Focusing

IEF-CA – Isoelectric Focusing – Carriers Ampholyte

CA – Carriers Ampholyte

IPG – Immobilized pH Gradient

GRAVY – Grand Average of Hydropathicity Index

SDS-PAGE – Polyacrylamide Gel Electrophoresis

SDS – Sodium Dodecyl Sulphate

CHAPS – 3-[(3-colamidopropil)dimetilamônio]-1-propanosulfonato

DTT – Dithiothreitol

TCA – Trichloroacetic Acid

MS – Mass Spectrometry

m/z – razão massa/carga

MALDI – Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization

ESI – Electrospray Ionization

APCI – Atmospheric Pressure Chemical Ionization

PTM – Posttranslational Modification

MudPIT – Multidimensional Protein Identification Technology

SRM – Selected Reaction Monitoring

MRM – Multiple Reaction Monitoring

PRP – Plasma Rico em Plaquetas

GFP – Gel Fitrated Platelets

ACD – Acid-Citrate-Dextrose buffer

PBS – Phosphate Buffered Saline

DIA – Differential in Gel Analysis

BVA – Biological Variation Analysis

PCA – Pricipal Component Analysis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: esquema que ilustra as etapas do desenvolvimento da doença.	15
Figura 2: Reação de hidrólise da ligação éster, na posição sn-2 (seta), de um glicerofosfolípideo catalisada pelas PLA2, gerando lisofosfolípideo e ácido graxo livre.	20
Figura 3: Representação esquemática das múltiplas isoformas da iPLA2, (A) grupo VIA-1, (B) grupo VIA-2 (C) grupo VIA-3, (D) grupo VIA ankirina-1, (E) grupo VIA ankirina-2.	26
Figura 4: representação esquemática de um espectrômetro de massas tipo triplo-quadrupolo.	45
Figura 5. Ilustração das etapas de análise em 2D-DIGE.	51
Figura 6: Fluxograma do fracionamento da matriz sanguínea.	61
Figura 7: Montagem do sistema de focalização para o gradiente de pH 6-9.	65
Figura 8: sanduíche montado para a transferência das proteínas do gel de focalização para a membrana, por difusão.	72
Figura 9: Gel bidimensional para amostra preparada com lise osmótica e concentração com centricon. Condições: IPG <i>strip</i> 3-10; rehidratação com a amostra; tampão normal; corado com <i>coomassie blue</i> .	78
Figura 10: Gel bidimensional para amostra preparada com lise com ultrassom e concentração com centricon. Condições: IPG <i>strip</i> 3-10; rehidratação com a amostra; tampão normal; corado com <i>coomassie blue</i> .	79
Figura 11: Gel bidimensional para amostra preparada com precipitação com acetona. Condições: IPG <i>strip</i> 3-10; reidratação com a amostra; tampão normal; corado com <i>coomassie blue</i> .	82
Figura 12: Gel bidimensional para amostra preparada com precipitação com etanol. Condições: IPG <i>strip</i> 3-10; reidratação com a amostra; tampão normal; corado com <i>coomassie blue</i> .	83
Figura 13: Gel bidimensional para amostra preparada com precipitação clorofórmio metanol. Condições: IPG <i>strip</i> 3-10; rehidratação com a amostra; tampão normal; corado com <i>coomassie blue</i> .	84
Figura 14: Gel bidimensional para amostra preparada com concentração com Centricon. Condições: IPG <i>strip</i> 3-10; reidratação com a amostra; tampão normal; corado com <i>coomassie blue</i> .	86
Figura 15: Gel bidimensional para amostra preparada com concentração com Amicon TM . Condições: IPG <i>strip</i> 3-10; reidratação com a amostra; tampão normal; corado com <i>coomassie blue</i> .	87
Figura 16: Gel bidimensional para amostra preparada com precipitação com acetona. Condições: IPG <i>strip</i> 3-10; reidratação com a amostra; tampão normal; corado com <i>coomassie blue</i> .	91
Figura 17: Gel bidimensional para amostra preparada com precipitação com acetona. Condições: IPG <i>strip</i> 3-10; <i>cup loading</i> anódico; tampão normal; corado com <i>coomassie blue</i> .	92
Figura 18: SDS-PAGE do lisado de plaquetas submetido a diferentes agentes precipitantes e separado em gel de poliacrilamida 8%.	94
Figura 19: SDS-PAGE de lisados de plaquetas provenientes dos 2 tipos de preparo, obtidos de diferentes agentes precipitantes e separado em gel de poliacrilamida 10%.	96

Figura 20: Na parte superior a fita n°. 76643 submetida à IEF, transferida por difusão para a membrana de nitrocelulose e incubada com o anticorpo anti-iPLA2 (Santa Cruz). Na parte inferior a imagem da mesma fita corada com coomassie após a transferência das proteínas para a membrana.	99
Figura 21: Membrana da fita n°. 76642 revelada com o anticorpo anti-iPLA2, transferida depois da realização da segunda dimensão.	100
Figura 22: Gel bidimensional para amostra preparada com precipitação com acetona. Condições: aplicação da amostra junto com a rehidratação da fita; IPG <i>strip</i> 3-10; tampão normal; corado com <i>coomassie blue</i> .	111
Figura 23: Gel bidimensional para amostra preparada com precipitação com acetona. Condições: aplicação da amostra via <i>cup loading</i> anódico; IPG <i>strip</i> 3-10; tampão de rehidratação modificado com isopropanol e glicerol; reposição de DTT no cátodo; corado com <i>coomassie blue</i> .	112
Figura 24: Membrana com as proteínas imobilizadas e identificadas com o anticorpo.	114
Figura 25: Membrana revelada com o anticorpo anti-iPLA2.	115
Figura 26: Gel de SDS-PAGE mostrando a pré-separação das proteínas extraídas das plaquetas obtidas e a secção das bandas analisadas.	116
Figura 27: Gel de SDS-PAGE mostrando as seguintes separações: tampão de lise 1 com Tween/NP-40 e lisado incubado com o anticorpo (1); tampão de lise 2 com SDS/Triton X-100 e lisado incubado com o anticorpo (2); tampão de lise 1 com Tween/NP-40 e proteína A/sepharose incubada com o anticorpo (3); tampão de lise 2 com SDS/Triton X-100 e proteína A/sepharose incubada com o anticorpo (4).	120
Figura 28: Resultado do western blot correspondente aos experimentos de imunoprecipitação.	120
Figura 29: SDS-PAGE A (lisado de plaquetas após a imunoprecipitação); B (lisado do tecido cerebral); C (lisado de plaquetas); D (lisado de tecido hepático).	121
Figura 30. Gel mestre das proteínas separadas no gradiente ácido 4 – 7.	125
Figura 31: Gel mestre das proteínas separadas no gradiente básico 6 – 9.	127
Figura 32: <i>Spots</i> que apresentaram alterações relevantes no gradiente de pH ácido, em preto os não identificados e em vermelho os identificados.	129
Figura 33. <i>Spots</i> que apresentaram alterações relevantes no gradiente de pH básico, em preto os não identificados e em vermelho os identificados.	131
Figura 34. Variação biológica no proteoma de plaquetas dos indivíduos participantes do estudo.	133
Figura 35. Expressão da MaO B nos grupos controle e esquizofrenia determinada nos experimentos de 2D-DIGE.	135
Figura 36. Análise dos componentes principais dos mapas de spots dos grupos controle e esquizofrenia.	136
Figura 37. Logaritmo da abundância padronizada dos <i>spots</i> correspondentes a peroxiredoxina-2 presentes em cada gel analisado em função dos grupos estudados.	137

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação geral das fosfolipases A2	22
Tabela 2: Preparo das amostras para a análise em gradiente de pH de 4 – 7	64
Tabela 3: Preparo das amostras para a análise em gradiente de pH de 6 – 9	66
Tabela 4: Dados de sexo, idade, tabagismo, contagem de plaquetas e proteína total das amostras de pacientes	123
Tabela 5: Dados de sexo, idade, tabagismo, contagem de plaquetas e proteína total das amostras de controles saudáveis	124
Tabela 6: <i>Spots</i> que apresentaram alterações relevantes no gradiente de pH ácido.	128
Tabela 7: <i>Spots</i> que apresentaram alterações relevantes no gradiente de pH básico.	130
Tabela 8: Proteínas com abundância diferenciada e identificadas por espectrometria de massas, processos biológicos do qual fazem parte, tipo de regulação relatada na literatura em tecido cerebral e regulação encontrada nas amostras de plaquetas que foram analisadas.	132

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Esquizofrenia	13
1.2 Busca de biomarcadores para a esquizofrenia em plaquetas	16
1.3 Alteração da atividade fosfolipase A2 (PLA2) e a esquizofrenia	19
1.4 Objetivos	28
2 ANÁLISE PROTEÔMICA	29
2.1 Sistemas multidimensionais	33
2.2 Eletroforese em gel bidimensional	35
2.3 Espectrometria de massas	44
2.4 Análise proteômica quantitativa	49
3 MÉTODOS EXPERIMENTAIS	57
3.1 Recrutamento de pacientes e controles	57
3.2 Coleta do sangue de isolamento das plaquetas	58
Lavagem de plaquetas – método 1	58
Lavagem de plaquetas – método 2	59
Cromatografia de exclusão por tamanho – método 3	59
3.3 Preparo da amostra para 2DE	61
Precipitação de proteínas das plaquetas com TCA	61
Solubilização do precipitado em uréia buffer	62
Marcação das amostras com os corantes fluorescentes Cydye™	62
3.4 Focalização isoelétrica	63
Gradiente de pH imobilizado 4 – 7	63
Gradiente de pH imobilizado 6 – 9	65
3.5 2D-PAGE	67
3.6 Tratamento dos dados de imagens	67
3.7 1D-PAGE para a análise de Shotgun	68
3.8 Procedimento de coloração com prata compatível com MS	68
3.9 Digestão enzimática	69
3.10 Análise de espectrometria de massas	69
3.11 Homogeneização do tecido cerebral	70
3.12 Imunoprecipitação	71
3.13 Eletrotransferência e transferência por difusão	72
3.14 Western Blot	73

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	74
4.1 Determinação do método de isolamento de plaquetas	74
4.2 Otimização do preparo de amostra e IEF	76
4.2.1 Métodos de lise	77
4.2.2 Métodos de concentração das proteínas	80
4.2.3 Otimização da IEF na região básica	89
Modos de aplicação de amostra	89
4.3 Avaliação da solubilização das proteínas de interesse	93
4.4 Eletroforese em gel bidimensional e imunodeteção com anti-iPLA2	97
Modificação da solução de reidratação	110
4.5 Análise das proteínas extraídas das plaquetas utilizando shotgun	116
4.6 Estabelecimento de um método de isolamento de iPLA2 utilizando imunoprecipitação	118
4.7 Análise proteômica de plaquetas usando 2D-DIGE	123
5 CONCLUSÕES	141
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	143
APÊNDICE I: documentação do processo de coleta das amostras	153
APÊNDICE II: protocolos de preparo das soluções utilizadas as análises de 2DE	156
APÊNDICE III: Contribution of hydrophobic interactions to the stability of the globular conformation of proteins.	163

1 INTRODUÇÃO

Os transtornos neuropsiquiátricos possuem uma alta prevalência em todo o mundo e estima-se que 450 milhões de pessoas sofram de algum tipo de transtorno.¹ Entre os transtornos mais comuns podemos citar: depressão, esquizofrenia, doença de Alzheimer, epilepsia, retardo mental, transtorno de abuso de substâncias, transtornos da infância e adolescência.²

A grande problemática em torno das doenças psiquiátricas é a pouca informação que se tem sobre o funcionamento cerebral devido a sua enorme complexidade. Na tentativa de entender e esclarecer possíveis mecanismos desencadeadores das síndromes, várias áreas do conhecimento, tais como a genética, a bioquímica e a química, se entrelaçaram proporcionando o grande avanço que a neurociência molecular tem alcançado. Embora o progresso no entendimento da bioquímica cerebral seja grande, as causas do surgimento e da progressão das doenças ainda estão muito longe de serem esclarecidas. Além de não se ter conhecimento dos mecanismos desencadeadores dessas doenças, o diagnóstico precoce é um desafio que também ainda persiste.

Vários fatores contribuem para a complexidade da identificação precoce das enfermidades psiquiátricas, entre esses, podemos citar: *i*) a ausência de testes biológicos laboratoriais objetivos e específicos, pois atualmente, os critérios de diagnóstico são baseados em relatos subjetivos do paciente e em observações comportamentais feitas por especialistas na área da psiquiatria, *ii*) a presença de comorbidades, ou seja, a sobreposição de mais de um transtorno mental como transtornos do humor acompanhados dos transtornos de ansiedade e, *iii*) a própria

complexidade dos transtornos mentais, pois muitos são resultantes da interação de genes alelos, comuns em múltiplos *loci*.

A deficiência no diagnóstico gera consequências sérias como o subdiagnóstico e, conseqüentemente, o subtratamento. O equívoco e a não observação do panorama completo da doença são grandes obstáculos para que o portador não desista do tratamento e tenha um bom prognóstico. Adicionalmente, existe um preconceito grande em relação às doenças mentais justamente por não terem um diagnóstico objetivo que possa quantificar o grau de alteração do estado de saúde mental do portador. Muitas vezes, os sintomas das doenças são interpretados como má índole, própria da personalidade do indivíduo, sendo este, muitas vezes, rotulado como fraco, preguiçoso, abusado, desorganizado, inconveniente, etc., ocasionando um acréscimo de sofrimento ao doente.³

1.1 Esquizofrenia

A esquizofrenia é uma doença frequentemente crônica, grave e incapacitante. Cerca de 1% da população desenvolve esquizofrenia ao longo da vida. A incidência da esquizofrenia não segue um padrão específico, ou seja, é observada igualmente em qualquer sexo, raça ou condição social. Sabe-se que a doença se manifesta mais cedo em homens, entre o final da adolescência e início da fase adulta, enquanto que em mulheres o surgimento ocorre por volta dos trinta anos. Apesar de a incidência ser baixa (30/100.000), possui uma alta prevalência (proporção de casos existentes, tanto novos quanto antigos) devido a sua cronicidade. Segundo a Organização Mundial de Saúde vinte e quatro milhões de pessoas no mundo são afetadas pela esquizofrenia, sendo que mais de 50% não

recebem o tratamento adequado e, desse montante, 90% vivem nos países em desenvolvimento.⁴

É um transtorno tratável, cujo tratamento é mais efetivo no estágio inicial da doença. Os tratamentos disponíveis podem aliviar muitos sintomas, mas a maioria dos esquizofrênicos continua a sofrer com alguns deles para o resto da vida. Estima-se que não mais que um em cada cinco indivíduos se recupere completamente.

Vários estudos afirmam que a detecção precoce da esquizofrenia é uma abordagem bastante promissora para um tratamento mais eficaz, que possa reduzir a sua prevalência.^{5,6} Existem intervenções farmacológicas e psicossociais que são efetivas e contribuem para a diminuição da prevalência do transtorno, pois ajudam o portador a levar uma vida produtiva e integrada à sociedade, porém devem ser ministradas nos estágios iniciais da doença. No entanto, existem dificuldades para diagnosticar a esquizofrenia nos estágios iniciais devido a sua complexidade e às sutilezas dos seus sintomas apresentados antes do surgimento da psicose.⁷ Para melhor conceituar em quais fases o diagnóstico é considerado precoce a Figura 1 mostra um esquema dos estágios da doença.

Muitos pacientes que desenvolvem a esquizofrenia passam por um estágio inicial com sintomas prodromais não psicóticos (sintomas apresentados no começo da doença), variáveis e não específicos, antes do início da psicose. Além disso, entre o surgimento da psicose e o início do tratamento médico existe um intervalo de tempo denominado DPNT (duração da psicose não tratada). Esse período é longo, de 1 a 2 anos, e variável para cada paciente. Vários estudos correlacionam a extensão da DPNT com um pior prognóstico, ou seja, quanto menor esse intervalo de tempo, melhores são as respostas do paciente ao tratamento e menos danosas são as sequelas da doença.^{8, 9, 10}

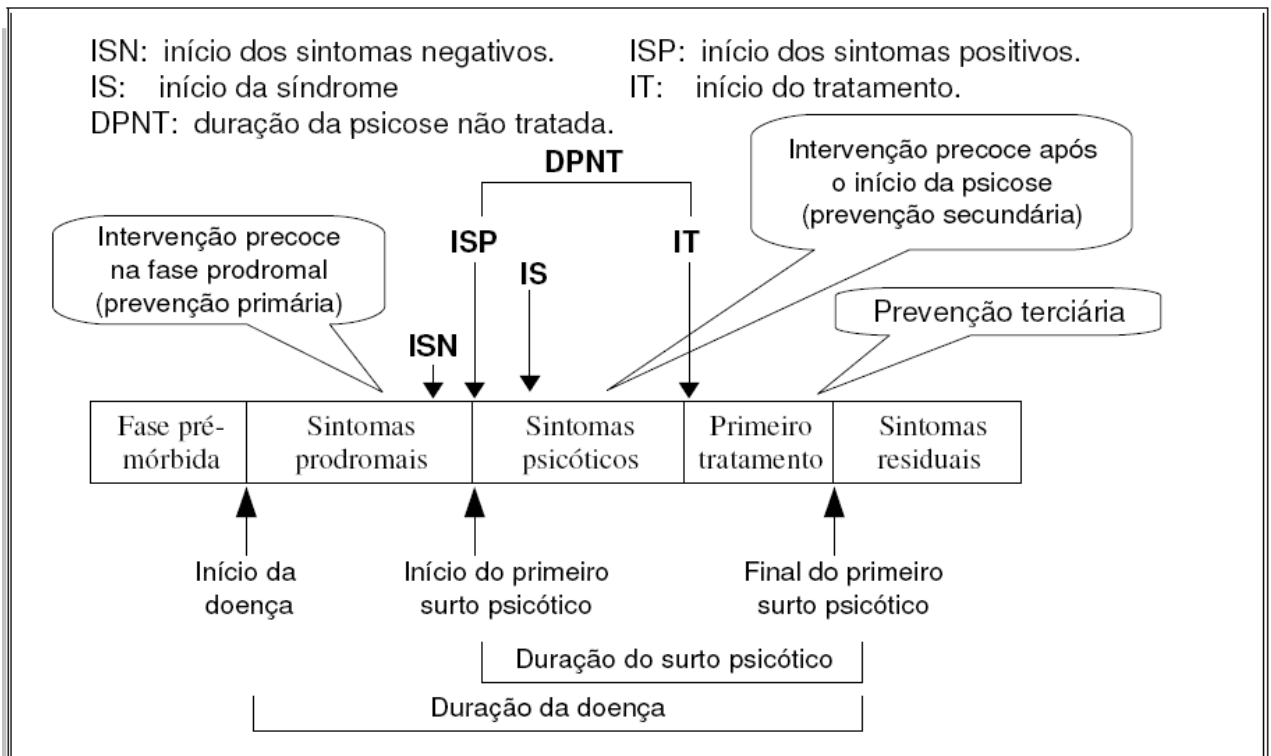


Figura 1: esquema que ilustra as etapas do desenvolvimento da doença.⁵

Considerando o tempo da fase inicial e a DPNT podemos ter um atraso no início do tratamento que pode variar de 2 a 4 anos ou mais, dependendo do grau de esclarecimento das pessoas que convivem com o doente. Outro fator que dificulta e aumenta a demora no diagnóstico convencional é a presença de comorbidades. A psicose e outros sintomas complexos da esquizofrenia podem ser observados em outras enfermidades psiquiátricas, sendo necessária uma observação clínica antes do início do tratamento, o que aumenta a DPNT até que o diagnóstico correto seja estabelecido.

A psicose causa um efeito deletério no cérebro e não se sabe ao certo como é esse mecanismo. Alguns autores defendem que ela é neurotóxica, outros argumentam que ela provoca a diminuição na conectividade das sinapses, o que explicaria o aparecimento dos déficits cognitivos sem uma lesão aparente quando como se observa na análise cerebral *post mortem*.¹¹ Independentemente de como a

psicose danifica o cérebro, ela deve ser tratada tão logo se manifeste com o objetivo de impedir a deterioração irreversível das capacidades psíquicas e cognitivas do portador e, assim, evitar a cronicidade da doença. Portanto, a intervenção medicamentosa administrada precocemente é a melhor abordagem para combater o avanço dos deficits cognitivos provocados pela esquizofrenia.

Como observado na Figura 1, duas estratégias de tratamento podem ser utilizadas: a intervenção na fase prodromal ou no início da fase psicótica. As medidas preventivas na fase prodromal são primárias, ou seja, universais, destinadas a todas as pessoas ou a grupos com alto risco de desenvolvimento da doença. Já na fase psicótica, a intervenção precoce seria iniciar o tratamento assim que a psicose fosse constatada. Essa medida diminuiria o período DPNT e, assim, poderia reduzir a prevalência da doença. Na grande maioria dos casos, o tratamento é dado após o desenvolvimento da psicose e, ainda, com um longo período DPNT, pois um dos critérios recomendados para o diagnóstico da psicose é a observação dos sintomas positivos (delírios, alucinações e desordens cognitivas e de linguagem).^{7,12}

1.2 Busca de biomarcadores para a esquizofrenia em plaquetas

Além da complexidade da evolução da doença, o diagnóstico é baseado no exame do estado mental do indivíduo, usualmente realizado através de entrevistas clínicas e a observação do comportamento do paciente, tornando-se difícil e demorado. A detecção precoce da esquizofrenia é um tema atual, relevante e que motiva o grande número de publicações dedicadas à busca de biomarcadores em matrizes biológicas de pacientes esquizofrênicos.^{13,14} Não somente para detectar

precocemente a doença e revolucionar os meios atuais de diagnóstico, mas também para desenvolver novos tratamentos aplicados aos estágios iniciais da doença, diferenciar os subgrupos da doença e monitorar as intervenções preventivas de maneira que não é possível fazer atualmente.¹⁵

O cérebro não é uma opção acessível a exames invasivos *in vivo*, exceto em casos graves, como câncer. Isso dificulta a investigação dos mecanismos patológicos relacionados às doenças que o afetam, pois não é possível fazer análises bioquímicas acompanhando a evolução das doenças. A expressão proteômica é um processo dinâmico e varia de acordo com as condições ambientais e a interação do organismo com o meio. As informações obtidas a partir das análises *post mortem* são relacionadas ao período próximo à morte, e no caso da esquizofrenia que se manifesta na juventude e muitos doentes morrem mais velhos, estas informações não podem ser extrapoladas para o curso global da doença.

Por essa razão, a tendência atual do estudo de doenças relacionadas ao cérebro é a exploração de fluidos periféricos como plasma, fluido cérebro espinhal, células do sangue, etc com o intuito de selecionar perfil de abundância proteica diferenciados em doentes, que possam ser usados como uma “impressão digital” do processo patológico.

A matriz sangüínea tem sido uma das preferidas, pois o sangue entra em contato com quase todas as células do corpo, direta ou indiretamente, recebendo os seus catabólitos, transportando moléculas sinalizadoras e proteínas específicas de tecidos danificados ou de células mortas e, também, por sua coleta ser menos invasiva do que a do fluido cérebro espinhal.¹⁶

As plaquetas circulam no sangue e são originadas durante a maturação dos megacariócitos na medula óssea quando mudanças altamente estruturadas ocorrem

no citoesqueleto dessa célula e provocam a sua fragmentação.¹⁷ São fragmentos celulares anucleados e não possuem DNA, porém, tem mRNA's e, quando ativadas, os utiliza para sintetizar proteínas específicas relacionadas ao processo de coagulação.

Outra característica interessante das plaquetas em relação ao seu uso em análise proteômica é que podem ser obtidas em grandes quantidades a partir de volumes pequenos de sangue. Em 100 mL, aproximadamente 2×10^{10} plaquetas podem ser extraídas, resultando uma massa de proteína total em torno de 16-24 mg, dependendo do método de extração. A quantidade de proteína necessária para uma separação em um gel de alta resolução é da ordem de microgramas, assim pequenas quantidades de sangue são suficientes para os experimentos proteômicos utilizando plaquetas.¹⁸

As plaquetas e neurônios serotoninérgicos possuem características bioquímicas e morfológicas em comum que possibilitam a comparação entre a estrutura e a função de ambos e, por causa dessa similaridade, muitos trabalhos utilizam plaquetas como modelo para o estudo de doenças neuropsiquiátricas, inclusive a esquizofrenia.¹⁹⁻²² Existem evidências de que alterações no sistema nervoso central de esquizofrênicos se estendem às regiões periféricas como as células do sangue e plasma.^{23,24}

Com base nas hipóteses de alteração do metabolismo de energia cerebral e disfunção da mitocôndria, relatadas em estudos anteriores^{25,26}, Dror et al.²⁷ estudaram a atividade do complexo mitocondrial I em plaquetas de esquizofrênicos e detectaram a alteração na atividade do complexo I, associando o aumento da atividade com os sintomas psicóticos, enquanto que a sua diminuição foi observada em pacientes com esquizofrenia residual.

Dietrich-Muszalska et al.²⁸ avaliaram o estresse oxidativo em plaquetas de esquizofrênicos através da medida da atividade da superóxido dismutase (SOD) por quimiluminescência. Identificaram um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio/nitrogênio e uma significativa diminuição da atividade SOD em doentes. Consecutivamente, os autores sugeriram que essas espécies reativas de oxigênio e nitrogênio além de causarem danos nos lipídios de membrana provocam a modificação de proteínas presentes nas plaquetas de doentes.²⁹

Zucker et al.³⁰ relataram uma grande densidade do transportador de monoaminas vesicular em plaquetas de esquizofrênicos. Esse transportador tem atuação importante na acumulação e liberação de monoaminas nas sinapses. Esses são apenas alguns exemplos de estudos que relacionam alterações proteicas em plaquetas com a esquizofrenia, e portanto dão suporte as hipóteses desta tese.

1.3 Alteração da atividade fosfolipase A2 (PLA2) e a esquizofrenia

As fosfolipases A2 (PLA2) são um grupo de enzimas ubíquas e muito importantes em vários processos celulares, principalmente no metabolismo dos lipídeos. A principal função dessas enzimas é a catálise da reação de hidrólise da ligação éster, na posição sn-2 dos glicerofosfolípídeos de membrana, a qual produz ácidos graxos livres e lisofosfolípídeos (Figura 2). Esta reação é particularmente importante se o ácido graxo produzido é o ácido araquidônico, que é um mensageiro secundário e precursor de vários compostos lipídicos bioativos como os eicosanóides (prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos), os quais são potentes mediadores nos processos inflamatórios e transdutores de sinais entre as células.³¹

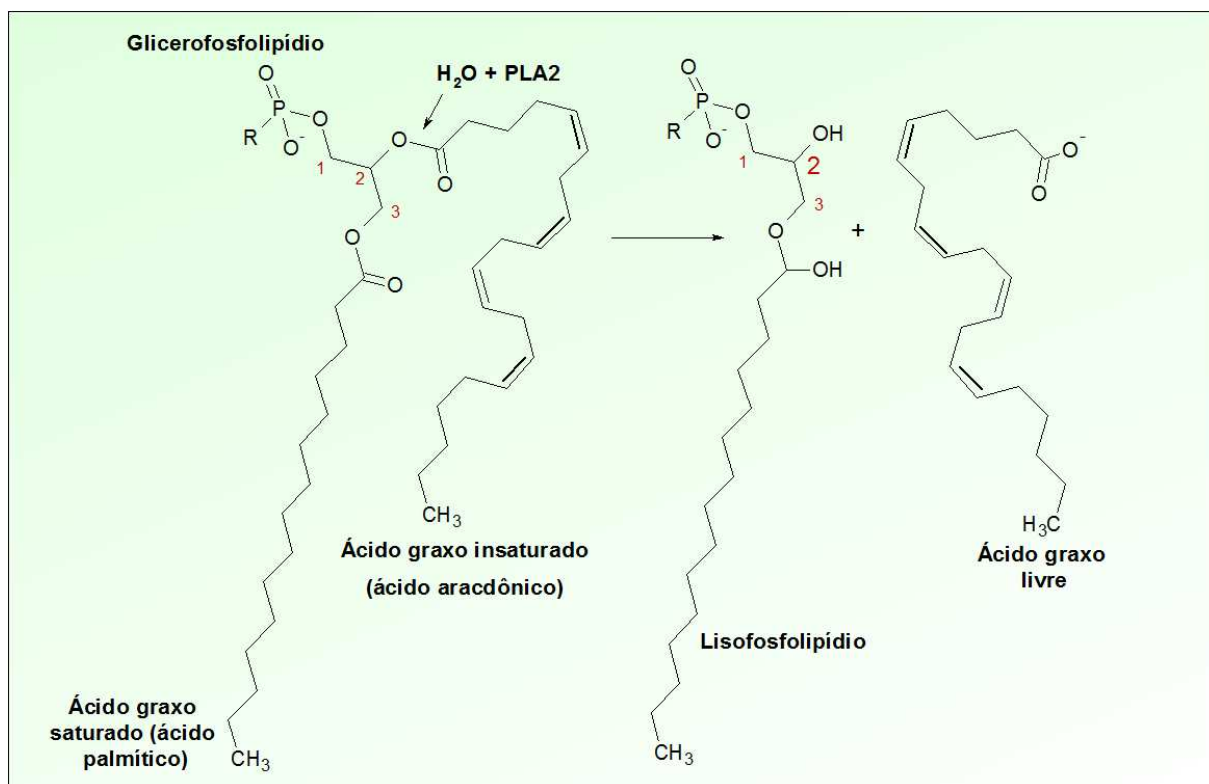


Figura 2: Reação de hidrólise da ligação éster, na posição sn-2 (seta), de um glicerofosfolípido catalisada pelas PLA2, gerando lisofosfolípido e ácido graxo livre.³²

Os outros produtos da reação, os lisofosfolípidos, representados pelo ácido lisofosfatídico e lisofosfatidilcolina, são muito importantes na sinalização celular, no remodelamento dos fosfolípidos, na reconstrução das membranas plasmáticas e são precursores de outros mediadores igualmente importantes, como o fator ativador de plaquetas.³³

Essa família de enzimas é dividida em grupos e subgrupos. O principal critério para incluir uma enzima nessa família é capacidade de catalisar a hidrólise da ligação éster, na posição sn-2, de um substrato fosfolípido. Satisfazendo esta exigência, elas são agrupadas pela seqüência de aminoácido da proteína madura e as suas homologias. Variantes de *splicing* de um mesmo gene de uma PLA2 é considerada outra PLA2 do mesmo subgrupo. A classificação geral de todas as PLA2 descritas na literatura está apresentada na Tabela 1, classificadas de acordo

com os sítios catalíticos, usando a histidina ou a serina, respectivamente.³⁴ É interessante notar que, todas as PLA2 clivam a ligação éster sn-2 dos glicerofosfolípidos, porém, os mecanismos de clivagem são distintos.

A reação de hidrólise catalisada pela PLA2 é a etapa limitante de velocidade para a produção de uma série de mediadores pró-inflamatórios lipídicos. A sua desregulação altera o metabolismo dos lípidos, perturbando várias rotas de síntese e, conseqüentemente, desestruturando a membrana plasmática dos neurônios, dando início a neurodegeneração.

As funções e a plasticidade do cérebro são profundamente influenciadas pelas propriedades físico-químicas da membrana neuronal. Esta membrana é formada por uma dupla camada de fosfolípidos, que forma uma matriz, na qual se inserem receptores, canais iônicos e outras proteínas envolvidas na transdução de sinais inter e intracelulares. A estrutura da membrana determina a sua fluidez, influencia o número e a afinidade dos receptores ligados a ela, e modula os processos de transdução de sinais. Adicionalmente, os próprios fosfolípidos servem também como substrato para a síntese de mediadores inter- e intra-celulares, aumentando sua relevância para a neurotransmissão.

Tabela 1: Classificação geral das fosfolipases A2.^{34, 35}

Grupos	Subgrupos	Fontes mais comuns	Tamanho (kDa)
I	A	Veneno de cobra	13
	B	Pâncreas de mamíferos	16
II	A	Fluido sinovial humano, plaquetas de cascavel	16
	B	Veneno de víbora	12-13
	C	Testículos ratos/camundongos	17
	D	Baço/pâncreas, humanos e camundongos	16
	E	Cérebro/coração/útero, humanos/camundongos	16
	F	Testículos e embriões de camundongos.	19
III		Abelha/lagarto/escorpião/humanos	19
IV	A (cPLA2 α)	Células humanas U937, plaquetas RAW 264,7, rins de rato	85
	B (cPLA2 β)	Pâncreas, fígado, coração e cérebro humanos	114
	C (cPLA2 γ)	Músculos esqueléticos e cardíacos humanos	61
	D (cPLA2 δ)	Humanos/camundongos	92-93
	E (cPLA2 ϵ)	Camundongos	100
	F (cPLA2 ζ)	Camundongos	96
V		Coração/pulmão humanos, macrófagos	16
VI	A-1 (iPLA2)	Macrófagos P388D1, CHO	84
	A-2 (iPLA2- β)	Testículos e linfócitos B humanos	90
	B (iPLA2- γ)	Músculos esqueléticos e cardíacos humanos	88
	C (iPLA2- δ)	Humanos/camundongos	146
	D (iPLA2- ϵ)	Humanos	53
	E (iPLA2- ζ)	Humanos	57
	F (iPLA2- η)	Humanos	28
VII	A (PAF-AH)	Plasmas de humanos, bovinos, porcos e camundongos	45
	B (PAF-AH - II)	Fígado e rim humano e bovino	40
VIII	A (PAF-AH Ib α 1)	Cérebro humano	26
	B (PAF-AH Ib α 2)	Cérebro humano	26
IX		Veneno de caracol (conodipina-M)	9
X		Baço/timo/leucócito humanos	18
XI	A	<i>Green rice shoots</i> (PLA2-I)	15
	B	<i>Green rice shoots</i> (PLA2-II)	17
XII		Humano/camundongo	19
XIII		Parvovírus	< 10
XIV		Fungo simbiótico/bactérias	13-19
XV		Humanos/bovinos/camundongos	45

A perda de fosfolipídeos essenciais da estrutura da membrana gera acúmulos de ácidos graxos livres, diacilglicerídeos, lisofosfolipídeos e fator ativador de plaquetas. Os três primeiros atuam como detergentes potentes capazes de lisar

as células neuronais. Além disso, podem alterar o processo de fosforilação oxidativa e provocar mudanças na permeabilidade da membrana pela regulação dos canais iônicos. O acúmulo de ácidos graxos livres pode desencadear um descontrole na cascata de reações que envolvem o ácido araquidônico, provocando o aumento da produção de radicais livres que causam a peroxidação de lipídeos insaturados e danos nas proteínas de membrana. Esses estragos ocasionam uma reação química cruzada entre as proteínas danificadas e lipídeos oxidados, resultando na redução do conteúdo de lipídeos insaturados da membrana. Como o grau de insaturação determina a sua fluidez, essa redução torna a membrana mais rígida, o que provoca mudanças na atividade de enzimas e receptores ligados a ela. Essas mudanças na estrutura da membrana degradada permitem a entrada de Ca^{2+} aumentando a concentração de Ca^{2+} no citosol, o que provoca vários processos como o aumento da lipólise, proteólise, desagregação dos microtúbulos, perturbação do citoesqueleto e da estrutura da membrana.³⁶ Além disso, os produtos de hidrólise gerados, em baixas concentrações funcionam como mensageiros secundários e precursores de sinalizadores lipídicos, porém em concentrações elevadas são altamente citotóxicos. Portanto, os efeitos da alteração da atividade das PLA2's no cérebro contribuem para danos nas células neuronais através de dois fatores: *i*) alterações nas propriedades das membranas e *ii*) produção de substâncias tóxicas.

A relação entre a degradação dos fosfolipídeos de membrana e a esquizofrenia começou a ser investigada na década de 70. A hipótese foi levantada a partir da observação de vários casos que relacionavam a esquizofrenia com mudanças dos mediadores anti-inflamatórios, como: *i*) a associação clínica entre febre e a remissão dos sintomas na psicose, *ii*) resistência relativa a dor mediada

por prostaglandinas e inflamação, e *iii*) reduzida taxa de artrite reumatóide em pacientes com esquizofrenia.³⁷

Desde então, vários estudos visando entender a relação entre a esquizofrenia e o metabolismo dos lipídeos tem sido realizados em várias abordagens diferentes: *i*) estudo das prostaglandinas e ácidos graxos poli-insaturados em tecidos de esquizofrênicos, *ii*) estudo do efeito do fluxo de niacina como um possível marcador,³⁸ *iii*) estudo do metabolismo com espectroscopia de ressonância magnética nuclear e a avaliação da atividade da PLA2.^{39,37} Estes experimentos sugerem uma aceleração do metabolismo de fosfolípides em esquizofrenia, que pode ser observada tanto no cérebro (principalmente no lobo frontal) como em tecidos periféricos.

É relatado que a atividade das PLA2's é aumentada em esquizofrênicos. Vários estudos comparando a atividade desta enzima no plasma, soro e plaquetas de doentes com a de indivíduos normais se mostraram concordantes quanto a alteração.^{39, 40, 41} Na esquizofrenia, estudos sugerem que a sPLA2 GIIA, a cPLA2 GIVA e a iPLA2 GVIA estão mais estreitamente relacionadas com a doença.⁴²

A cPLA2 GIVA mostra uma preferência 50 vezes maior pelo fosfolípídeo com o ácido araquidônico do que qualquer outro que não tenha ácido araquidônico, enquanto que a sPLA2 GIIA e a iPLA2 GVIA não demonstram essa preferência. A cPLA2 GIVA inicia a liberação de ácido araquidônico e a produção de eicosanóides enquanto que a sPLA2 GIIA intensifica e mantém a liberação do ácido araquidônico. O grau de insaturação ao longo da cadeia hidrocarbônica dentro da membrana determina a sua ordem e fluidez. Quanto menos insaturações, menor é a fluidez. O ácido araquidônico é um ácido graxo com 4 insaturações, ou seja, a cada molécula de ácido araquidônico liberada, são perdidas 4 insaturações. Estudos relatam a

correlação entre a redução nos níveis de ácido araquidônico nas membranas celulares de células vermelhas do sangue e células cerebrais com a diminuição da fluidez da membrana e com o aumento da severidade da psicose. A ação da iPLA2 GVIA nos fosfolipídios tem como objetivo preponderante o remodelamento da membrana celular pela alteração da razão fosfolipídio/ácido graxo.⁴² Além dessa função importante, estudos em cérebros de roedores mostram que a iPLA2 GVIA tem nível de expressão elevado em todas as regiões do cérebro, enquanto que outras PLA2's são expressas em apenas algumas regiões.⁴³

A iPLA2 GVIA clássica foi purificada e caracterizada a partir da linhagem de células semelhante a macrófagos P388D1.⁴⁴ Essa enzima tem massa molecular em torno de 85 – 88 kDa, porém existe na forma agregada. Possui atividade lisofosfolipase em adição à atividade PLA2 e mostra interações complexas com as interfaces. A principal função celular da iPLA2 GVIA é o remodelamento dos fosfolipídios das membranas, mas também possui outras funções.⁴⁵ O *splicing* alternativo do transcrito do gene da iPLA2 origina as múltiplas isoformas que têm a distribuição nos tecidos diferenciada e são localizadas nas células, ou associadas à membrana ou na forma solúvel (citossólica).⁴⁶ As sequências das isoformas da iPLA2 GVIA estão representadas esquematicamente na Figura 3. Pelo menos duas formas são cataliticamente ativas (GVIA-1 e GVIA-2). A iPLA2 GVIA-1 tem massa de 85 kDa, contém 8 repetições anquirinas N-terminais e uma sequência consenso lipase (GXS465XG). A iPLA2 GVIA-2 tem massa de 88 kDa e identidade de sequência primária com a GVIA-1, com a diferença que a oitava sequência anquirina é interrompida por 54 aminoácidos adicionais. O aminoácido da posição 450 é um glutamato enquanto que na posição correspondente na GVIA-1 (posição 396) é uma glutamina. A iPLA2 GVIA-3 é idêntica a GVIA-2 na região N-terminal, mantendo o

sítio ativo GTS519TG e o C-terminal truncado. No entanto, não se sabe se a GVIA-3 é uma iPLA2 funcional. A GVIA ankirina-1 é idêntica à GVIA-2 no N-terminal, porém a sua sequência termina antes do sítio ativo com uma alteração de 3 aminoácidos no C-terminal e não é uma enzima funcional. A GVIA ankirina-2 é semelhante à GVIA ankirina-1, também tem falta do sítio ativo GTS519TG, mas contém uma deleção de 73 aminoácidos no N-terminal e uma alteração de 50 aminoácidos no C-terminal.

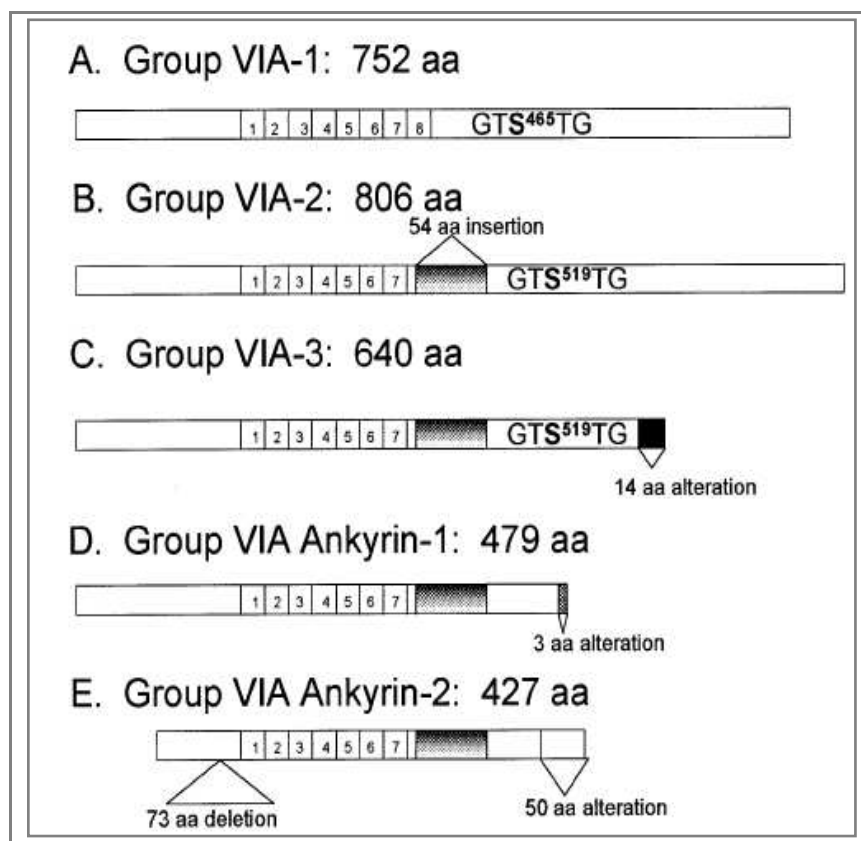


Figura 3: Representação esquemática das múltiplas isoformas da iPLA2, (A) grupo VIA-1, (B) grupo VIA-2 (C) grupo VIA-3, (D) grupo VIA ankirina-1, (E) grupo VIA ankirina-2.⁴⁷

Em diversas proteínas, as repetições ankirinas têm como função a mediação das interações proteína-proteína.⁴⁷ Estudos indicam que a forma ativa do grupo VIA é um tetrâmero.⁴⁸ Assim, é possível que as repetições ankirinas possibilitem a oligomerização dos monômeros do grupo VIA, necessária para a atividade catalítica.

Os grupos GVIA ankirina-1 e GVIA ankirina-2 podem agir como reguladores negativos dos grupos GVIA-1 e GVIA-2 pelo impedimento da agregação do tetrâmero ativo cataliticamente.⁴⁷

Os três principais grupos de PLA2 envolvidas com a esquizofrenia são expressas em plaquetas conforme foi comprovado por medidas de atividade enzimática seletiva para cada grupo.⁴⁹ Além disso, o mRNA da iPLA2 foi detectado em estudos transcriptômicos de plaquetas (informação pessoal¹).

O estudo dessas enzimas em uma matriz de fácil acesso, como as plaquetas, é extremamente interessante, cujos resultados poderão servir para esclarecer qual é a relação do funcionamento alterado dessas enzimas com a esquizofrenia. Sabemos que a alteração da atividade das enzimas pode se dar por expressão diferenciada, mas também, como em muitos casos, devido à modificação pós-traducional. Porém, o ponto de partida foi focalizado na identificação da abundância relativa da enzima em plaquetas.

¹ Obtida a partir de dados não publicados da Dra. Maria Zellner

1.4 Objetivos

Objetivos gerais

Desenvolver um método para a análise de proteínas em plaquetas humanas, aplicá-lo na análise comparativa entre o perfil de expressão proteica em plaquetas de pacientes com esquizofrenia e o de indivíduos saudáveis a fim de identificar padrões de expressão que possam ser relacionados com a doença, sinalizando-a ou esclarecendo seus mecanismos bioquímicos.

Objetivos específicos

Com base em hipóteses que relacionam os distúrbios do metabolismo dos lipídios e a alteração da atividade das fosfolipases A2 com a esquizofrenia, separar e quantificar as PLA2 em plaquetas humanas, com o propósito de verificar se a alteração na sua atividade em plaquetas pode estar correlacionada com diferenças de abundância entre amostras de doentes e controles.

Fazer o estudo comparativo entre a abundância de proteínas extraídas de plaquetas de pacientes esquizofrênicos e a de controles com o propósito de identificar proteínas candidatas a biomarcadores utilizando técnicas proteômicas quantitativas, confiáveis e complementares, como 2D-DIGE e a espectrometria de massas.

2 ANÁLISE PROTEÔMICA

O genoma é o conjunto de genes codificados no DNA de um organismo, ele estático, visto que todas as suas células apresentam o mesmo código genético. Porém, a expressão gênica, que inicia a cadeia de processos que culminam na síntese das proteínas, é dinâmica e varia de acordo com estímulos internos e externos recebidos pelo organismo. Esses processos se desenvolvem através de mecanismos complexos dependentes de muitas variáveis, conhecidas ou ainda não. Isso dificulta a previsão dos produtos formados nas etapas posteriores tendo apenas a informação analítica das etapas anteriores.

Os genes expressos, normalmente ou devido a alguma perturbação biológica na célula, podem ser determinados a partir de estudos das sequências de mRNA's presentes, porém nem sempre as mudanças ao nível de transcrição correspondem às mudanças na quantidade ou atividade das proteínas. Mesmo que exista a relação entre o gene e o produto proteico, os estudos de mRNA não fornecem informações a respeito da localização subcelular e das modificações pós-traducionais, sendo que, o conhecimento desta última é muito importante para o entendimento da função biológica da proteína.

Um único gene pode gerar múltiplos mRNA's, pois podem ocorrer rearranjos, diferentes sítios de iniciação, atuação de modificadores de transcrição, etc. Cada um dos múltiplos mRNA's gerados, estão sujeitos às modificações diversas como, por exemplo, o *splicing* alternativo, a atuação de modificadores traducionais, além de serem moléculas com baixa estabilidade. Como resultado, proteínas diferentes podem se originar de um mesmo mRNA. Depois de sintetizadas, as proteínas

passam pelo processo de enovelamento e por diversos outros como modificações químicas (modificações pós traducionais), ciclos de degradação, etc. Por isso não podemos prever o produto proteico apenas sabendo a sequência do gene ou do mRNA.

Essa descrição superficial da cadeia complexa dos processos envolvidos na síntese e manutenção das proteínas nos mostra o quão dinâmico e variável é um proteoma. Podemos conceituar o proteoma de um organismo como sendo o conjunto de proteínas expressas por ele numa dada circunstância de tempo e que depende da interação com o meio no qual se encontra. Por isso, um mesmo organismo pode apresentar diversos proteomas, dependendo das circunstâncias e das condições nas quais ele está submetido. E este é o principal argumento que mostra o quão importante é a análise proteômica e como ela pode complementar valiosamente as informações obtidas pela genômica e transcriptômica.⁵⁰

A análise proteômica é o termo que designa o estudo geral das proteínas (nível e local de expressão, modificação pós-traducional, interações e associações, etc.) para obter uma visão global e integrada de processos desencadeadores de doenças, processos celulares e de interações no âmbito proteico. A análise proteômica pode ser definida como a genômica funcional com relação às proteínas e é dividida em: *i*) proteômica de expressão, que faz uma análise comparativa da abundância das proteínas em presentes na amostra biológica em uma condição (indivíduos doentes) em relação à abundância encontrada em uma situação padrão (indivíduos saudáveis), *ii*) proteômica funcional, que é o estudo das interações entre proteínas e como essas interações influenciam as suas funções nos estados de saúde e doença e *iii*) proteômica estrutural, que estuda a estrutura tridimensional de proteínas individuais, complexos de proteínas e complexos de fármacos com

proteínas, utilizando técnicas de raios x, ressonância nuclear magnética e espectrometria de massas.

A diferença entre a análise proteômica e a bioquímica de proteínas clássica é a abordagem utilizada. Na proteômica, as proteínas são estudadas de maneira global dentro dos sistemas nos quais estão inseridas enquanto que a bioquímica de proteínas clássica estuda as proteínas de maneira isolada, sem levar em conta a interação como sistema no qual elas fazem parte.^{51,52,53}

O desenvolvimento das tecnologias relacionadas à análise proteômica possibilitou a identificação de inúmeras proteínas até então desconhecidas e a construção de grandes bancos de dados para a pesquisa. Essa ampliação e melhora na separação e identificação de proteínas em amostras biológicas complexas tornaram a análise proteômica uma ferramenta muito promissora para as pesquisas na área clínica. Adicionalmente, a necessidade do desenvolvimento de novos meios de diagnósticos utilizando biomarcadores para detecção e o monitoramento dos processos patológico e terapêutico faz se necessário em muitas áreas da medicina. Esses fatores originaram uma nova área de pesquisa denominada análise proteômica clínica.

Com os seus objetivos voltados para o estudo dos processos patológicos, a proteômica clínica visa: *i)* a identificação de perfis de proteínas que podem ser correlacionados com as doenças, *ii)* a busca de novos biomarcadores para diagnóstico e detecção precoce de doenças e *iii)* identificação de novas estratégias terapêuticas bem como o desenvolvimento, a avaliação da toxicidade e a eficácia de novos fármacos.⁵⁴

Um biomarcador é definido como algo característico que pode ser medido e avaliado objetivamente, como um indicador de processos biológicos normais, processos patogênicos ou de respostas farmacológica à intervenção terapêutica.⁵⁵ Além de servir como um meio de diagnóstico poderoso, um biomarcador pode ser utilizado com a finalidade de verificar o grau da evolução ou da extensão de uma doença. Pode, ainda, ser um indicador do prognóstico do paciente, ser utilizado para monitorar ou prever a resposta biológica do paciente a um determinado tipo de intervenção terapêutica e, por fim, ser útil no entendimento das doenças.

A análise quantitativa de proteínas em fluidos biológicos é um tópico desafiador da proteômica devido a complexidade dessas matrizes. Além do proteoma não ser estático, as proteínas se apresentam em grande variedade e diferentes quantidades⁵⁶, constituindo verdadeiros desafios analíticos. Diante de tal complexidade, é necessário utilizar métodos de separação analítica robustos e que propiciem alta resolução para esses tipos de amostras. Os métodos de separação mais utilizados para analisar proteínas são a eletroforese e a cromatografia líquida, porém quando utilizados no modo convencional, ou seja, apresentando apenas uma etapa de separação (unidimensional), não fornecem resolução necessária para a análise de matrizes complexas. Essa resolução pode ser obtida por essas mesmas técnicas de separação, porém utilizando o acoplamento com mais de uma etapa de separação, em sistemas denominados multidimensionais.

2.1 Sistemas multidimensionais

Antes de discorrer sobre as separações multidimensionais, é muito relevante fazer uma observação relacionada ao significado do termo dimensionalidade, para evitar que confusões sejam geradas posteriormente. Esse termo, muito utilizado em química analítica, é apresentado algumas vezes com o significado variado e até mesmo equivocado. A IUPAC recomenda considerar como dimensionalidade de uma técnica o número de dimensões que possui a função relacionada à informação analítica obtida menos uma unidade. Assim, a técnica que utiliza a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, fornece uma informação analítica que gera uma função com três variáveis: intensidade do sinal, tempo de retenção e razão massa/carga. A informação analítica obtida é tridimensional, porém a técnica é bidimensional. Ainda, em termos cromatográficos, é considerada unidimensional pois utiliza apenas um mecanismo de separação.⁵⁷

A eficiência da separação é medida pela capacidade de pico n , que é o número máximo de picos, zonas ou bandas que são resolvidos no espaço de separação disponível. Portanto, quanto maior a capacidade de pico, maior será o poder de resolução da técnica. Em um sistema de separação bidimensional esse efeito pode ser explicado pela lei multiplicativa, a qual enuncia que o poder máximo de separação sistemas multidimensionais descontínuos é dado por:

$$n_2 \sim n_z \cdot n_y \sim n_1^2$$

Onde n_2 é a capacidade de pico da separação multidimensional e n_z e n_y a capacidade de pico da separação unidimensional no sistema z e y . Essa lei não se aplica a todos os modos de operação. É válida somente nos casos em que ocorrem processos **separativos** (onde as retenções dos componentes da mistura são

diferentes nos dois meios de separação) e **independentes** (as retenções dos analitos no primeiro meio de separação devem ser independentes das retenções no segundo meio de separação) e em **sistemas descontínuos**. A combinação desses fatores faz com que a distribuição dos componentes separados em uma dimensão seja completamente independente da distribuição dos componentes separados na outra, ou seja, cada banda ou pico terá uma correlação muito baixa, o que maximiza o poder de separação. Satisfazendo todos esses quesitos a separação é considerada 100% ortogonal, pois obedece fielmente à lei multiplicativa. Geralmente essa condição é alcançada quando temos dois meios com mecanismos de separação completamente diferentes, porém é maximizada quando temos sistemas descontínuos.⁵⁸

Sistemas de separação bidimensionais podem ser arranjados de duas maneiras: como um sistema planar (descontínuo ou discreto) ou como um sistema de colunas acopladas (sistemas contínuos). Quando este último é considerado, torna-se necessário impor mais uma condição para a multidimensionalidade: a separação deve ser estruturada, de tal forma que a resolução de dois componentes quaisquer obtida na primeira coluna não seja perdida ou alterada quando estes forem transferidos para a segunda coluna. Essa imposição demonstra que o processo de transferência dos analitos de uma dimensão para outra influencia na resolução total obtida no processo.

No caso do arranjo de colunas isso é um fator experimental que deve ser ajustado para se ter sucesso na análise. J. C. Giddings menciona que o acoplamento de colunas está em algum lugar entre um sistema de colunas tandem (que não é multidimensional) e o sistema 2D planar, ou seja, não é 100% ortogonal. O que irá determinar se o acoplamento de colunas está mais próximo de um ou de

outro é a duração do pulso (intervalo de tempo para a seleção de uma fração que é eluída da primeira coluna). Se este Δt é curto, a separação está mais próxima do sistema planar (resolução alta); se é longo, está mais próxima do arranjo tandem (resolução baixa).

Nos sistemas planares o espaço disponível é maior para que as bandas se distribuam de maneira a maximizar independência entre os dois processos, gerando um padrão de separação com menor correlação possível e, portanto, com a capacidade de pico obedecendo a lei multiplicativa deduzida por Giddings. Na eletroforese em gel bidimensional, por exemplo, o processo de transferência de amostra da primeira para a segunda dimensão se dá, de modo que os dois meios de separação estejam perpendiculares entre si, o que faz com que a perda de resolução seja quase nula durante a transferência.

Atualmente, a eletroforese em gel bidimensional é a técnica que apresenta o maior poder de separação para misturas complexas, como no caso de proteínas em fluido biológico, pois possui dois processos **separativos**, completamente **independentes** entre si arranjados em um **sistema planar**.

2.2 Eletroforese em gel bidimensional

Atualmente, a 2DE é a principal técnica para analisar misturas complexas de proteínas extraídas de células, órgãos e tecidos, pois fornece alta resolução na separação, diferenciando milhares de proteínas em um único experimento. Teoricamente, é capaz de resolver até 10.000 proteínas simultaneamente, sendo possível detectar quantidades de proteínas menores que 1 ng por *spot*, quando as condições experimentais são otimizadas. Apesar da excelente resolução que o

sistema oferece, ainda existem limitações que devem ser consideradas no momento do desenho experimental do projeto a ser executado. No entanto, muitos estudos se concentram em solucionar esses problemas e aumentar cada vez mais a abrangência da 2DE.^{59,60,61}

O mecanismo de separação da 2DE na primeira dimensão é a focalização isoelétrica, que separa as proteínas devido às diferenças das cargas globais das proteínas em um gradiente de pH. Na segunda dimensão, as proteínas são separadas pelas diferenças das massas moleculares por uma malha reticular em um gel de poliacrilamida.

As proteínas são macromoléculas de natureza anfótera, ou seja, apresentam características ácidas ou básicas dependendo do pH no qual estão expostas. Portanto, em diferentes pH's elas apresentam estados de ionização distintos, adquirindo uma carga global que pode ser positiva, negativa ou neutra. O pH no qual a carga global da proteína é igual a zero é denominado ponto isoelétrico (pI). Quando a proteína encontra-se em um meio cujo pH é menor que o seu pI, adquire uma carga global positiva enquanto que em um pH maior que o seu pI possui carga global negativa.

Para realizar a IEF das proteínas é necessário um gradiente de pH e a aplicação de uma diferença de potencial entre as suas extremidades. O gradiente de pH é gerado com uma solução eletrolítica contendo muitos anfólitos, que são pares conjugados com pKa's variando desde a faixa ácida até a básica.

Quando um tubo preenchido com uma solução anfóterica é submetido a uma determinada diferença de potencial, os anfólitos migram até chegarem na região de pH correspondente ao seu pKa, parando em seguida, pois a carga global quando o pH é igual ao pKa é nula. Assim, o gradiente de pH ao longo do tubo irá depender da

composição do anfólito e das suas características físico-químicas. Depois de estabelecido o gradiente, as proteínas são aplicadas e, também, migram (as positivas para o cátodo e as negativas para o ânodo) até encontrarem o pH correspondente ao seu ponto isoelétrico, onde a carga é neutralizada e, por isso, não migram mais devido a ação do campo elétrico. A difusão ocorre, porém no momento que a proteína difunde do ponto correspondente ao seu pI, adquire novamente carga e retorna ao ponto de focalização. Isto explica a excelente resolução que é obtida na etapa de IEF.

Atualmente, o gradiente de pH não é mais gerado com soluções anfólicas mas é produzido pela técnica de gradiente de pH imobilizado (IPG). Nessa técnica, o gradiente de pH é formado pela copolimerização de derivados de acrilamida com grupos tamponantes e titulantes em uma matrix de gel de poliacrilamida. A diferença entre as duas técnicas é que os grupos tamponantes do gel de IPG não migram para formar o gradiente, como no caso dos anfólitos. Isso permite a realização da IEF em regime de estado estacionário, resultando em padrões de separação altamente reprodutíveis, aumentando a capacidade de amostra (até 5 mg) e, conseqüentemente, favorecendo a separação e a identificação das proteínas menos abundantes.⁶²

A segunda dimensão é a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) onde as proteínas são separadas devido às suas diferenças de massas moleculares, quando as proteínas estão completamente desnaturadas e lineares.

Essa etapa é realizada utilizando géis de poliacrilamida com diferentes concentrações de acrilamida, dependendo da faixa de massa molecular de interesse. Os géis de poliacrilamida são formados por ligações cruzadas entre a acrilamida e a N'-N-metilenobisacrilamida. Essa polimerização cruzada faz com que

a estrutura do gel seja porosa, com os poros distribuídos ao longo de toda a matriz. O tamanho médio dos poros é determinado pelas porcentagens de acrilamida e bisacrilamida utilizadas, quanto maior a concentração de acrilamida menores serão os poros formados na matriz. As moléculas maiores que os poros da matriz não entram no gel, enquanto que as menores migram livremente, como se estivessem em solução.

Dependendo da necessidade, a quantidade de acrilamida pode ser ajustada para abranger diferentes faixas de massas moleculares, variando de 5 a 200 kDa. Antes do início da eletroforese a proteína desnaturada tem a sua carga intrínseca anulada para que a separação dependa apenas de sua massa molecular. Isso é feito pela adição de dodecil sulfato de sódio (SDS) à amostra e ao gel de separação. O SDS é um agente tensoativo aniônico, possui uma cabeça polar carregada negativamente e uma cauda hidrofóbica. Em concentrações acima de 8 mmol L^{-1} (água pura, $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$) as moléculas de SDS formam aglomerados dinâmicos denominados micelas, cujo interior é formado pelas caudas hidrofóbicas e o envoltório pelas cabeças polares com cargas negativas. O SDS desnatura as proteínas através da formação de um complexo micela-proteína (na razão de 1,4 g SDS/1 g de proteína), que desfaz as ligações de hidrogênio, as interações hidrofóbicas e deixa-a com uma carga global negativa e constante por unidade de massa. Juntamente com agentes redutores desfaz as estruturas secundárias e terciárias das proteínas, minimizando diferenças entre suas formas moleculares. Depois do tratamento, as proteínas ficam na forma linear e com densidade de carga iguais. Após o balanço de cargas, a fita contendo as proteínas focalizadas é aplicada no topo do gel de poliacrilamida e uma diferença de potencial é aplicada entre as

extremidades do gel fazendo com que as proteínas migrem em direção ao pólo positivo e sejam separadas em relação a suas massas moleculares.

Uma relação aproximadamente linear entre o logaritmo da massa molecular e a distância relativa de migração no gel pode ser estabelecida permitindo o cálculo da massa relativa das proteínas presentes na amostra de interesse com base na migração de padrões conhecidos. Entretanto, a relação linear é válida apenas dentro de uma certa faixa de massas, determinada pela quantidade de acrilamida no gel.

A complexidade das amostras biológicas (a presença de várias proteínas com propriedades físico químicas e concentrações diferentes) é responsável por grande parte dos inconvenientes da análise proteômica não só na 2DE, mas também em outras abordagens.⁵⁶

Muitas vezes, a resolução pode ser prejudicada pela semelhança das propriedades e estruturas das proteínas presentes ocasionando a sobreposição de mais de uma proteína em um único *spot*, originada pela co-migração. Consequentemente, uma boa separação não é alcançada em uma única análise. Existem meios para minimizar essa desvantagem como, por exemplo, o uso de gradientes de pH com distâncias de separação maiores (IPG's com 24 cm) e gradientes com menor razão unidade de pH por centímetro (*narrow* ou *ultra-narrow* IPG's 4 – 5 ou 4,5 – 5,5), que aumentam a resolução na IEF e maximizam a separação nesses casos.

A separação de proteínas com pH's próximos aos extremos básicos ou ácidos, é ineficiente na maioria dos casos. Porém, no extremo ácido, o uso de *acrylamido buffer* pK 1 possibilita o uso de IPG's de 2,5 – 5 e a detecção de proteínas nessa faixa de pH. Com relação às proteínas básicas, Görg et al.⁶³ afirmam que, com IPG's de 6 – 12 e 9 – 12 e modificações no protocolo da IEF,

conseguiram padrões de separação reprodutíveis analisando proteínas ribossomais com pI's entre 10,5 e 11,8. Esse sucesso foi atribuído a suplementação de DTT no cátodo, o uso de isopropanol e hidroxietil dissulfeto na solução de reidratação, a aplicação da amostra por *cup loading* anódico com diferença de potencial elevada aplicada após a entrada da amostra e a precipitação com TCA/acetona, que enriquece o precipitado com proteínas básicas.

A detecção de proteínas menos abundantes é um dos principais problemas que complica a busca por biomarcadores em matrizes biológicas, porquanto podem estar entre essas proteínas com baixo número de cópias que não são detectadas nos modos convencionais de 2DE visto que apenas as proteínas com grande abundância na mistura são resolvidas. Para aumentar a abrangência da análise é necessário diminuir a complexidade da mistura fazendo pré-fracionamentos da amostra antes da análise ou isolando sub-proteomas (isolando células, organelas, etc.). Diversas técnicas são empregadas para esse fim, destacando-se as eletroforéticas. O aumento da distância de separação e o uso de IPG com intervalos de pH reduzidos também ajudam na medida que possibilitam a aplicação de maior massa de proteína total.

As proteínas hidrofóbicas, em especial as de membrana, são outra classe de proteínas cuja separação em 2DE não apresenta resultados satisfatórios. Essas proteínas apresentam baixa solubilidade, mesmo quando solubilizadas são mais propensas à precipitação e quando focalizadas interagem com a matriz do gel de IEF permanecendo na fita e não sendo transferidas para a segunda dimensão. Embora não se tenha uma fórmula universal para contornar esse problema, o uso de soluções de reidratação preparadas com combinações específicas de uréia, tiouréia,

detergentes não iônicos ou zwitteriônicos e solventes orgânicos auxilia a separação aumentando o número de *spots* correspondentes a essas proteínas.⁶⁴

Finalmente, o maior alvo de críticas com relação a 2DE é a reprodutibilidade baixa e, em algumas ocasiões, também repetibilidade baixa. Este tópico é de extrema importância quando fazemos a análise quantitativa dos géis, pois a quantificação relativa se dá pela comparação das imagens geradas que é realizada associando os *spots* dos géis de diferentes amostras com os de um gel mestre. Para aumentar a confiabilidade da quantificação é essencial que os géis comparados tenham boa qualidade de separação que possa ser reproduzida para todas as amostras.

Na 2DE, o meio de separação nas duas dimensões é constantemente renovado, e mesmo que os materiais sejam produzido de maneira padronizada, como no caso das fitas da IEF, pequenas diferenças podem persistir. O arranjo do sistema elétrico ter uma sistemática adequada que deve ser otimizada experimentalmente e a temperatura durante a focalização deve ser rigorosamente mantida à 20 °C. O equipamento de focalização possui uma plataforma que é programada para mantê-la à 20 °C. Porém, se a temperatura ambiente é maior, a parte superior do *strip holder* ficará sujeita a ela, o que na prática pode alterar o padrão de separação da IEF. Mas o maior problema está restrito à segunda dimensão onde o meio de separação, o gel de poliacrilamida, é preparado no laboratório, muitas vezes em condições não padronizadas.

A polimerização da acrilamida e a formação das malhas reticulares do gel é dependente da concentração de acrilamida e de metilacrilamida, do pH, da temperatura, do oxigênio dissolvido, do tempo de polimerização. Empiricamente, verifiquei que pequenas variações nesses parâmetros influenciam a formação dos

retículos fazendo com que as propriedades de separação do gel sejam suavemente deslocadas. Fazendo uma analogia com a cromatografia líquida, colunas diferentes mostram pequenas flutuações nos tempos de retenção para a mesma separação, colunas empacotadas pressões diferentes, ou partículas com diâmetros diferentes, também geram padrões de separação não reprodutíveis. A diferença é que na cromatografia líquida o meio de separação pode ser regenerado, e as condições de empacotamento das colunas são extremamente padronizadas. No caso da SDS-PAGE além do meio não poder ser regenerado, as condições de polimerização não são controladas a ponto de que cada etapa tenha sempre a mesma temperatura, o mesmo pH, a mesma quantidade de oxigênio dissolvido. Na minha opinião, com comprovação na prática, o controle fino dessas condições fornece uma alta repetibilidade que poderia ser estendida para a reprodutibilidade se todos os laboratórios estivessem cientes da importância da padronização dessas condições.

Nas eletroforeses 1D ou 2D múltiplas amostras podem ser analisadas em paralelo enquanto que na cromatografia temos que analisar uma amostra por vez. Ainda, se utilizarmos apenas a cromatografia antes da análise de espectrometria de massas (MS), perdemos informações importantes como pI e massa molecular, que não são perdidas na 2DE. Outra excelente característica da técnica de 2DE, é a sua capacidade de permitir a comparação dos níveis de abundância proteica em células sob diferentes condições ambientais ou tratamentos diferenciados, na chamada análise proteômica diferencial.

Outro aspecto importante para o sucesso da análise de 2DE e a produção de resultados confiáveis é o preparo da amostra. Para se obter géis com qualidade é necessário promover a solubilização, a desnaturação e redução das proteínas, eliminar os interferentes e, concomitante a essas etapas, evitar a degradação da amostra. O melhor método de preparo de amostra varia de uma matriz para outra

devido a grande diversidade de proteínas e interferentes. Por isso, o estabelecimento do método de preparo é a primeira etapa dos experimentos proteômicos juntamente com a otimização das condições de IEF. A estratégia de preparo de amostra deve ser traçada de acordo com os objetivos visados. Basicamente, as duas etapas são realizadas antes da análise em 2DE: *i*) a extração das proteínas da matriz, a qual pode ser tipos de células, tecidos, plasma, etc., e *ii*) a solubilização completa das proteínas em um tampão compatível com IEF.

Conforme mencionado anteriormente, o uso de sub-proteomas como o isolamento e análise de organelas celulares como alternativa para a redução da complexidade da amostra deve ser levado em conta nessa etapa. O processo de extração das proteínas da matriz começa com a lise específica do compartimento (célula ou organela) no qual as proteínas de interesse estão armazenadas. Existem vários métodos de lise adequados para os mais diversos tipos de amostras, que vão desde os brandos (osmótica, por aquecimento/resfriamento, enzimática e por uso de detergentes) até os mais drásticos (ultrassom, célula de pressão French®, trituração, homogeneização mecânica ou homogeneização com esferas de vidro). A escolha do método dependerá dos tipos de proteína e da sua localização celular. Todos os procedimentos envolvendo o preparo da amostra devem ser executado com soluções resfriadas e as amostras mantidas à 4 °C, além disso, o coquetel inibidor de proteases deve ser adicionado ao tampão de lise, pois quando as membranas se rompem as proteases são liberadas e começam a degradar as proteínas da amostra.⁶⁵ Além de ajudar a romper as membranas, o tampão de lise tem a função de solubilizar o máximo de proteínas presentes na amostra, porém, mesmo assim, muitas proteínas de membrana são perdidas já nessa fase da análise.

Após a lise, é necessário remover as substâncias interferentes e concentrar as proteínas solubilizadas. Os métodos de precipitação, além de concentrarem as proteínas, eliminam boa parte dos interferentes, porém estão sujeitos a perdas descontroladas de classes de proteínas. A concentração por precipitação depende das propriedades físico-químicas das proteínas e do modo como age o agente precipitante nessas propriedades. Na precipitação com etanol, por exemplo, ele compete com a água externa pelas ligações de hidrogênio que estabilizam a estrutura das proteínas. Além disso, com mais carbonos no meio, as interações hidrofóbicas serão modificadas provocando uma desestabilização da estrutura. Já a precipitação com ácidos ocasiona uma brusca diminuição do pH promovendo a desnaturação das proteínas. Assim, os métodos de precipitação podem ser utilizados como fracionadores, precipitando determinadas classes de proteínas em uma amostra complexa.⁶⁶ O precipitado é solubilizado em um tampão compatível com a IEF, que tem baixa concentração salina, caótropos (uréia e tiouréia), detergentes não iônicos ou zwitteriônicos (CHAPS, Triton, Nonidet P 40) e redutores (DTT ou hidroxietil dissulfeto) para manter as proteínas desnaturadas e desenoveladas, para se ter uma separação boa e reprodutível na análise de IEF.

2.3 Espectrometria de massas

A espectrometria de massas é uma técnica analítica instrumental utilizada para a análise, em fase gasosa, de átomos ou moléculas de uma amostra que são ionizados e separados de acordo com a razão massa/carga quando submetidos a condições específicas de um campo elétrico e/ou magnético. Esta técnica possibilita: *i)* a determinação da massa molecular, *ii)* a caracterização estrutural, *iii)* o estudo da

reatividade em fase gasosa e *iv*) a análise qualitativa e quantitativa dos componentes de uma mistura. Esta técnica permite determinar a estrutura de uma molécula desconhecida a partir do conhecimento da massa molecular medida e dos fragmentos produzidos em determinadas condições de fragmentação.

Um espectrômetro de massas é composto, basicamente, por um sistema de inserção de amostra, a fonte de íons, o analisador de massas, o detector e o sistema de aquisição de dados, conforme está representado na Figura 4. Existem diversos tipos de fontes de íons e de analisadores, cada um com características peculiares que favorecem a análise de determinadas classes de compostos, porém, as aplicações gerais fogem ao escopo deste tópico sendo a aplicação na análise proteômica mais enfatizada.

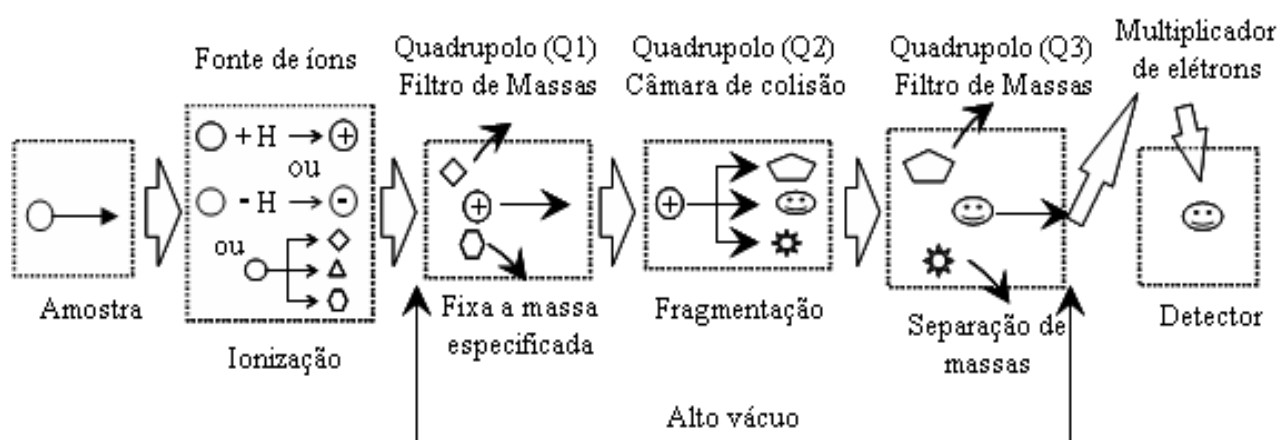


Figura 4: representação esquemática de um espectrômetro de massas tipo triplo-quadropolo.

Nos anos 80, a espectrometria de massas era restrita à análise de substâncias voláteis e termicamente estáveis, pois a dificuldade existente era compatibilizar o sistema de alto vácuo do analisador de massas com maiores pressões na fonte de ionização, para que, assim, moléculas com maiores massas e menos voláteis pudessem ser analisadas. O desenvolvimento da técnica de

ionização química a pressão atmosférica (APCI) foi um grande avanço que contornou, em parte, esse problema. Além disso, permitiu o acoplamento com HPLC e, com isso, o aumento do número de compostos analisáveis por espectrometria de massas. No entanto, as biomoléculas ainda não podiam ser analisadas adequadamente e essa necessidade impulsionou o desenvolvimento de novas fontes de ionização que contornassem tal dificuldade. A partir da criação das fontes de ionização MALDI (*Matrix-assisted laser desorption/ionization*)⁶⁷ e Electrospray (ESI, *Electrospray ionization*)⁶⁸, ambas no final da década de 80, a espectrometria de massas se consagrou como a técnica de excelência para a detecção de proteínas.

A ionização por ESI é um modo de promover a transferência de íons em solução para a fase gasosa à pressão atmosférica. A dessolvatação é conseguida gradualmente por energia térmica, em temperaturas relativamente baixas, o que impede a fragmentação das espécies na fonte. Por esta característica, essa técnica é tida como uma das mais brandas e a que possibilita um melhor controle na fragmentação, que é muito importante visto que as proteínas são analisadas após serem digeridas em peptídeos. Já a fonte de ionização MALDI possibilita a análise da proteína intacta ao invés de peptídeos. A amostra é co-cristalizada com um excesso de matriz cristalina (composto orgânico que absorve energia com grande intensidade no comprimento de onda de excitação do laser) e um feixe de laser incide no cristal fazendo com que a matriz passe para a fase gasosa pelo processo de sublimação e, leve consigo, a proteína intacta. Por meio de reações íons/moléculas as proteínas são ionizadas gerando, na maioria das vezes, íons monocarregados.⁶⁹

A parte fundamental do espectrômetro de massas é o analisador, pois é onde os íons são separados de acordo com a sua razão massa/carga (m/z). A combinação da ESI e MALDI com diferentes tipos de analisadores resulta em uma grande variedade de espectrômetros de massas especializados, com sensibilidade, resolução, exatidão de massas, com capacidades de fornecer espectros ricos em informações através da fragmentação de peptídeos (espectros tandem ou MS/MS) diferentes para cada tipo de arranjo.

Os analisadores mais utilizados em análise proteômica são: *ion trap* (IT), *linear ion trap* (LIT), *time-of-flight* (TOF), quadrupolo (Q) e ressonância ciclotrônica de íons (FT-ICR, *Fourier transform ion cyclotron resonance*). Os espectrômetros de massas podem ser utilizados simplesmente para medir a razão massa/carga (m/z) de peptídeos ou proteínas ou para determinar características estruturais adicionais como a seqüência de aminoácidos, sítios de ligação e o tipo de PTM's. Após a determinação da razão massa/carga, íons específicos são selecionados e direcionados para a câmara de colisão para que ocorra a fragmentação. Neste tipo de experimento, conhecido como espectrometria de massas sequencial (MS/MS), características estruturais detalhadas de cada peptídeo pode ser avaliada pela análise dos espectros de fragmentação.

Atualmente, as estratégias mais comuns para identificação de proteínas utilizando espectrometria de massas são: *i*) PMF (*peptide mass fingerprinting*) e *ii*) Identificação de proteínas procurando seqüências de peptídeos utilizando MS/MS (espectrometria de massas tandem). A última por ser similar a PMF é chamada PFF (*peptide fragmentation fingerprinting*). A proteína deve estar nos bancos de dados proteômicos e quatro ou mais peptídeos serem obtidos na análise de MALDI. A PMF é um método rápido para a identificação de proteínas excisadas do gel. Após a 2DE,

a banda contendo a proteína a ser identificada é extraída do gel, lavada e digerida com proteases específicas. Os peptídeos gerados são eluídos com um pequeno volume de solução e analisados no espectrômetro de massas.

O princípio básico desta técnica é a comparação das massas dos peptídeos medidas com as massas calculadas dos bancos de dados. Cada proteína, após a clivagem com proteases específicas, produz um conjunto único de peptídeos com massas características. Dependendo da exatidão e da resolução do equipamento, poucas massas de peptídeos são necessárias para uma identificação confiável. Na PFF ocorre a fragmentação dos íons de peptídeos isolados ou por decaimento na fonte (MALDI) ou por dissociação induzida por colisão (ESI e MALDI com um analisador TOF-TOF). Ambas as técnicas promovem a clivagem das ligações amida dos peptídeos, que depende, principalmente, da ionização e dos métodos de fragmentação e da sequência de peptídeos. Os íons gerados são chamados b-íons quando o N-terminal está incluso no fragmento e y-íons quando o C-terminal está incluso. A diferença de massa entre dois íons consecutivos (b- ou y-íons) corresponde à massa de um resíduo e, desta forma, o espectro de fragmentação fornece a informação da sequência do peptídeo.⁶⁹

A interpretação dos dados é fundamental para o sucesso da análise dos peptídeos e proteínas da amostra. Existem vários algoritmos diferentes na internet que permitem a interpretação de dados on-line. Entre estes estão os programas *Profound*, *Mascot*, *MSFit* e os bancos de dados *dbEST*, *NCBIInr*, *Swiss-prot*, *OWL*.

2.4 Análise proteômica quantitativa

A análise proteômica quantitativa tem como propósito comparar a abundância de proteínas extraídas de amostras em situações diferenciadas (com tratamento *versus* controle ou doente *versus* saudável) para identificar mudanças relativas na expressão ou no estado pós-traducional de proteínas e relacioná-las com o estímulo ou a perturbação em estudo (tratamento ou doença). Atualmente, as principais abordagens utilizadas são: *i*) o método com separação em gel (*gel based proteomics*) no qual as proteínas são separadas em 2DE, os *spots* de interesse excisados do gel, a proteína digerida in gel e os peptídeos identificados por espectrometria de massas e *ii*) o método sem separação prévia em gel (*gel-free proteomics*) que utiliza a cromatografia líquida multidimensional para a pré-separação dos peptídeos, gerados pela digestão das proteínas no lisado, que são analisados posteriormente por espectrometria de massas.⁷⁰

A 2DE convencional foi muito utilizada para a análise proteômica comparativa, porém apresenta uma variação técnica muito grande, entre 20 e 30%.⁷¹ Conseqüentemente, a repetibilidade das análises fica comprometida, o que dificulta a distinção entre as variações do sistema e as induzidas pelas mudanças biológicas, diminuindo a confiabilidade das alterações encontradas e atribuídas aos diferentes estados biológicos estudados. Isso eleva a probabilidade de resultados falso positivos ou negativos. A análise quantitativa é baseada na comparação da imagens dos géis. Cada *spot* de um gel é associado com correspondente no outro gel, isso exige que o padrão de separação e a repetibilidade dos géis sejam bons, o que muitas vezes não é conseguido. Por causa desse problema técnico é necessário fazer vários géis de uma mesma amostra para “construir” via software um gel virtual

médio, para a situação 1 e outro para a situação 2 e, mesmo assim, a comparação das imagens não é trivial. Portanto, para analisar amostras clínicas em busca de biomarcadores é inconcebível utilizar a 2DE convencional para quantificação relativa das amostras.

A eletroforese diferencial em gel bidimensional (2D-DIGE)⁷² pode contornar esses inconvenientes, aliando o grande poder de resolução da 2DE à eliminação do problema de variação técnica, pela multiplexação da análise e o uso de um padrão interno, e ainda conta com a alta sensibilidade da detecção por fluorescência. Na análise de 2D-DIGE, as proteínas presentes nas amostras controle, doente e padrão são derivadas com corantes fluorescentes (Cy2TM, Cy3TM e Cy5TM, GE Healthcare), reunidas numa mesma fração que é aplicada no gradiente de pH imobilizado, focalizada e, posteriormente, é realizada a análise de SDS-PAGE (Figura 5). Assim, temos a análise simultânea, em um mesmo gel, de duas amostras juntamente com um padrão interno. Os corantes possuem estrutura, massas moleculares e carga semelhantes, mas espectros de emissão diferentes, possibilitando a detecção das proteínas correspondentes a cada amostra sem a sobreposição dos sinais. São sensíveis, fotoestáveis não sofrem alterações em ampla faixa de pH.⁷³

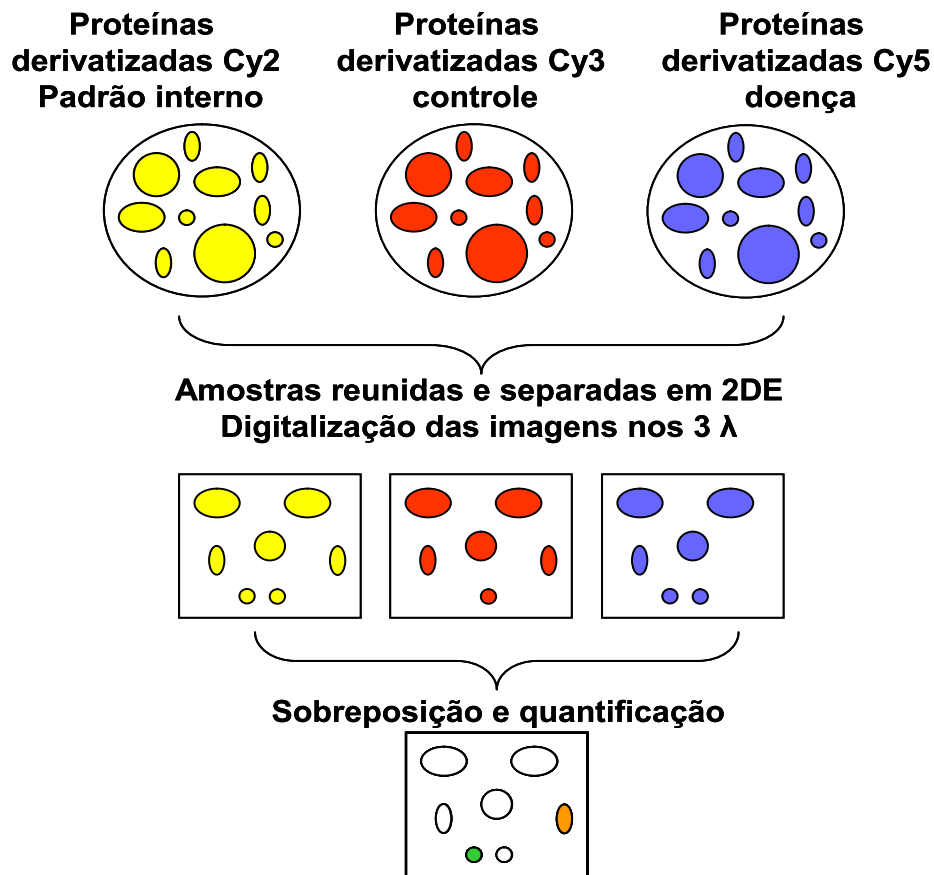


Figura 5. Ilustração das etapas de análise em 2D-DIGE.⁷³

Após o término da análise, o gel é digitalizado em um scanner que detecta sinais de fluorescência nos três comprimentos de onda dos corantes usados, fornecendo as imagens de cada gel que podem ser visualizadas separadas ou sobrepostas. Usando softwares especiais para o tratamento das imagens como o Decyder™ (GE Healthcare⁷⁴) ou Delta 2™ (Decodon⁷⁵) é feita a associação dos *spots* correspondentes em cada gel com os do gel escolhido como modelo (gel mestre), geralmente o gel que tem melhor separação e com mais *spots* visíveis. A adição do padrão interno (mistura de todas as amostras que serão comparadas e idêntico para todos os géis) torna possível a correspondência inter- e intra-gel e é usado para a padronização dos volumes dos *spots* nos diferentes géis. Dessa maneira, a técnica proporciona a comparação dos padrões de expressão

diferenciados de cada amostra e a visualização das proteínas presentes, ausentes e das com abundância diferenciada.

Pelo fato de as variações técnicas serem minimizadas e os resultados obtidos serem considerados quantitativos, com alta exatidão, a 2D-DIGE fornece maior confiabilidade e redução no tempo de análise, pois não é necessário fazer um grande número de réplicas, como no modo convencional. Um dos pontos desfavoráveis da 2D-DIGE está relacionado com o tratamento das imagens, pois muitos softwares são desenhados para análises automatizadas, para minimizar a interferência do operador. Contudo, os algoritmos usados não são bons o suficiente para executar os processos de maneira correta, sendo necessária a intervenção humana para garantir um resultado mais confiável e menos erros, principalmente os relacionados com a identificação e o pareamento dos *spots* inter- e intra-gel.

Apesar de todas as vantagens que a 2D-DIGE apresenta, a análise envolve muitas etapas que consomem tempo e muito trabalho operacional, sendo incompatível com as exigências da rotina de um laboratório clínico especializado em diagnóstico. Essa dificuldade foi a grande propulsora do desenvolvimento dos métodos quantitativos baseados na cromatografia líquida acoplada com a espectrometria de massas.

A grande versatilidade e eficiência da cromatografia líquida e a alta sensibilidade da espectrometria de massas são características que motivaram o uso delas para o aprimoramento da análise proteômica quantitativa. A miniaturização das colunas cromatográficas, além de aumentar a eficiência da separação, contribuiu para facilitar o acoplamento com as fontes de ionização à pressão atmosférica do espectrômetro de massas. No entanto, a análise de peptídeos ainda enfrentava problemas, pois a eficiência não era suficiente para uma separação satisfatória de misturas complexas de peptídeos, o que acarretava dificuldades nas análises de espectrometria de massas.

Os desenvolvimentos dos sistemas multidimensionais, conhecidos como MudPiT (*multidimensional protein identification technology*), contribuíram para o aumento da resolução da separação dos peptídeos antes da ionização no espectrômetro de massas. Se temos uma mistura de peptídeos, a interação entre eles pode prejudicar a ionização de determinados peptídeos ocasionando a perda do sinal e a diminuição da eficiência da ionização. A pré separação ajuda a eliminar o efeito da sub amostragem, pois melhora a aquisição dos dados e a sensibilidade para detectar peptídeos que são menos abundantes e, conseqüentemente, ocorre um aumento do número de proteínas identificadas presentes na mistura.

Essa tecnologia consiste no acoplamento, *on line* ou *off line*, de duas colunas com mecanismos de separação completamente diferentes. A primeira coluna, em geral, é de troca catiônica e separa os peptídeos pelas diferenças de interação eletrostática com a fase estacionária. Os peptídeos são retidos na coluna e eluídos com um tampão cuja força iônica é aumentada pela adição de sal. A segunda coluna, de fase reversa, recebe as frações salinas contendo os peptídeos. Como o sal é incompatível com a espectrometria de massas, a primeira eluição, usando uma fase móvel com baixa porcentagem de solvente orgânico, é realizada para remover o sal e, ao mesmo tempo, concentrar os peptídeos no topo da coluna. Depois da remoção do sal, os peptídeos são eluídos pelo aumento gradual de solvente orgânico na fase móvel.

O acoplamento *off line* permite que as separações sejam otimizadas melhorando a resolução do processo, no entanto, aumenta o risco de perda e contaminação da amostra, além de ser complicado automatizar o processo como um todo. No sistema *on line* a transferência da amostra entre as colunas é automatizada por meio de válvulas especiais (*switch valves*) que controlam a passagem do

eluente, ora para a segunda coluna, ora para o descarte, mas sem nunca interromper o fluxo. Apesar de facilitar a automação, evitar a perda e a contaminação da amostra, o ajuste das condições necessárias para melhorar a resolução não são fáceis de conseguir, além do que as válvulas acrescentam caminhos a mais para a passagem das bandas separadas na primeira coluna causa a perda de resolução, diminuindo a eficiência do processo.⁷⁶

As três principais estratégias para análise quantitativa usando LC/MS são: *Shotgun*, análise direta (*directed MS*) e análise de monitoramento de analitos específicos (*targeted MS* ou SRM, *selected reaction monitoring*). O processo de identificação e quantificação dos peptídeos em MS segue um padrão geral que é rearranjado com diferentes variações experimentais em cada uma das modalidades citadas. Basicamente, as proteínas presentes na matriz biológica são digeridas com enzimas específicas, os peptídeos gerados são separados em cromatografia líquida e levados até a fonte de ionização do espectrômetro onde são transferidos para a fase gasosa e analisados de acordo com a razão m/z gerando a informação espectral.

Na estratégia *shotgun* os peptídeos gerados são separados em cromatografia em fase reversa e analisados no MS nos modos varredura (*full scan*) e de fragmentação (MS/MS). Assim, somente a identificação de proteínas e de modificações pós-traducionais são conseguidas. Para obter a informação quantitativa é necessário usar marcação com isótopos estáveis. Essa técnica consiste na derivação dos peptídeos gerados nas amostras a serem comparadas com um reagente isotópico na forma leve e pesada. O espectro de varredura permite a comparação da intensidade dos sinais de peptídeos correspondentes proveniente de amostras diferentes, pelo deslocamento da m/z de ambos devido a diferença de

massa dos marcadores. Comparando essa diferença de intensidade de sinal é possível fazer a quantificação relativa entre as amostras. Já o espectro de fragmentação, que é realizado simultaneamente, fornece a sequência dos aminoácidos permitindo a identificação dos peptídeos. Nesse modo é possível fazer a identificação e a quantificação das proteínas em um mesmo experimento, diminuindo a sensibilidade de detecção e afetando diretamente a qualidade da quantificação.

No modo de análise direta (*directed MS*) é necessário analisar a amostra duas vezes, registrando o espectro de varredura em um experimento e o de fragmentação em outro, fazendo a quantificação e a identificação do peptídeo em etapas distintas. Esse método fornece espectros de alta qualidade e permite uma quantificação mais precisa, pois essa etapa é completamente independente da etapa de sequenciamento e identificação, diferentemente do *shotgun*. É compatível com quantificação baseada em marcação isotópica e com métodos de quantificação livres de marcação.

O modo de monitoramento SRM (*selected reaction monitoring* ou *targeted MS* ou MRM *multiple reaction monitoring*, termo este em desuso) é usado para detectar e quantificar analitos pré-determinados em amostras complexas. Para isso requer informações prévias à análise tanto para delinear o experimento quanto para a escolha dos alvos a serem monitorados. É necessário saber a m/z , o tempo de retenção e o conjunto de fragmentos mais intensos dos peptídeos do analito alvo. Para executar este tipo de experimento é necessário um espectrômetro com um analisador triplo quadrupolo, onde o segundo analisador não é usado no modo de varredura, mas sim monitorando o intervalo de m/z correspondentes aos dos peptídeos do analito alvo. Dessa maneira, gasta-se mais tempo monitorando os m/z

de interesse o que gera um aumento na intensidade dos respectivos sinais, que se traduz no aumento da sensibilidade de detecção. Isso permite a determinação de analitos em baixa concentração resultando em melhores limites de detecção e quantificação, cerca de 2 ordens de magnitude menores do que outras modalidades de LC/MS. Com limites de detecção mais baixos, temos uma razão sinal ruído maior e assim podemos ajustar o intervalo de tolerância de massa para valores menores (≥ 1 Da), reduzindo a interferência de co-eluentes e melhorando a seletividade. Pode-se fazer tanto a quantificação relativa, usando marcação isotópica, quanto a quantificação absoluta, usando peptídeos sintéticos como padrão. Além disso, as medidas são precisas, com baixos coeficientes de variação e reprodutibilidade elevada. Por ter essas características, esta modalidade é ideal para o desenvolvimento de métodos analíticos para a detecção e quantificação de peptídeos e proteínas que são potenciais biomarcadores para doenças.

3 MÉTODOS EXPERIMENTAIS

3.1 Recrutamento de pacientes e controles

Os pacientes participantes do estudo foram recrutados no ambulatório clínico psiquiátrico e psicoterapêutico da Georg August Universidade de Medicina de Göttingen, em colaboração com a Profa. Dra. Andrea Schmitt (*Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie, Georg August Universität Göttingen, von-Siebold Str. 5, 37075, Göttingen, Germany.* aschmit@gwdg.de). As amostras foram coletadas no período entre 29 de novembro e 20 de dezembro de 2010. Todo os pacientes tem diagnóstico estabelecido de esquizofrenia paranóide. Todas as amostras foram coletadas com autorização do comitê de ética aprovada em 20/2/09 e 15/9/08, na comissão de ética médica da Georg-August-University Göttingen, Alemanha.

Critérios de inclusão: Foram incluídos indivíduos entre 18 e 72 anos, do sexo feminino e masculino com diagnóstico de esquizofrenia (ICD-10 e DSM-IV) e confirmados pela entrevista clínica estruturada SCID-P. Para este estudo os indivíduos estavam com a psicopatologia estável e medicação antipsicótica constante por pelo menos 2 (duas) semanas antes da coleta do sangue. Apresentaram Q.I. verbal maior ou igual a 85 e assinaram a permissão escrita para a participação no estudo. Todo o procedimento foi realizado com as devidas autorizações dos comitês éticos responsáveis pela instituição.

Critérios de exclusão: Foram excluídos os indivíduos com história prévia ou atual de dependência de álcool e/ ou drogas (DSM-IV), doenças neurológicas degenerativas ou uso prolongado de corticosteróides; portadores de doenças

graves, instáveis, incluindo doença renal, gastroenterológica, respiratória, cardiovascular, endocrinológica, neurológica, imunológica ou hematológica. Gravidez e deficiência física também foram estados eliminatórios para a participação do paciente no estudo.

Coletamos o sangue de 20 pessoas de cada grupo paciente/controle. Os pacientes e controles foram selecionados de modo a terem homogeneidade de sexo, idade e nacionalidade. Foram considerados controles os indivíduos saudáveis, sem doença orgânica manifesta, que não apresentavam evidências clínicas ou neuropsicológicas de nenhum transtorno psiquiátrico e que não possuem parentes com histórico de transtornos mentais.

3.2 Coleta do sangue de isolamento das plaquetas

Lavagem de plaquetas – Método 1

As plaquetas foram extraídas a partir de 40 mL sangue fresco coletados imediatamente antes do início da extração. O sangue foi distribuído igualmente em 4 tubos de 10 mL contendo o anticoagulante citrato de sódio na concentração de 106 mmol L^{-1} e cuidadosamente homogeneizado por inversão. Após a homogeneização, foi adicionado 1 mL da solução ACD-NH-Formol-A (*acid-citrate-dextrose*) em cada tubo. A solução resultante foi homogeneizada por inversão e centrifugada (1.600 rpm, 15 min, 20 °C). O pH do sobrenadante, plasma rico em plaquetas (PRP), foi ajustado para 6,5 com a solução ACD-NH-Formol-A. A seguir, o PRP é centrifugado (2.400 rpm, 10 min, 20 °C). Após a centrifugação, o sobrenadante foi removido e o precipitado lavado duas vezes com a solução de lavagem (30 mL de citrato de sódio

0,1 mol L⁻¹; 3,3 mL de cloreto de potássio 0,155 mol L⁻¹; 1 mL de cloreto de magnésio 0,1 mol L⁻¹; 1,5 mL de glicose 0,33 mol L⁻¹; 2,5 mL de apirase 2 mg mL⁻¹; 0,25 mL de albumina; 2 mL cloreto de cálcio 0,1 mol L⁻¹; cloreto de sódio 0,9%: qsp 100 mL). A solução foi centrifugada (2.400 rpm, 8 min, 20 °C) e o precipitado originado foi ressuspensionado em 500 µL de tris-sacarose 50 mmol L⁻¹ tris/233 mmol L⁻¹ de sacarose. A suspensão foi armazenada em freezer à – 80 °C.

Lavagem de plaquetas – Método 2⁷⁷

As plaquetas foram isoladas a partir de 20 mL de sangue coletados em tubos contendo anticoagulante ACD (*acid citrate dextrose*) e centrifugados a 110×g por 30 min a temperatura ambiente. O sobrenadante foi lavado com o meio de cultura RPMI (Roswell Park Memorial Institute) por centrifugação. Prostaglandina E1 (0,1 µg mL⁻¹) foi adicionada durante todas as etapas para evitar o processo de ativação. O precipitado foi ressuspensionado e lavado com meio RPMI e as plaquetas foram solubilizadas em solução de SDS/2-mercaptoetanol/glicerina/tris.

Cromatografia de exclusão por tamanho – Método 3

Primeiramente, um volume de 10 mL de sangue foi coletado em um tubo contendo 8% de EDTA (Vacuette[®] 8% EDTA, Greiner) para o preparo de amostras para análises genéticas. Após, um volume total de 30 mL de sangue foi coletado em 3 tubos contendo 3,8% de citrato de sódio (Vacuette[®] 3,8% citrato de sódio, Greiner). Os tubos foram processados de acordo com o esquema da Figura 6. O processo de coleta das amostras foi documentado segundo a planilha do Apêndice I.

Brevemente, reservamos 2 mL de sangue integral dos tubos contendo EDTA para análises genéticas, estocado à 80 °C, e 200 µL, mantido à 25 °C, para a contagem de células sanguíneas. O restante do sangue foi centrifugado (1.850xg, 15 min, 4 °C) e posteriormente 2 mL da parte superior do plasma foi recuperada e centrifugada novamente (15.000xg, 10 min, 4 °C). A parte superior do plasma foi recuperada e foram separadas em seis alíquotas de 220 µL cada.

Os tubos contendo citrato foram centrifugados (84xg, 20 min, 25 °C, sem freio) e cerca de 4 mL PRP recuperado, cuidadosamente transferido para outro tubo de polietileno e sua composição determinada em um contador de células.

As plaquetas foram separadas das proteínas do plasma por cromatografia de exclusão por tamanho. Uma coluna (Econo-Pac Columns, 732-1010, BioRad™) foi preenchida com 19 mL de sepharose 2B™ (2B 300 Sigma) em suspensão e posteriormente condicionada com PBS 1x (*phosphate buffered saline*, GIBCO, sem cálcio e magnésio) até alcançar um volume de fase estacionária de 13 mL (2 h), a frita foi colocada e empurrada até um volume de 12 mL e foi condicionada mais 30 min com PBS 1x. Um volume de 1 mL de PRP foi aplicado na coluna de sepharose (12 cm de fase estacionária x 1,5 cm de diâmetro) e, após a completa entrada da amostra na coluna, a eluição foi iniciada com 2,5 mL de PBS e com mais 1,5 mL PBS as plaquetas foram eluídas completamente. A composição de plaquetas do eluato (fração GFP, *gel filtrated platelet*) foi determinada em um contador de células.

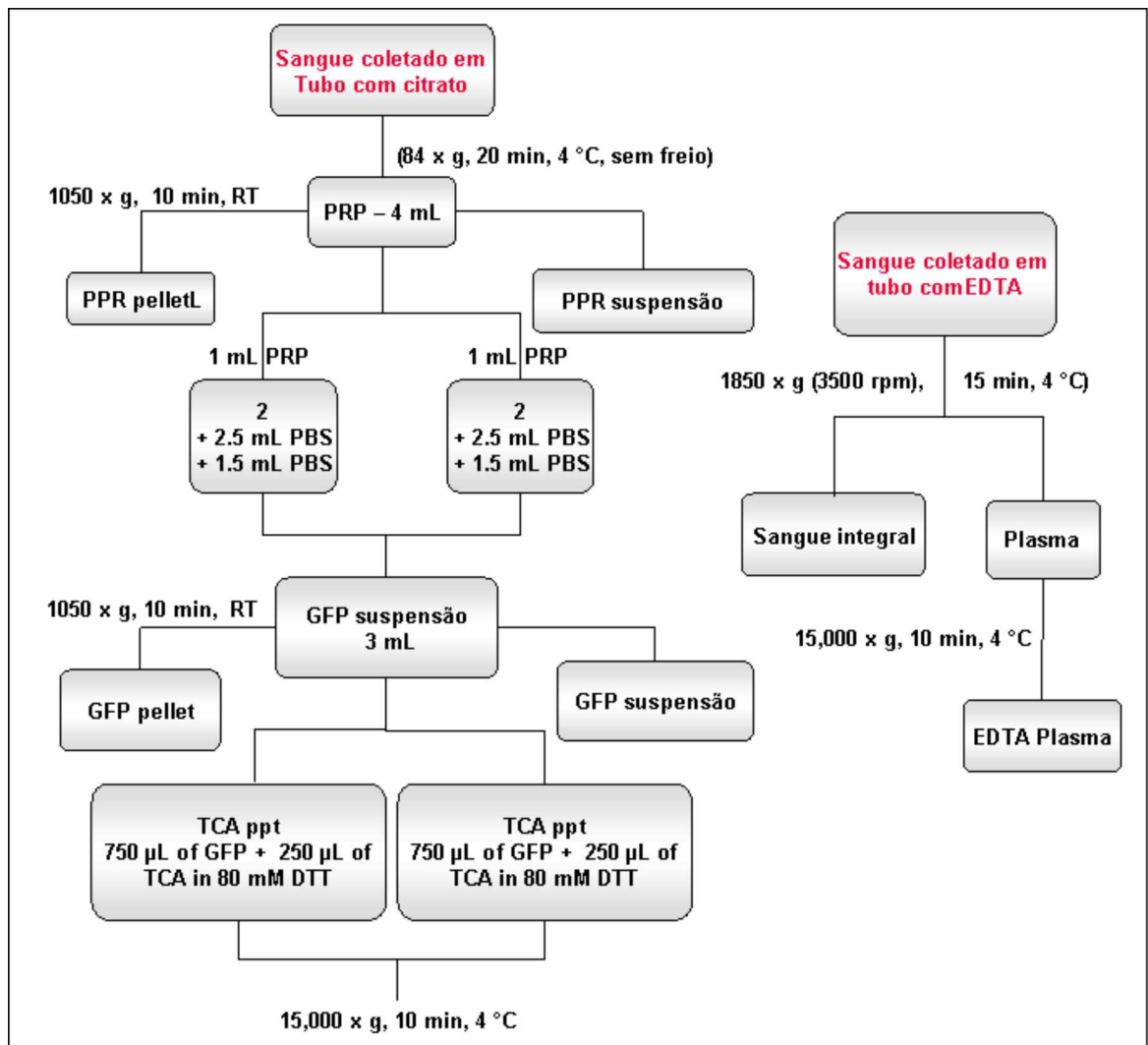


Figura 6: Fluxograma do fracionamento da matriz sanguínea.

3.3 Preparo da amostra para 2DE

Precipitação de proteínas das plaquetas com TCA

Foram feitas duas alíquotas de 750 µL de GFP e adicionado 250 µL de 80 mmol L⁻¹ de DTT (*dithiothreitol*, Roche) em TCA (*trichloroacetic acid*, Sigma) 6,1 N gelado a cada uma delas que posteriormente foram incubadas por 1 hora à 4 °C. Após a incubação, o GFP foi centrifugado (15.000xg, 10 min, 4 °C), o sobrenadante

descartado completamente e o precipitado lavado 4 vezes com $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de DTT em acetona p.a. (Merck) gelada. O precipitado foi estocado nesse estado à $-80 \text{ }^\circ\text{C}$.

Solubilização do precipitado em uréia buffer

O precipitado foi recuperado por centrifugação (15.000xg , 10 min, $4 \text{ }^\circ\text{C}$), a acetona com DTT removida e uma segunda lavagem com acetona gelada foi efetuada. Novamente, o precipitado foi recuperado por centrifugação (15.000xg , 10 min, $4 \text{ }^\circ\text{C}$), seco a vácuo, solubilizado em um volume adequado de tampão de ressolubilização com uréia (7 mol L^{-1} uréia (Merck), 2 mol L^{-1} tiouréia (Sigma), 4% CHAPS (Gerbú), 30 mol L^{-1} Tris base (Merck) pH 8,5) e agitado *overnight* à $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Após a solubilização completa, a amostra foi centrifugada (15.000xg , 10 min, $4 \text{ }^\circ\text{C}$) e o conteúdo de proteínas total foi determinado pelo método de Bradford. Alíquotas contendo $18 \mu\text{g}$ de proteína total foram feitas e armazenadas à $-80 \text{ }^\circ\text{C}$.

O padrão interno foi a mistura de um volume correspondente a $49 \mu\text{g}$ de proteína de cada amostra de paciente e controle. A partir dessa mistura foram feitas alíquotas de $18 \mu\text{g}$ de proteína que foram utilizadas nas análises posteriores.

Marcação das amostras com os corantes fluorescentes Cydye™

As amostras solubilizadas em tampão com uréia foram centrifugadas (10.000xg , 10 min, $4 \text{ }^\circ\text{C}$), o pH confirmado em aproximadamente 8,5, e um volume correspondente $15 \mu\text{g}$ de proteína foi transferido para tubos novos. As amostras foram marcadas com os fluoróforos CyDyes™, 2 nmol , (GE Healthcare). O padrão interno foi marcadas com o corante Cy™ 2 e as amostras de pacientes e controles

marcadas, respectivamente, com os corantes CyTM 3 e CyTM 5 de acordo com as recomendações do fabricante. Brevemente, a solução de trabalho foi feita a partir da diluição de 0,4 µL da solução estoque (2 nmol de corante em 2,1 µL de dimetilformamida) em 2,1 µL de dimetilformamida. A cada amostra com 15 µg de proteína foi adicionado 0,35 µL da solução de trabalho (0,053 nmol/15 µg), e deixadas em repouso, no escuro, por 40 min. A reação foi interrompida com 0,5 µL de 10 mmol L⁻¹ de lisina e as duas amostras marcadas com CyTM 3 e CyTM 5, respectivamente, foram misturadas com o padrão interno marcado com CyTM 2. Após, as amostras foram solubilizadas na solução de reidratação nas análises utilizando o gradiente ácido de pH 4 – 7 ou solubilizadas em 55 µL de solução de amostra e aplicada via *cup loading* nos gradientes de pH 6 – 9.

3.4 Focalização isoeétrica

O intervalo de pH avaliado foi de 4 a 9, sendo que para isso foram feitos 2 géis de cada amostra: um utilizando fitas IPG com gradiente de pH de 4 – 7 e outro com 6 – 9, ambas de 24 cm (GE Healthcare). O procedimento de focalização isoeétrica (IEF) foi realizado com diferentes programações para cada um dos intervalos de pH. Após a IEF as fitas foram armazenadas horizontalmente à – 80 °C.

Gradiente de pH imobilizado 4 – 7

As fitas foram reidratadas com solução de reidratação contendo a amostra (45 µg de proteína total, 7 mol L⁻¹ uréia, 2 molL⁻¹ tiouréia, 4% CHAPS, 1% anfólito pH 4 – 7 (Serva), 70 mmol L⁻¹ DTT, pH 8,5), *sample in gel rehydration*, por 10 h e

focalizadas em um sistema IPGPhor (GE Healthcare) à 20 °C. O papel de filtro do eletrodo positivo foi molhado em solução de reidratação sem DTT e sem anfólito, enquanto que o do eletrodo negativo foi molhado com a solução de reidratação completa. As amostras foram preparadas de acordo com a Tabela 2.

A programação da IEF:

Etapa 1:	Constante	200 V	00:01 h
Etapa 2:	Constante	10 V	00:01 h
Etapa 3:	Gradiente	200 V	02:00 h
Etapa 4:	Constante	200 V	02:00 h
Etapa 5:	Constante	3000 V	02:15 h
Etapa 6:	Gradiente	5.000 V	07:30 h
Etapa 7:	Constante	5.000 V	02:20 h

Tabela 2: Preparo das amostras para a análise em gradiente de pH de 4 – 7.

Fitas	Cy3	Cy5	15 µg proteína Paciente (µL)	15 µg proteína Controle (µL)	15 µg proteína P.I (µL)	Amostra+ 3*(0,85) (µL)	Solução de reidratação (µL)	DTT 4M (µL)	IPG Buffer 4 – 7 (µL)
53650	C026	S001	4,0	3,1	3,7	13,40	436,60	7,9	4,5
53653	C031	S002	3,8	4,6	3,7	14,60	435,40	7,9	4,5
73930	C041	S003	4,6	6,7	3,7	17,55	410,00	7,9	4,5
53656	C030	S004	4,3	3,6	3,7	14,15	425,45	7,9	4,5
53654	S005	C029	3,9	3,3	3,7	13,50	436,50	7,9	4,5
53655	S006	C025	4,5	3,7	3,7	14,45	423,15	7,9	4,5
53657	C024	S007	3,9	4,3	3,7	14,80	422,80	7,9	4,5
53659	S008	C034	3,7	4,0	3,7	13,95	423,65	7,9	4,5
53651	S009	C027	4,9	3,6	3,7	14,70	435,30	7,9	4,5
53652	C030	S010	4,5	3,5	3,7	14,30	435,70	7,9	4,5
73931	S011	C039	4,1	4,3	3,7	14,65	423,00	7,9	4,5
53658	C028	S012	5,0	3,1	3,7	14,50	423,10	7,9	4,5
53560	S013	C025	4,2	3,7	3,7	14,30	423,30	7,9	4,5
73928	S014	K162	4,7	7,1	3,7	18,05	419,55	7,9	4,5
73934	S015	C038	4,8	5,7	3,7	14,20	423,40	7,9	4,5
73939	S016	C037	7,4	6,8	3,7	20,45	417	7,9	4,5
73929	S017	K169	4,8	8,4	3,7	19,45	418,15	7,9	4,5
73927	C040	S018	5,5	6,6	3,7	15,8	421,8	7,9	4,5

Gradiente de pH imobilizado 6 – 9

As fitas foram reidratadas com a solução de reidratação sem amostra (2% IPG buffer pH 6 – 11 (Plus one) e 150 mmol L⁻¹ DTT em 450 µL de solução de reidratação) por 15 h. Um volume de 55 µL de amostra (45 µg de proteína total, 7 mol L⁻¹ uréia, 2 mol L⁻¹ tiouréia, 4% CHAPS, 2% IPG buffer pH 6 – 9, 150 mmol L⁻¹ DTT, pH 8,5) foi aplicado na fita utilizando o sistema *cup loading* anódico. No lado catódico, colocamos um papel filtro com 175 µL de solução de reidratação com 212 mmol L⁻¹ de DTT e 2% de IPG buffer 6 – 11 para evitar a depleção de DTT no cátodo (Figura 7) enquanto que o papel filtro do ânodo foi molhado com solução de reidratação sem DTT e IPG buffer. As amostras foram preparadas de acordo com a Tabela 4.

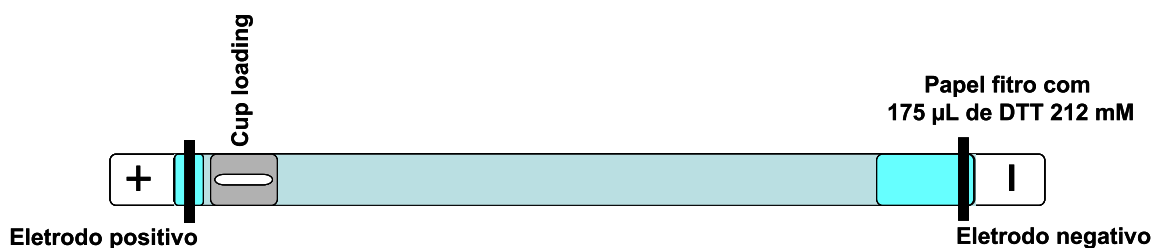


Figura 7: Montagem do sistema de focalização para o gradiente de pH 6-9.

Tabela 3: Preparo das amostras para a análise em gradiente de pH de 6 – 9.

Fita	Cy3	Cy5	15 µg proteína Paciente (µL)	15 µg proteína Controle (µL)	15 µg proteína P.I (µL)	Amostras + 3*(0,85) (µL)	Solução de reidratação (µL)	DTT 4M (µL)	IPG buffer 6-11 (µL)
86310	C026	S001	4,0	5,5	3,7	13,20	41,80	2,0	1
86311	S002	C031	3,8	4,6	3,7	12,10	42,90	2,0	1
86301	S003	C041	4,6	6,7	3,7	17,70	37,30	2,0	1
57762	S004	C030	4,3	3,5	3,7	14,40	40,80	2,0	1
57765	S005	C029	3,9	3,3	3,7	13,80	41,20	2,0	1
86305	S006	C028	4,5	3,1	3,7	14,15	40,85	2,0	1
86302	C024	S007	3,9	4,3	3,7	14,60	40,40	2,0	1
57793	C034	S008	3,7	4,0	3,7	14,10	40,50	2,0	1
57796	C027	S009	4,8	3,6	3,7	14,70	40,30	2,0	1
86312	S010	C030	4,4	3,5	3,7	14,15	40,85	2,0	1
86303	C039	S011	4,1	4,3	3,7	14,95	40,05	2,0	1
86306	C026	S012	5,1	5,5	3,7	17,00	38,00	2,0	1
86304	S013	C025	4,2	3,7	3,7	14,30	40,70	2,0	1
85159	S014	K162	7	7,1	3,7	20,35	35	2	1
86307	C038	S015	4,8	5,7	3,7	14,20	40,80	2,0	1
86308	S016	C023	7,4	3,2	3,7	14,3	40,7	2,0	1
85161	S017	K169	4,8	8,4	3,7	19,45	35,55	2	1
85160	C040	S018	5,5	6,9	3,7	18,65	36,35	2	1

A programação da IEF foi:

Etapa 1:	Constante	300 V	00:01 h
Etapa 3:	Gradiente	300 V	03:00 h
Etapa 4:	Gradiente	800 V	05:00 h
Etapa 5:	Gradiente	1.400 V	04:00 h
Etapa 6:	Constante	1.400 V	05:00 h
Etapa 7:	Gradiente	3.500 V	03:00 h
Etapa 8:	Constante	3.500 V	01:20 h
Etapa 9:	Constante	500 V	02:00 h

3.5 2D-PAGE

Antes de serem submetidas à segunda dimensão, as fitas com as proteínas focalizadas foram equilibradas por 20 min numa solução contendo DTT (10 mg mL^{-1}) e em seguida 15 min numa solução contendo iodoacetamida (25 mg mL^{-1}), sob leve agitação, a temperatura ambiente. Após o equilíbrio, as fitas foram seladas com agarose no topo do gel de poliacrilamida 11,5% (anexo de soluções), polimerizado 1 hora à temperatura ambiente. A corrida foi realizada utilizando o tampão de *Laemmli* nas seguintes condições eletroforéticas:

Etapa 1:	30 V	01:30 h
Etapa 2:	50 V	02:00 h
Etapa 3:	110 V	16:30 h

Os géis foram digitalizados imediatamente após o término da segunda dimensão, sem serem removidos das placas de vidro.

3.6 Tratamento dos dados de imagens

Os géis com as proteínas marcadas foram digitalizados usando o *scanner Typhoon 9410 Imager* e as imagens tratadas no software Image Quant 5.2. Antes da detecção dos *spots*, as áreas das imagens que não correspondem ao gel foram removidas usando ferramentas do software. A detecção dos *spots* foi realizada nas imagens editadas usando o módulo DeCyder DIA 6.00.28 estipulando o número de *spots* alvo em 3.000. Os sinais de fluorescência de um *spot* tiveram a linha de base corrigida e normalizada pelo software de acordo com instruções no manual: cada gel foi adicionado à planilha de avaliação e combinado com o gel mestre usando o módulo DeCyder BVA 6.01.02. Para a comparação da intensidade dos *spots* entre

todos os géis e os grupos de estudo, os volumes dos *spots* normalizados foram divididos pelo padrão de separação do padrão interno e o perfil de abundância de cada proteína será mostrado pelas abundâncias padronizadas.

3.7 1D-PAGE para a análise proteômica em modo *Shotgun*

As proteínas extraídas das plaquetas foram solubilizadas no tampão de corrida de SDS-PAGE com β -mercptoetanol e um volume equivalente a 50 μ g de proteína total foi aplicado no gel de poliacrilamida 13%. A eletroforese prosseguiu até a separação do marcador de peso molecular pré-corado tornar-se visível. Após a fixação com 50% metanol/10% ácido acético, os géis foram corados com prata, as bandas recortadas e submetidas à digestão com tripsina, previamente à análise por MS.

3.8 Procedimento de coloração com prata compatível com MS

Após o processo de fixação, os géis foram lavados com 50% de metanol por 10 min, com água por 10 min e sensibilizados com $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,02% por 1 min. Os géis foram corados com uma solução 0,1% de AgNO_3 , gelada, por 10 min e, após, lavados rapidamente com água bidestilada. A coloração foi desenvolvida com uma solução 3% Na_2CO_3 /0,05% de formaldeído.

3.9 Digestão enzimática *in gel*

As bandas contendo as proteínas foram recortadas, picadas, os pedaços de gel descoloridos com uma solução aquosa de 15 mM $K_3Fe(CN)_6$ /50 mM $Na_2S_2O_3$ e extensivamente 50% metanol/10% ácido acético. O pH foi ajustado com NH_4HCO_3 50 mM, as proteínas foram reduzidas com 10 mM de DTT em 50 mM NH_4HCO_3 por 30 min à 56 °C e alquiladas com 50 mM de iodoacetamida em 50 mM NH_4HCO_3 por 20 min no escuro. Após, os pedaços de gel foram desidratados com acetonitrila e secos em uma centrífuga a vácuo. Entre cada uma das etapas os tubos foram agitados por 5 a 10 min. Os géis secos foram tratados com tripsina (grau sequenciamento) 0,1 mg/mL em 50 mM NH_4HCO_3 por 20 min no gelo, após os pedaços de gel foram completamente cobertos com 50 mM NH_4HCO_3 e incubados *overnight* a 37 °C. Os peptídeos gerados foram eluídos pela adição de 50 mM NH_4HCO_3 , sonificados (10 min), centrifugados (1 min, 10.000 rpm) e o sobrenadante transferido para tubos silanizados. O procedimento foi repetido mais duas vezes utilizando 5% de ácido fórmico em 50% de acetonitrila ao invés de 50 mM NH_4HCO_3 . Por fim, a solução contendo os peptídeos eluídos foi concentrada em centrífuga a vácuo até o volume de 20 μ L.

3.10 Análise por espectrometria de massas

Os peptídeos foram aplicados em uma coluna Zorbax 300SB-C8 (5 μ m dp, 0.3 mm \times 5 mm) e separados por cromatografia líquida nanoflow LC (1100 Series LC system, Agilent) com uma coluna Zorbax 300SB-C18 (5 μ m dp, 75 μ m \times 150 mm) com taxa de fluxo de volume de 250 nL/min usando um gradiente de 0,2% de ácido

fórmico e 3% de acetonitrila a 0,2% de ácido fórmico e 45% de acetonitrila em 12 min. No caso da análise de *shotgun* os peptídeos foram separados por nanoflow LC (1100 Series LC system, Agilent) usando o HPLC-Chip composto por uma pré-coluna de 40 nL Zorbax 300SB-C18 e uma coluna analítica de 75 μm \times 150 mm Zorbax 300SB-C18 com taxa de fluxo de volume de 400 nL/min, usando um gradiente de 0,2% ácido fórmico e 3% de acetonitrila a 0,2% ácido fórmico e 50% de acetonitrila em 60 min. A identificação dos peptídeos foi realizada com experimentos de fragmentação MS/MS em um analisador de massas do tipo *ion trap* em um espectrômetro (XCT-Ultra, Agilent) equipado com uma fonte de ionização ortogonal *nanospray*. Os dados de MS/MS foram interpretados usando o software *Spectrum Mill MS Proteomics Workbench (Version A.03.03, Agilent)* estipulando: (1) 2 clivagens não realizadas e buscando os dados no *Swiss-Prot Database for human proteins (Version 14.3 containing 20.328 entries)*, (2) o desvio de massas de 1,5 Da para o precursor, (3) uma tolerância de produto de massa de 0,7 Da, e (4) intensidade de pico mínima combinada de 70%. A carbamidometilação de cisteínas foi fixada como única modificação possível.

3.11 Homogeneização do tecido cerebral

O tecido congelado foi cortado em pedaços pequenos, colocado em uma peneira com tamanho de poro de 0,25 mm, levemente umedecido com o tampão 1 (25 mM HEPES pH 7,4, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0,1% tween 20 e 0,5% NP-40) ou 2 (50 mM tris/HCl pH 8, 150 mM, 1% triton X-100, 1% desoxicolato de sódio e 0,1% SDS) e esmagado com o auxílio de um êmbolo de seringa descartável. A solução resultante foi centrifugada (5.000 rpm, 30 min, 4 °C) e o sobrenadante foi

recuperado, aliquotado e estocado à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Aliquotas frescas foram utilizadas no experimento de imunoprecipitação. A concentração de proteína total do lisado obtido com o tampão 1 foi $3\text{ }\mu\text{g }\mu\text{L}^{-1}$ e do obtido com o tampão 2 foi $5\text{ }\mu\text{g }\mu\text{L}^{-1}$. O lisado com o tampão 2 teve quantidade maior de proteína total, pois o pedaço de tecido foi maior.

3.12 Imunoprecipitação

Foi adicionado um volume de lisado correspondente a $800\text{ }\mu\text{g}$ de proteína total em tubos de $1,5\text{ mL}$ e o volume foi ajustado para $700\text{ }\mu\text{L}$. Num experimento, o anticorpo primário anti-iPLA2 foi incubado diretamente no lisado por 1 hora à $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ e, após, a mistura foi incubada *overnight* com a proteína A/sepharose. Em outro a proteína A/sepharose foi incubada por 1 h com o anticorpo, o complexo proteína A sepharose/anticorpo adicionado ao lisado e incubado *overnight*. Todo processo foi executado à $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ e em um agitador rotatório de tubos. Após a incubação, o sobrenadante foi descartado e o complexo proteína A/sepharose/anticorpo/proteína foi lavado 4 vezes com o respectivo tampão de lise com uma concentração de detergente 10 vezes menor. Após a lavagem, foi realizada a eluição das proteínas pela adição de $40\text{ }\mu\text{L}$ tampão de amostra com SDS e agitação por 3 h à temperatura ambiente. A amostra eluída foi separada em SDS-PAGE e as possíveis proteínas de interesse visualizadas após o *Western blot*.

3.13 Eletrotransferência e transferência por difusão

Eletrotransferência – A membrana, os filtros e o gel foram mergulhados no tampão de transferência por 15 min e em seguida montamos o sanduíche na cuba de transferência semi-seca (BioRad): filtro, membrana, gel, filtro, tendo o cuidado de não deixar bolhas entre as camadas. As condições de eletroforese foram: 1 hora, diferença de potencial constante de 20 V para 1D-PAGE; 1 hora, diferença de potencial constante em 20 V e corrente variando entre 400 a 300 mA para 2D-PAGE. Após a eletrotransferência a membrana foi corada com Ponceau e o gel com coomassie, para verificar a eficiência da transferência.

Transferência dos géis de focalização por difusão – A membrana de nitrocelulose, a fita com as proteínas focalizadas e o filtro foram mergulhados no tampão de transferência por 5 min e em seguida montado um arranjo como indicado na Figura 8. Após decorrer 12 h, a membrana foi corada com *ponceau* e a fita foi corada com coomassie.

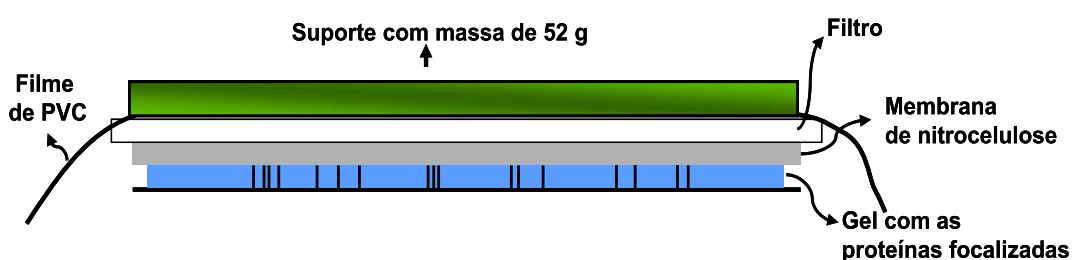


Figura 8: sanduíche montado para a transferência das proteínas do gel de focalização para a membrana, por difusão.

3.14 Western Blot

A membrana de nitrocelulose foi bloqueada com leite em pó desnatado a noite inteira a 4 °C. Após a hidratação, foi lavada com T-TBS 4 vezes de 5 min cada. Os anticorpos primários anti-iPLA2 GVI (Santa Cruz), anti-iPLA2 GVI (Upstate), anti cPLA2 GIV (cell signaling) foram diluído em T-TBS com 1% de leite em pó desnatado (1:1.000), aplicado sobre a membrana e deixado sob leve agitação por 2 h. Em seguida a solução do anticorpo diluído foi imediatamente congelada e a membrana lavada com T-TBS 4 vezes de 5 min cada. O anticorpo secundário anti-IGg de coelho foi diluído em T-TBS com 1% de leite em pó desnatado (1:5.000), aplicado sobre a membrana e deixado sob leve agitação por 2 h. A seguir a membrana foi lavada com T-TBS 4 vezes de 5 min cada e levada para a câmara escura para revelação com o reagente quimiluminescente ECL[®].

4 Resultados e Discussão

4.1 Determinação do método de isolamento de plaquetas

O desenho experimental, juntamente com a amostragem ou fase pré-analítica são as etapas mais importantes na busca de biomarcadores e são determinantes para a obtenção de resultados confiáveis e relevantes. Não basta ter métodos de separação e identificação de proteínas excelentes se o analista não tem o envolvimento com essas etapas. Assim, é importante selecionar os procedimentos minimizando a variabilidade e os erros relacionados à amostragem, bem como o material a ser analisado, doadores do material biológico (pacientes e controles) e o manuseio da amostra. No caso dos doadores, o analista deve participar do processo de seleção e coleta juntamente com o responsável clínico do projeto, discutindo quais os critérios de qualidade devem ser incluídos para se ter amostras representativas e homogêneas da doença a ser estudada.⁷⁸

No presente trabalho, todo o procedimento de isolamento das plaquetas foi realizado por mim, com o cuidado de, na medida do possível, amostrar pares controles/pacientes em um mesmo dia. Todo o processo de coleta e isolamento foi documentado conforme a planilha modelo no Apêndice I. Desse modo, eu tive o controle de todos os detalhes da amostragem, para estar certa de que as plaquetas estariam protegidas de todos os fatores que poderiam desencadear a ativação e a perda de proteínas para o plasma e também evitar a contaminação da amostra com proteínas plasmáticas.

As plaquetas são ótimas matrizes para serem utilizadas em estudos de análise proteômica, pois são anucleadas, podem ser obtidas com alto rendimento e

é relativamente fácil separá-las de outras células do sangue.⁷⁹ O isolamento das plaquetas do sangue deve ser realizado de maneira cuidadosa, pois elas podem ser facilmente ativadas por diferentes processos, sejam eles químicos ou físicos. As plaquetas são fragmentos anucleados de megacariócitos, não possuem DNA, mas possuem mRNA e armazenam proteínas em vesículas. No processo de ativação, a sua fisiologia muda e as proteínas armazenadas são liberadas para o plasma. Se ocorrer ativação durante o isolamento, parte das proteínas são perdidas junto com o plasma durante a separação. Para evitar a ativação, vários cuidados devem ser tomados, tais como: utilizar agentes anticoagulantes, velocidades de centrifugação baixas, evitar movimentos bruscos com o PRP, utilizar agentes inibidores como apirase e prostaglandina E1, utilizar materiais de plástico ou de vidro silanizado para manusear o PRP.

Os métodos de isolamento de plaquetas testados foram dois protocolos de lavagem de plaquetas (Métodos 1 e 2) e a filtração em gel. Na lavagem usamos apirase e albumina como inibidores da ativação (Método 1), sendo que o último constituía um contaminante persistente nas etapas posteriores, conforme foi confirmado ao identificarmos albumina bovina nos *spots* analisados por MS. Por esse motivo, testamos um outro protocolo de lavagem, mais simples e com velocidades de centrifugação mais baixas (Método 2), pois sabe-se que forças de cisalhamento induzem a ativação das plaquetas. Ambos os métodos foram comparados com o isolamento por filtração em gel (Método 3).

Além da análise microscópica, fizemos análise de espectrometria de massas das proteínas extraídas das plaquetas preparadas pelos dois métodos. Várias proteínas relacionadas com o processo de ativação foram identificadas na amostra preparada pelo Método 1 e não na amostra preparada pelo Método 2, corroborando

com os resultados de microscopia obtidos anteriormente e indicando que o Método 2 é mais adequado que o Método 1 para isolar plaquetas para serem utilizadas em estudos proteômicos.

Além desses dois métodos de lavagem, testamos o isolamento de plaquetas por filtração em gel que é um método brando no qual as plaquetas são submetidas às condições menos drásticas. As plaquetas isoladas por esse método foram monitoradas por citometria de fluxo e apresentaram uma morfologia compatível com o estado não ativado e livre de impurezas plasmáticas. No entanto, o custo elevado da fase estacionária utilizada na separação encarece a análise, quando consideramos o isolamento de plaquetas de vários pacientes. Apesar deste inconveniente, o método por filtração em gel fornece plaquetas em ótimas condições para a análise proteômica superando as encontradas na lavagem pelo Método 2 e por isso foi o escolhido para o isolamento das amostras colhidas em pacientes.

4.2 Otimização do preparo de amostra e IEF

O preparo da amostra é uma das etapas mais delicadas da eletroforese em gel bidimensional, porém não é a única. As proteínas que são perdidas neste estágio, não podem ser identificadas e as modificações co-analíticas—aquelas decorrentes do processo analítico ou de manuseio das proteínas—podem nos conduzir a conclusões erradas. Não existe um protocolo de preparo geral que seja ótimo para todas as amostras. Cada matriz é composta por um conjunto de proteínas com características singulares entre si e também interferentes diversos. Desse modo, a primeira parte do trabalho foi a otimização do preparo da amostra.

Foram estudados dois métodos diferentes de lise celular (lise osmótica e lise por ultrassom), dois métodos de concentração de proteínas (precipitação e concentração com filtros), dois modos de aplicação de amostra (aplicação com a solução de reidratação na fita e por *cup loading*). Além disso, algumas modificações foram realizadas na composição do tampão de reidratação e no uso agente redutor utilizado. Essas mudanças visaram a melhoria da visualização dos *spots* obtidos nas regiões mais básicas do gel.

4.2.1 Métodos de lise

A primeira etapa de preparo que a amostra é submetida é a lise parcial (no caso de análise de subproteomas de organelas) ou total (proteínas totais presentes na célula) das membranas celulares.

No início do trabalho as plaquetas eram obtidas pelo método de lavagem 1 e, portanto, tínhamos as plaquetas suspensas em tampão tris-sacarose. Nesse caso, dois métodos são indicados para fazer a lise da suspensão celular: a lise osmótica e a lise por ultrassom. A princípio, o primeiro método de lise foi utilizado, por ser mais brando. Em seguida, a ultrassonicação foi testada e os géis comparados. Conforme observado nas Figuras 9 e 10, podemos perceber que a lise por ultrassom apresentou um maior número de *spots* com relação ao outro método.

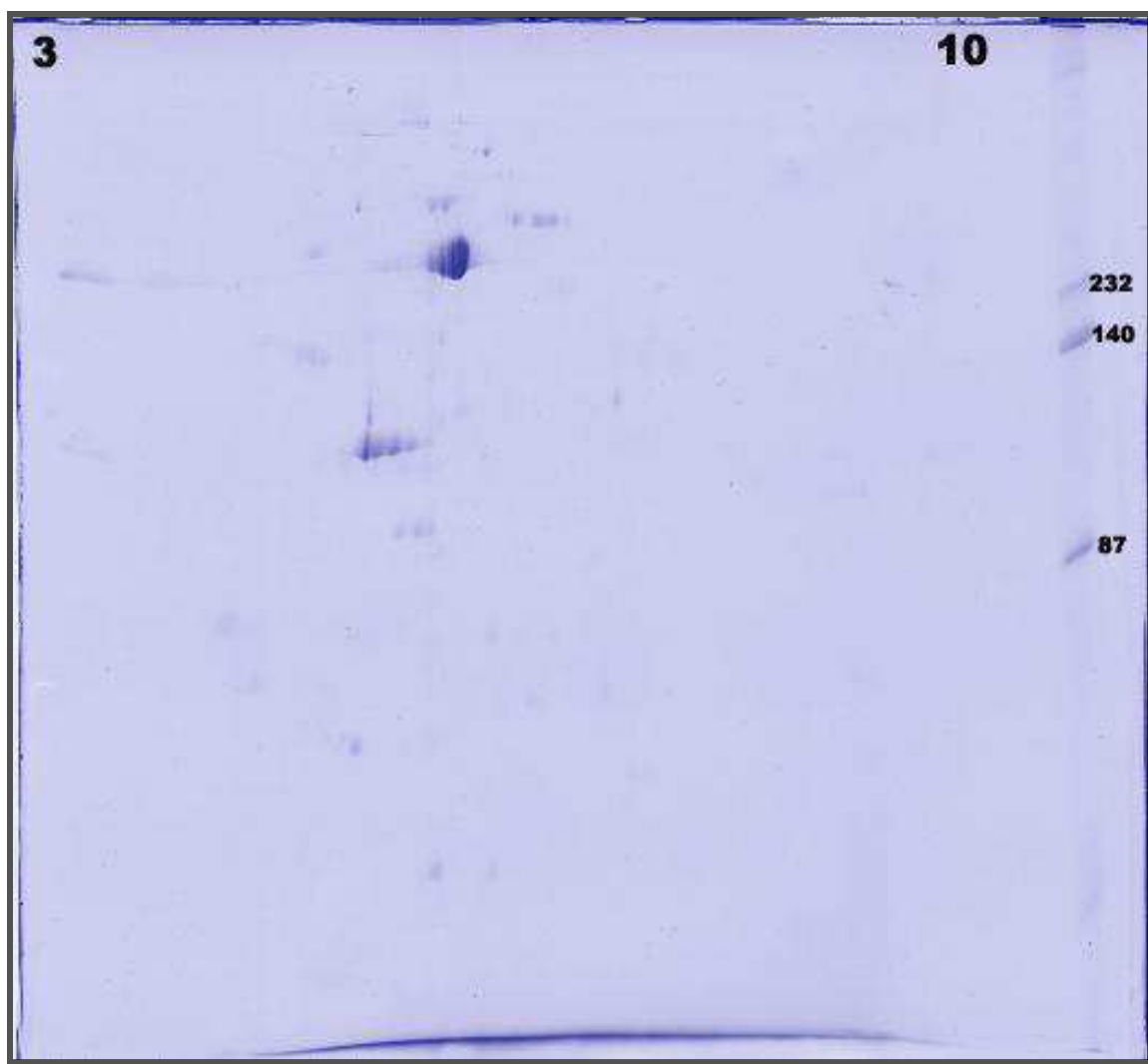


Figura 9: Gel bidimensional 10% da amostra (suspensão de plaquetas) preparada com lise osmótica e concentração com centricon. Condições: IPG *strip* 3-10; rehidratação com a amostra; tampão sem isopropanol e glicerol (normal), corado com *Coomassie blue*.

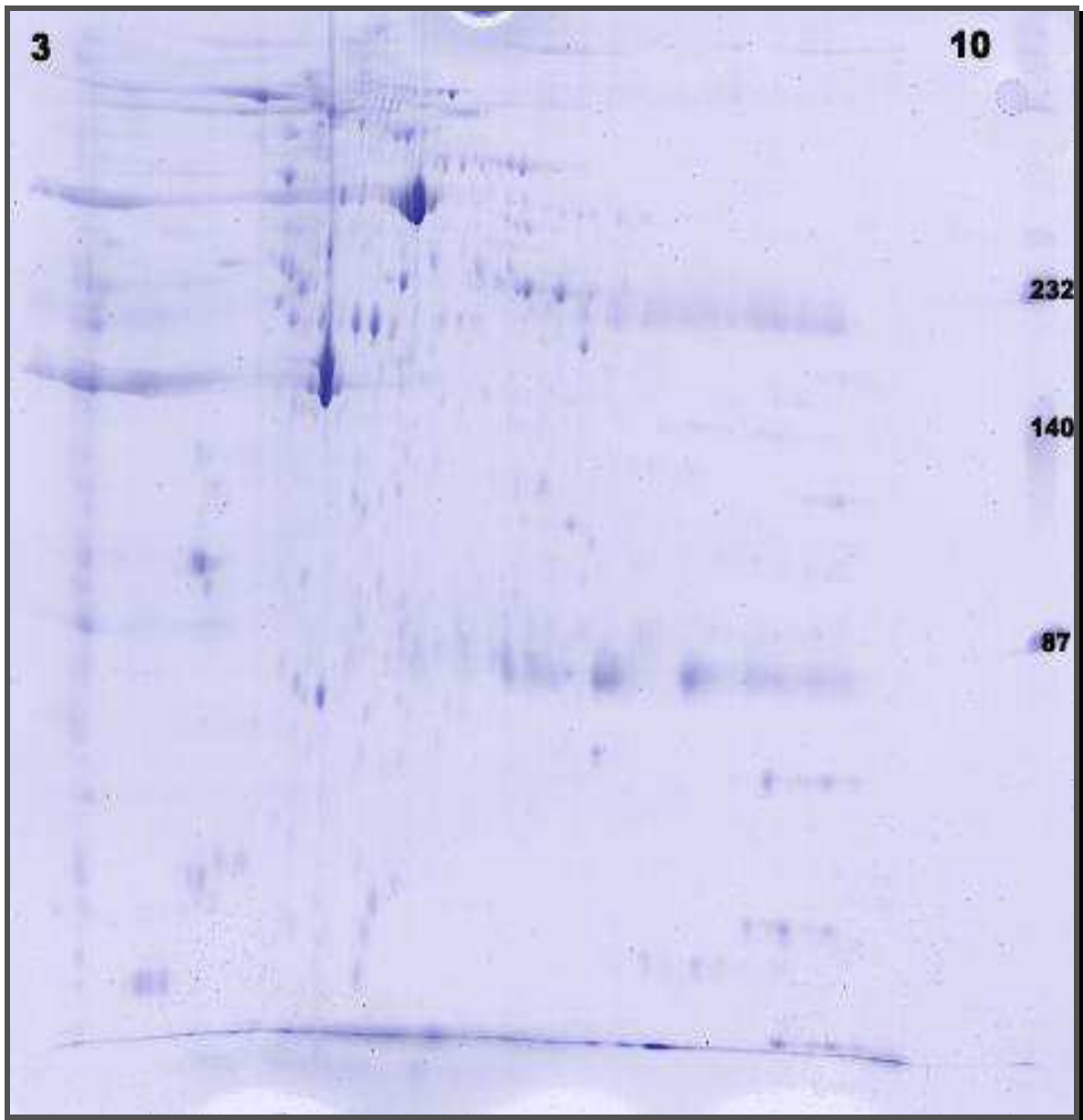


Figura 10: Gel 10% bidimensional da amostra (suspensão de plaquetas) preparada com lise com ultrassom e concentração com centricon. Condições: IPG *strip* 3-10; rehidratação com a amostra; tampão sem isopropanol e glicerol (normal); corado com *Coomassie blue*.

É importante ressaltar que a lise osmótica é feita em uma solução hipotônica enquanto que a por ultrassom é realizada em um meio completamente desnaturante, pois adicionamos junto com a amostra a solução de uréia, tiouréia e CHAPS. Esse meio desnaturante, aliado às ondas ultrassônicas pode promover uma melhor solubilização das proteínas em solução. Isso pode ter ajudado a aumentar o número de proteínas presentes no lisado e, conseqüentemente, o número de *spots* no gel.

Manadas et al.⁸⁰ relataram que a ultrassonicação aumentou a solubilização de proteínas de hipocampo cerebral de ratos, precipitadas com TCA/acetona. A comparação entre a quantidade de proteína na amostra sonicada com a não sonicada mostrou que o tratamento com ondas ultrassônicas foi capaz de aumentar a recuperação de proteínas em 140%, partindo da mesma quantidade de amostra. Assim, não podemos afirmar que a lise é mais completa ou não quando comparamos um método com o outro, mas o fato é que a lise por ultrassom propicia o aparecimento de mais proteínas no gel. Outros autores argumentam que o aumento na quantidade de *spots* pode ser devido a formação de artefatos gerados por reações induzidas pelas ondas de ultrassom.⁸¹ Depois de alguns experimentos confirmando esses resultados, optamos pelo uso do ultrassom como método de lise. Além disso, esse método de ruptura celular ajuda a eliminar alguns interferentes, como os ácidos nucleicos, que são quebrados pelas ondas ultrassônicas. Embora as plaquetas sejam anucleadas e não possuam DNA, elas têm mRNA para a síntese de proteínas específicas que são liberadas no sangue quando são ativadas.⁸² Uma desvantagem do ultrassom é a geração de calor na solução. Esse efeito pode ser minimizado pela execução do processo em gelo e intercalando pequenos tempos de pulso com tempos maiores de descanso. Além desses cuidados, a adição de coquetel inibidor de proteases foi utilizada para garantir a ausência de proteólise.

4.2.2 Métodos de concentração das proteínas

As etapas posteriores à lise celular são a remoção das substâncias interferentes e a extração das proteínas do lisado. Os métodos de precipitação, além de concentrarem as proteínas, eliminam boa parte dos interferentes, porém estão

sujeitos a perdas descontroladas de classes de proteínas dependendo da natureza do agente precipitante. Os métodos de precipitação testados foram: *i*) precipitação com acetona, *ii*) precipitação com etanol, e *iii*) precipitação com clorofórmio-metanol.

O método que utiliza filtros com membranas, concentra as proteínas e mantém constante a concentração dos interferentes. Uma maneira de eliminá-los pode ser realizada se substituirmos o líquido do lisado, contendo os interferentes, por um tampão com baixa concentração salina. Por exemplo, partindo de 500 μL de lisado concentramos até 100 μL . A concentração das proteínas (com massas superiores à massa de corte da membrana) aumentou, pois elas foram retidas enquanto que a concentração dos interferentes se manteve a mesma. Se adicionarmos mais 400 μL de um tampão adequado para manter as proteínas em solução (e livre de interferentes) diluímos os interferentes em 5 vezes. Assim, além de concentrarmos a proteína, também podemos remover os interferentes pela diluição dos mesmos. No entanto, esse método pode ocasionar perdas de proteínas por adsorção na membrana. Os filtros testados foram o CentriconTM e o AmiconTM, ambos com massas de corte de 10 kDa.

Os agentes precipitantes utilizados foram: acetona (Figura 11), etanol (Figura 12) e clorofórmio-metanol (Figura 13). Na média, a quantidade de proteína total da amostra é de 1,5 mg mL^{-1} . Assim, em 150 μL temos uma quantidade de 225 μg de proteína total. A quantidade de proteína aplicada depende do método de detecção utilizado, quanto mais sensível, menor é a quantidade de proteínas que pode ser aplicada. Como utilizamos o corante coomassie blue e uma fita de 13 cm, o indicado pelo fabricante é a faixa de 50 – 240 μg , então, teoricamente, um volume de amostra de 150 μL seria suficiente para a análise. Mas o observado é que com 150 μL de amostra conseguíamos detectar poucas proteínas.

Obtivemos uma quantidade maior de proteína total no precipitado (determinada pelo método de Bradford) quando deixamos a amostra incubada com acetona a noite toda, ao invés de deixarmos duas horas, como recomendam alguns protocolos. Outra observação feita foi que os precipitados (com etanol ou acetona) devem ser lavados no mínimo três vezes, com acetona gelada ou etanol gelado, para remover os sais que podem co-precipitar. Quando o precipitado foi lavado uma só vez, observamos que a IEF foi mais demorada e a diferença de potencial medida nunca alcançava a fixada para a análise, o que pode indicar uma concentração de sal elevada para a análise. Essa co-precipitação de sal pode ser visualizada no gel resultante da precipitação com etanol (Figura 12) através das linhas horizontais que aparecem em maior intensidade do que no gel cujo precipitante foi a acetona (Figura 11), isso porque a solubilidade de sais em álcoois é baixa.⁸³ A precipitação com etanol foi realizada mais rapidamente que a com acetona, porém a qualidade da separação e a quantidade de *spots* são melhores nos géis onde a amostra utilizada foi precipitada com acetona.

A precipitação com clorofórmio-metanol é rápida e o precipitado fica na interface entre as duas fases. É necessário centrifugar e aspirar cuidadosamente com uma micropipeta, primeiro o clorofórmio e depois o metanol, de modo a não perder o precipitado. A Figura 13 mostra o gel resultante desse tipo de precipitação. A qualidade e a quantidade dos *spots* são similares à dos géis cujo precipitante foi acetona, porém, a contagem de *spots* via software mostrou que a acetona apresenta quantidade maior.

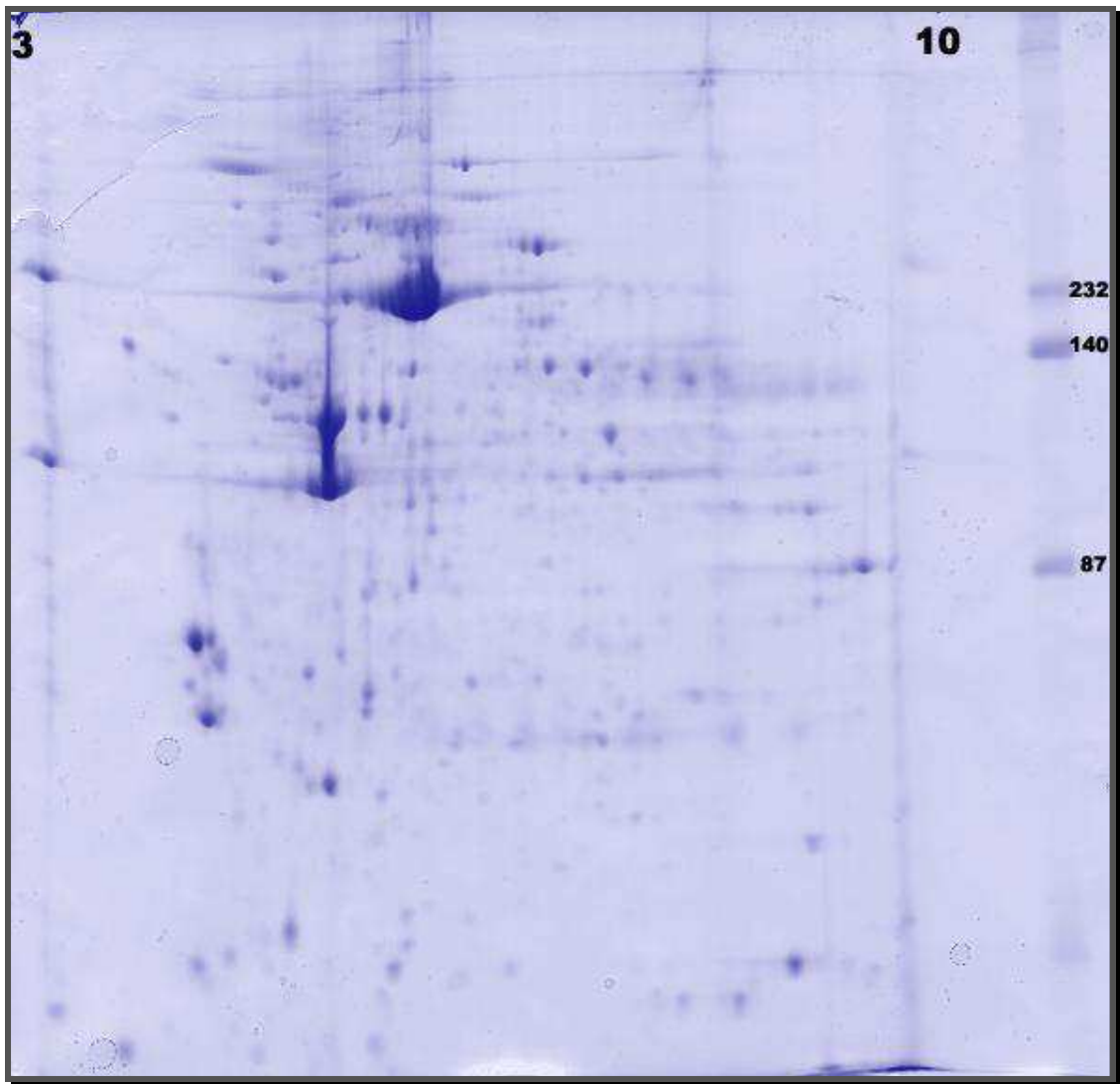


Figura 11. Gel 10% bidimensional da amostra (suspensão de plaquetas) preparada com precipitação com acetona. Condições: IPG *strip* 3-10; reidratação com a amostra; tampão sem isopropanol e glicerol (normal); corado com *Coomassie blue*.

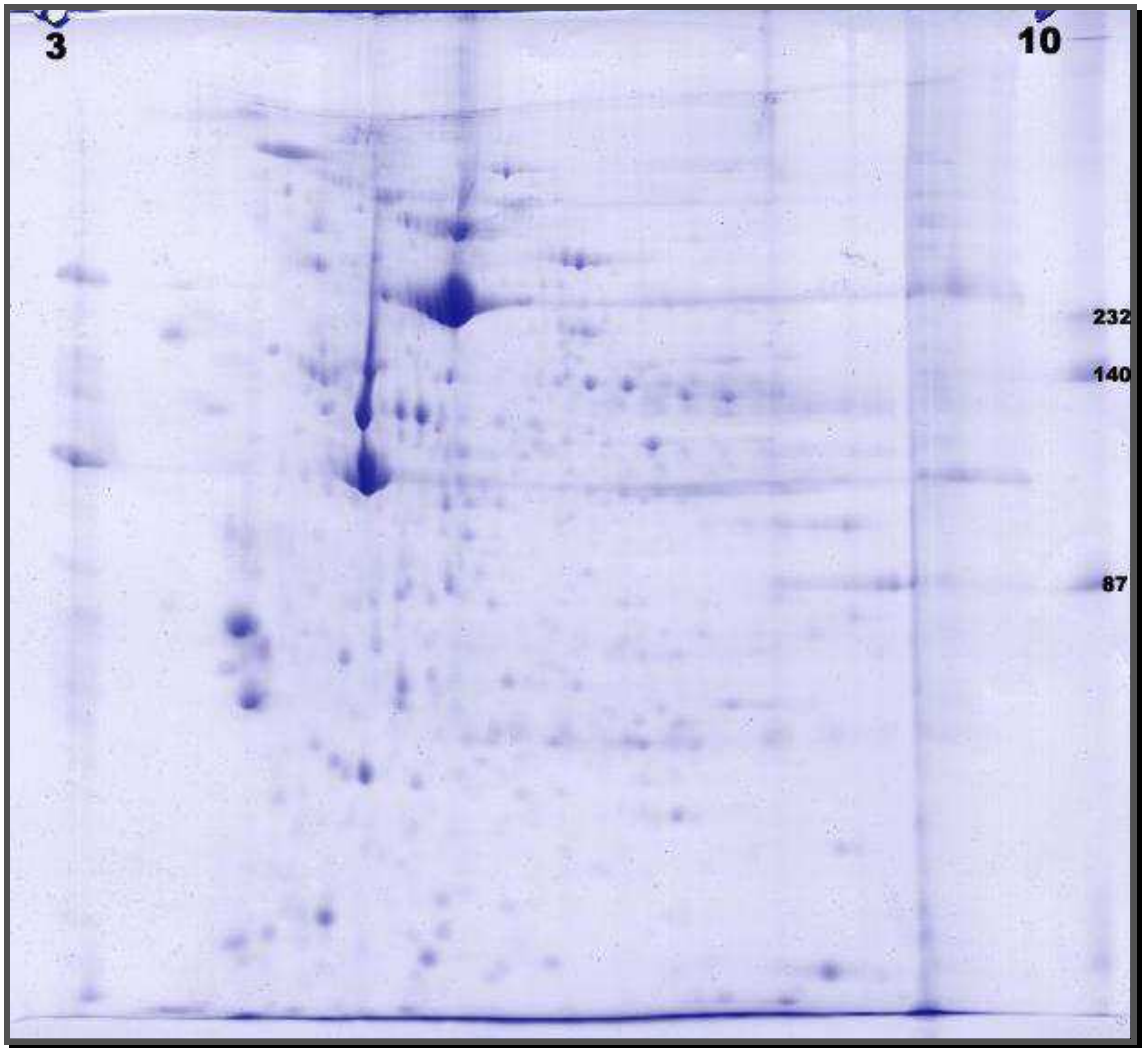


Figura 12. Gel 10% bidimensional da amostra (suspensão de plaquetas) preparada com precipitação com etanol. Condições: IPG *strip* 3-10; reidratação com a amostra; tampão sem isopropanol e glicerol (normal); corado com *Coomassie blue*.

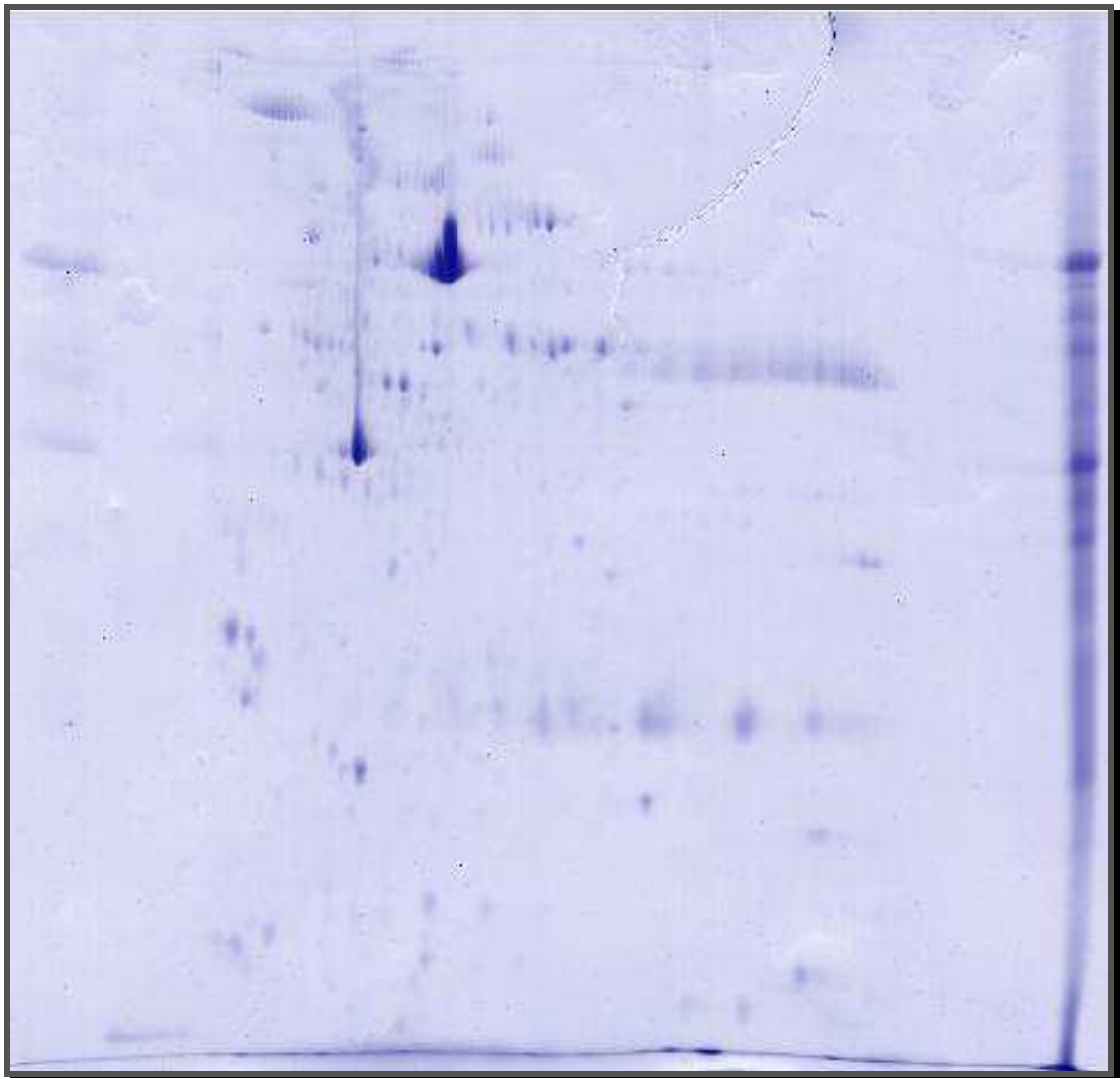


Figura 13. Gel 10% bidimensional para amostra (suspensão de plaquetas) preparada com precipitação clorofórmio metanol. Condições: IPG *strip* 3-10; rehidratação com a amostra; tampão sem isopropanol e glicerol (normal); corado com *Coomassie blue*.

Dos métodos de precipitação testados, o que forneceu precipitados que geraram géis com melhores qualidades foi a precipitação com acetona. Além disso, comparando os procedimentos de preparo do método com acetona com o método com clorofórmio-metanol, o primeiro é mais prático e menos sujeito à perdas, visto que ao aspirarmos o clorofórmio, podemos aspirar a amostra.

Os dispositivos filtrantes CentriconTM e AmiconTM possuem o mesmo princípio de funcionamento, porém a diferença reside na área das membranas em

contato com a amostra. Esses filtros são bastante utilizados para a dessalinização e concentração de amostras de proteínas. Um estudo demonstrou que a dessalinização do fluido cérebro-espinhal humano utilizando a ultrafiltração resultou em uma perda não específica de proteínas situada entre 10 – 30% enquanto que, na diálise clássica, essa perda ficou em torno de 40 – 60%. Tais resultados confirmam a viabilidade do uso da ultrafiltração no preparo de amostras.⁸⁴ Outro estudo comparou diversos métodos de preparo de amostra (ultrafiltração, precipitações com acetona, ACN/TFA, Metanol/clorofórmio e TCA em acetona) para urina humana, mostrando que a ultrafiltração rendeu o gel com maior número de *spots*, tendo uma recuperação superior aos métodos de precipitação.⁸⁵

A amostra utilizada para a obtenção do gel da Figura 14 foi obtida pela concentração do lisado em filtro CentriconTM. Comparando o gel da Figura 14 com os géis das Figuras 11, 12 e 13, vemos uma sensível diminuição na quantidade de *spots*, principalmente na faixa básica, o que é contraditório com os resultados apresentados nos estudos mencionados anteriormente. O lisado estava sob condições desnaturantes, na concentração com CentriconTM. Como a lise foi conduzida em meio desnaturante, o conteúdo do lisado apresenta uréia, tiouréia e detergentes, e as proteínas se encontram quase que completamente desenoveladas, o que pode propiciar uma interação maior com a membrana do filtro, ocorrendo uma adsorção maior que poderia implicar em maior perda de proteínas. Mesmo assim, amostras concentradas com CentriconTM e AmiconTM foram preparadas da mesma maneira e, comparando a Figura 14 com a Figura 15, vemos que a concentração com AmiconTM foi mais eficiente do que a com o CentriconTM. O maior número de *spots* com o concentrador AmiconTM pode ser explicado pelo

formato da sua membrana, que é desenhada para concentrar pequenos volumes de amostra (500 μ L) enquanto que o Centricon™ é para 4 mL.

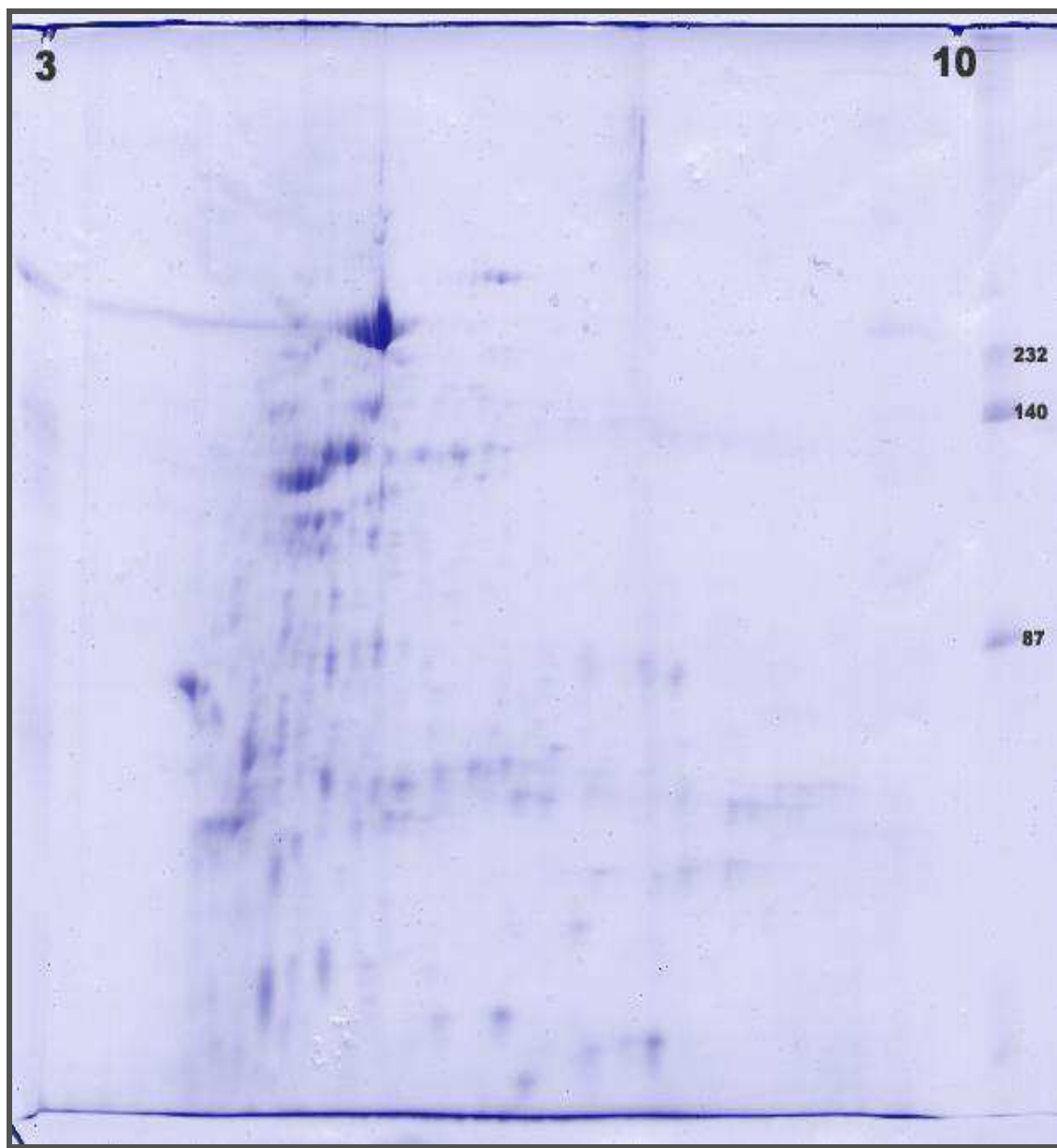


Figura 14. Gel 10% bidimensional da amostra (suspensão de plaquetas) preparada com concentração com Centricon. Condições: IPG *strip* 3-10; reidratação com a amostra; tampão sem isopropanol e glicerol (normal); corado com *Coomassie blue*.

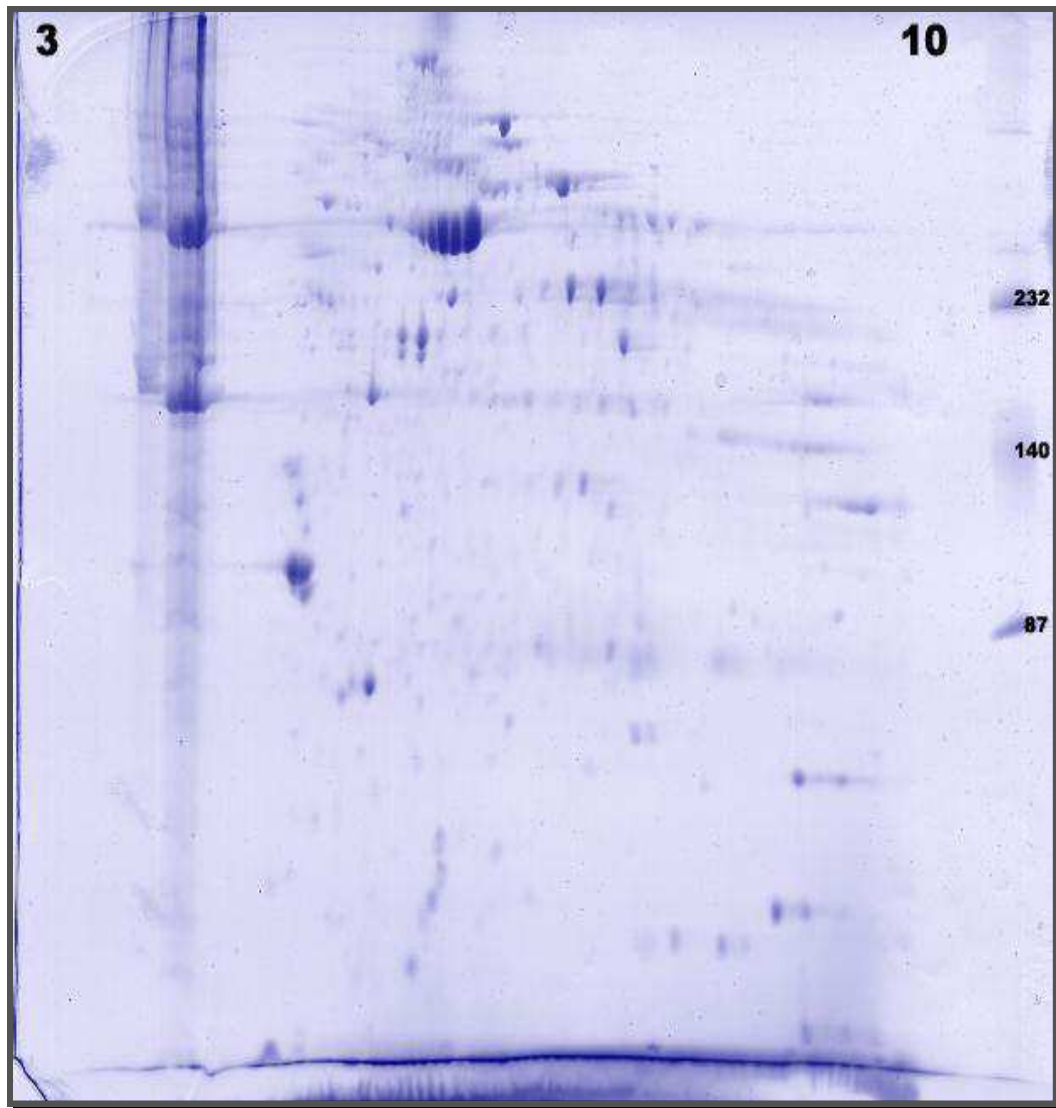


Figura 15. Gel 10% bidimensional da amostra (suspensão de plaquetas) preparada com concentração com Amicon™. Condições: IPG *strip* 3-10; reidratação com a amostra; tampão sem isopropanol e glicerol (normal); corado com *Coomassie blue*.

Uma característica muito interessante e conveniente da técnica de ultrafiltração é que podemos diminuir bastante as concentrações de sais e de interferentes, propiciando condições adequadas para uma boa focalização, o que resulta em um aumento da resolução da separação. Com efeito, empiricamente observamos que todas as análises de IEF que eram realizadas com as fitas cujas amostras tinham sido concentradas nos filtros, apresentavam correntes baixas e sempre atingiam a diferença de potencial estipulada para cada etapa da corrida.

A concentração por precipitação depende das propriedades físico-químicas das proteínas e da relação delas com o agente precipitante. Na precipitação com etanol, por exemplo, ele compete com a água externa pelas ligações de hidrogênio que estabilizam a estrutura das proteínas. Além disso, com mais carbonos no meio, as interações hidrofóbicas serão modificadas provocando uma desestabilização da estrutura. Já a precipitação com ácidos ocasiona uma brusca diminuição do pH promovendo a desnaturação das proteínas. Assim, os métodos de precipitação podem ser utilizados como fracionadores, precipitando determinadas classes de proteínas em uma amostra complexa. Diferentemente, a concentração por ultrafiltração não promove nenhum fracionamento da amostra.⁸⁴

A partir desses resultados, a precipitação com acetona foi utilizada para o preparo das amostras para análise dos primeiros experimentos. Os filtros concentradores passaram a ser tratados com soluções passivantes que proporcionam uma recuperação maior e, também, o lisado passou a ser preparado em meio não desnaturante. Adicionamos coquetel inibidor de proteases em um determinado volume de suspensão de plaquetas, lisamos com o ultra-som, centrifugamos e concentramos. Após tal procedimento, esse concentrado (5 µL) foi diluído em 20 µL de solução de lise (uréia, tiouréia, CHAPS, DTT), sonicado em água gelada e agitado. A vantagem desse método é uma redução drástica no tempo de preparo, passando de duas a três horas, no mínimo, quando precipitamos com acetona, para pouco menos de 1 hora utilizando o MicroconTM e a probabilidade de formação de *spots* artefato é diminuída.⁸⁴

4.2.3 Otimização da IEF na região básica

Como observamos nas Figuras 10 – 14, a região básica do gel além de apresentarem menos *spots*, os poucos que foram visualizados apresentavam linhas horizontais, indicando uma separação não adequada na IEF. A partir disso, resolvemos buscar na literatura alternativas para melhorarmos a quantidade e a qualidade dos *spots* nessa região. Resumidamente, os procedimentos encontrados nos artigos foram *i)* aplicação da amostra via *cup loading* anódico *ii)* uso de agentes redutores alternativos ao DTT ou excesso de DTT no tampão de reidratação, e *iii)* uso de um tampão de reidratação modificado com isopropanol e glicerol. Essas recomendações foram testadas e são comentadas na sequência.⁸⁶⁻⁹¹

Modos de aplicação de amostra

Três métodos de aplicação de amostra antes de realizar a IEF são comumente usados: aplicação junto com a solução de reidratação (*sample in gel rehydration*), *cup loading* e aplicação da amostra utilizando uma “ponte” de papel entre o eletrodo e a fita de IPG. Iremos nos ater mais às duas primeiras técnicas. A Figura 16 mostra um gel onde a amostra foi aplicada no momento da reidratação da fita enquanto que a Figura 17 mostra o gel cuja amostra foi aplicada via *cup loading* anódico.

Comparando as duas Figuras podemos destacar dois aspectos: o padrão de separação global e o padrão de separação na região básica. Analisando globalmente, vemos um padrão de separação melhor na Figura 16, isso porque a maioria dos *spots* aparece na região ácida e o *cup loading* anódico desfavorece a

separação de proteínas ácidas. Em contrapartida, comparando somente as regiões básicas dos dois géis, vemos que a Figura 17 apresenta um número maior de *spots*, embora continue apresentando algumas estrias horizontais em alguns deles. Podemos tentar explicar essa característica da Figura 17 pelo fato de termos usado um gradiente de pH 3 – 10 linear. Se tivéssemos usado um gradiente com uma região básica mais extensa, talvez observássemos uma separação melhor, visto que esse método de aplicação é recomendado para regiões muito básicas ou muito ácidas (*cup loading* catódico). Como todos os outros testes foram realizados utilizando esse gradiente, nós o mantivemos constante para não introduzirmos mais variáveis nas medidas feitas. Além disso, a presença de linhas horizontais pode indicar precipitação de algumas proteínas da amostra. No caso da aplicação via *cup loading*, a amostra é aplicada pontualmente em uma região do gradiente de pH da fita. As proteínas que possuem seus *pI*'s próximos a essa região do gradiente têm uma mobilidade e uma solubilidade menor e, por isso, tendem a precipitar.⁹² A partir destes resultados, podemos confirmar que a aplicação via *cup loading* anódico confere uma melhoria na separação das proteínas na região básica do gel.

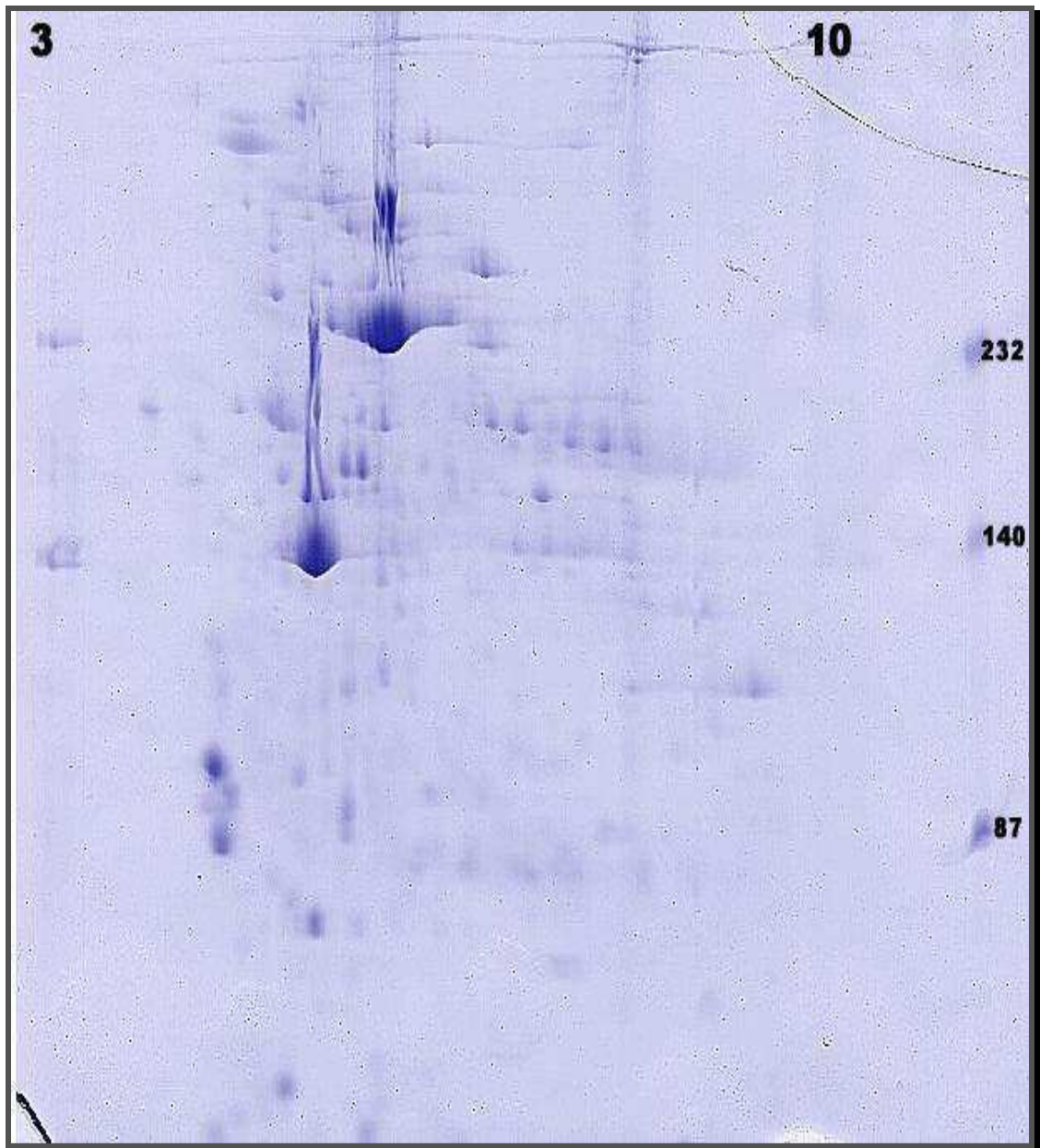


Figura 16. Gel 10% bidimensional da amostra (suspensão de plaquetas) preparada com precipitação com acetona. Condições: IPG *strip* 3-10; reidratação com a amostra; tampão sem isopropanol e glicerol (normal); corado com *Coomassie blue*.

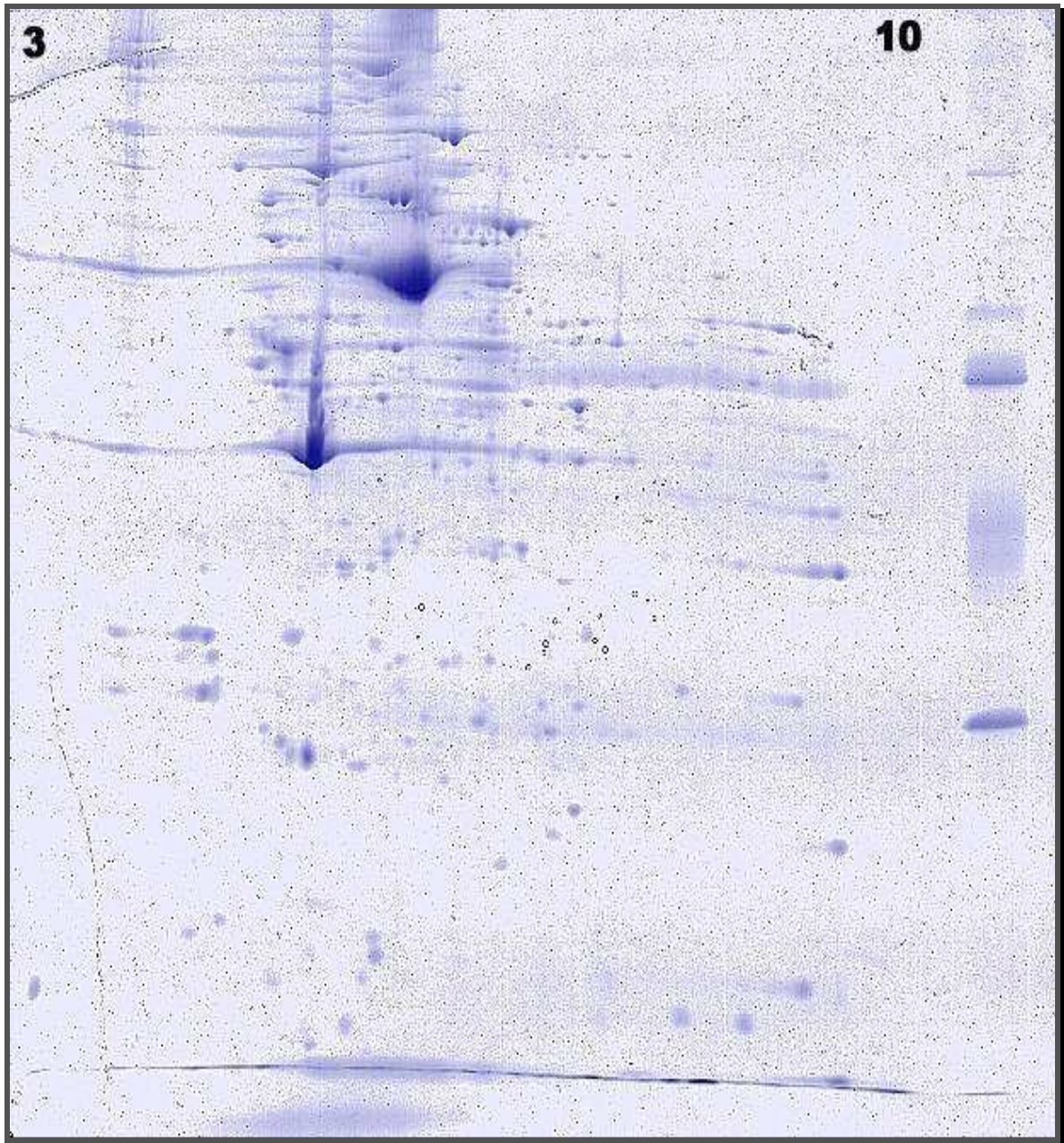


Figura 17: Gel 10% bidimensional da amostra (suspensão de plaquetas) preparada com precipitação com acetona. Condições: IPG strip 3-10; *cup loading* anódico; tampão sem isopropanol e glicerol (normal); corado com *Coomassie blue*.

4.3 Avaliação da solubilização das proteínas de interesse

O processo de solubilização da proteína alvo é fundamental para a sua separação e posterior detecção da proteína de interesse, pois caso não seja solubilizada, a perda ocorre antes mesmo do processo de concentração e remoção dos interferentes. A solubilização envolve a quebra de vários tipos de interações intermoleculares entre as próprias moléculas do analito e entre o analito e os interferentes. Para atingir tal objetivo, é necessário adicionar ao tampão de extração caótopos, redutores e tensoativos, para ter a completa desagregação dos complexos protéicos e desnaturação das proteínas.⁹³ Essa etapa da análise é muito importante e o primeiro passo a ser dado na análise de 2D-PAGE, quando buscamos uma proteína ou um grupo de proteínas, é verificar se a proteína está presente no precipitado. Isso pode ser feito através de um SDS-PAGE comum e identificação com o anticorpo específico.

Para determinar o método de precipitação mais adequado para recuperar maior quantidade de iPLA2 do extrato de plaquetas fizemos o SDS-PAGE a partir de um mesmo lisado, cujas alíquotas foram submetidas a diferentes agentes precipitantes (TCA, acetona, etanol, clorofórmio-metanol, TCA-acetona).

A Figura 18 mostra os géis antes e depois da eletrotransferência e a membrana marcada com o anticorpo anti-iPLA2 GVI. Inicialmente, vemos que o tampão de lise está extraíndo a iPLA2 e o que difere é a eficiência do agente precipitante. Observamos que nas precipitações utilizando TCA as bandas aparecem fracas e com TCA/acetona quase não aparecem. Talvez porque ficou algum resquício de ácido no precipitado e isso tenha atrapalhado eletroforese, ou porque não é um bom agente precipitante para a iPLA2. Os demais agentes

precipitantes e o concentrador mostraram resultados satisfatórios e dentre estes, a acetona parece um bom agente precipitante para utilizarmos no preparo da amostra para a análise em 2D-PAGE. Aparentemente, considerando a eficiência da transferência, a acetona rendeu maior quantidade de proteína.

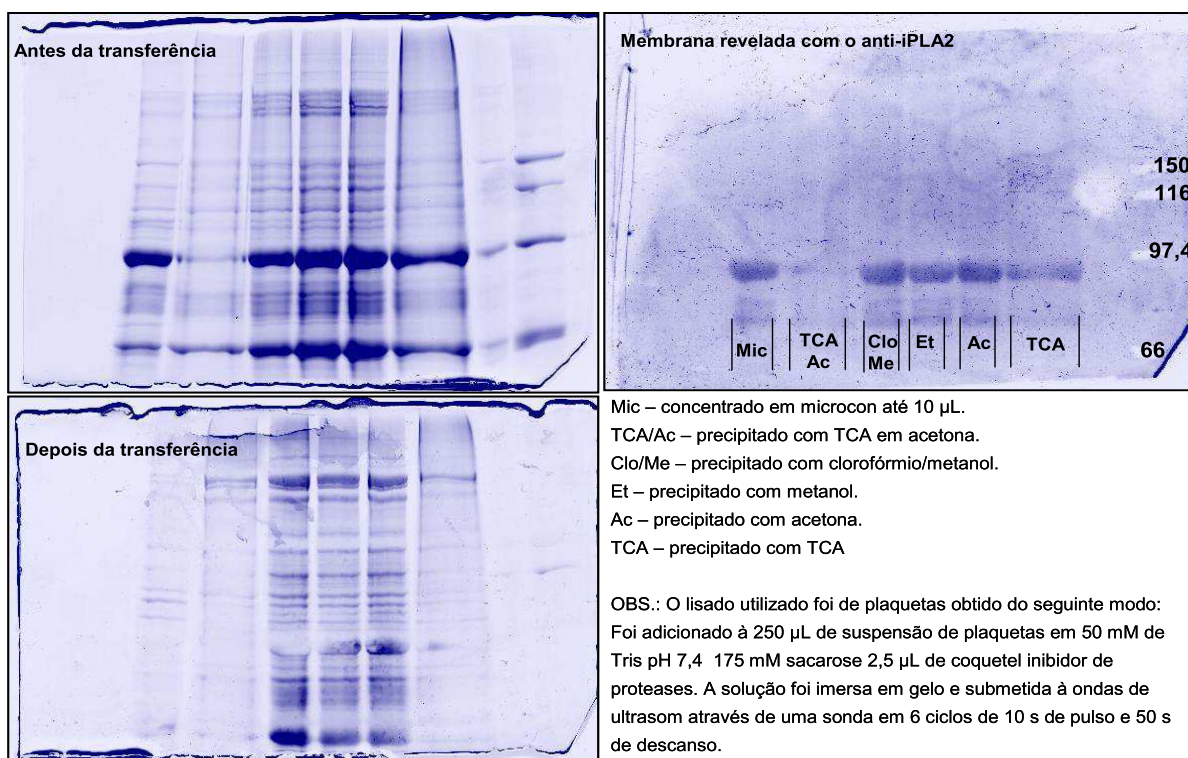


Figura 18. SDS-PAGE do lisado de plaquetas submetido a diferentes agentes precipitantes e separado em gel de poliacrilamida 8%.

Depois de verificarmos a solubilização da proteína de interesse e qual melhor agente precipitante, fizemos a análise completa em 2D-PAGE e a transferência das proteínas para a membrana, porém nenhum sinal foi detectado. A eficiência da transferência foi verificada corando a membrana com *ponceau*. O padrão de proteínas observado na membrana foi o mesmo do gel corado com *coomassie*. Além disso, todos os marcadores de massa molecular do gel 2D-PAGE foram transferidos para a membrana.

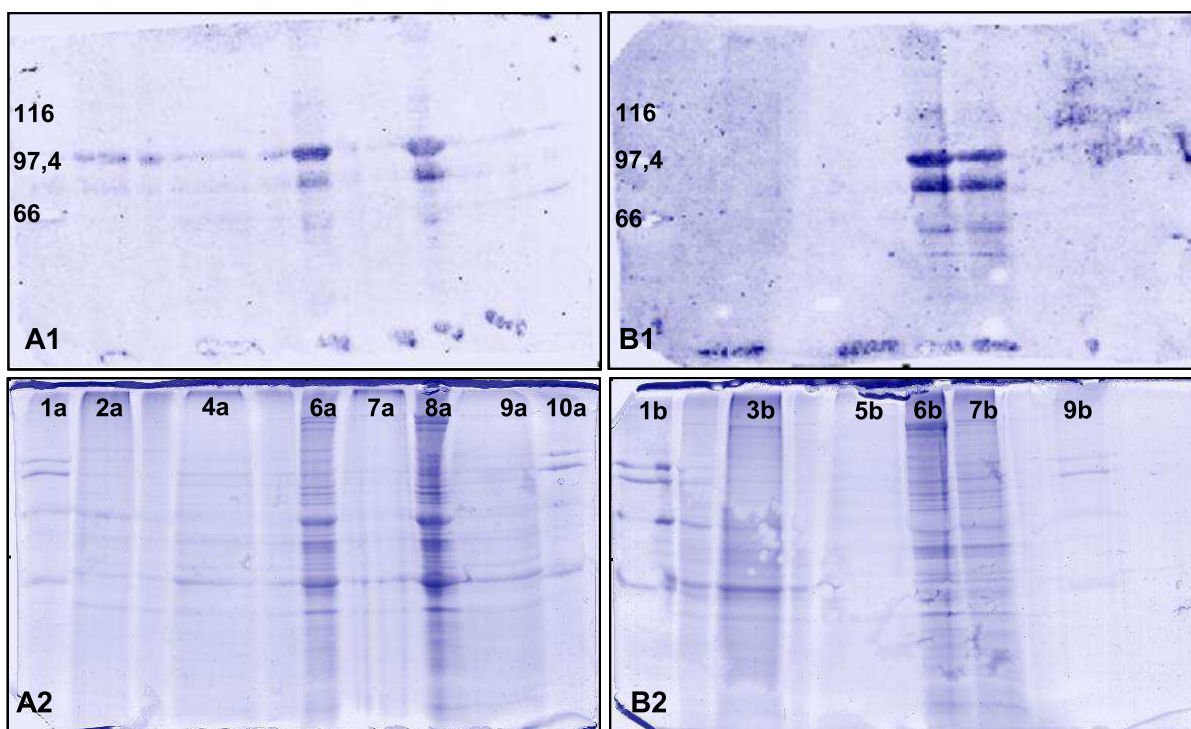
A questão que apareceu foi como conseguimos ver as bandas no SDS-PAGE e não conseguimos ver no 2D-PAGE? A princípio, suspeitamos de algum problema na focalização, pois seria a única diferença entre os dois experimentos. Na realidade não foi a única, as amostras foram preparadas de maneiras diferentes, pois para correr o SDS-PAGE é necessário ferver a amostra, então não foi adicionado o tampão de ressolubilização (vide Apêndice II), que contém uréia e tiouréia.

Para a análise de SDS-PAGE foi usado o preparo 1D: 300 µL de suspensão de plaquetas em tris/sacarose pH 7,4, coquetel inibidor de proteases, sonicação, centrifugação (5.000 rpm, 10 min, 4 °C) e recuperação do sobrenadante. Para a análise de 2DE foi usado o preparo 2D: 126 mg de uréia, 46 mg de tiouréia, 1,8 mg de DTT e 12 mg de CHAPS foram dissolvidos em 300 µL de suspensão de plaquetas em tris/sacarose com inibidor de proteases, sonicação, centrifugação (5.000 rpm, 10 min, 4 °C) e recuperação do sobrenadante.

Considerando a diferença no preparo das amostras, a iPLA2 poderia não estar presente no precipitado, pois quando a amostra foi preparada para a análise de 2D-PAGE (preparo 2D), tínhamos os caótopos e o agente solubilizante junto com a acetona. O fato de altas concentrações de uréia, tiouréia, DTT e CHAPS estarem presentes na acetona poderia proporcionar um ambiente químico apropriado para manter a iPLA2 solúvel. Além disso, no preparo 1D as proteínas foram precipitadas não desnaturadas enquanto que no preparo 2D elas estavam em meio fortemente desnaturante.

Para investigar tal hipótese, realizamos novamente o experimento, correndo o SDS-PAGE com lisados provenientes dos dois modos de preparo. A Figura 19 mostra os géis resultantes do novo experimento. Como verificamos anteriormente,

quando o agente precipitante é o TCA as bandas aparecem muito fracas apenas no preparo 1D (2a) e não aparecem no preparo 2D (4a). Com TCA/acetona (3b e 5b) as bandas da iPLA2 não aparecem em nenhum dos dois preparos, confirmando que este tipo de precipitação não é adequado para a análise de iPLA2. Comparando os poços 6a (acetona 1D) e 7a (acetona 2D) constatamos a ausência das bandas no preparo 2D e a presença no preparo 1D, assim também ocorre nos poços 8a (etanol 1D) e 9a (etanol 2D). Um resultado interessante foi observado comparando os poços 6b e 7b que correspondem às precipitações com clorofórmio/metanol nos preparos 1D e 2D, respectivamente. Verificamos que nos dois casos as bandas referentes às iPLA2 estão presentes.



A1) Bandas reveladas com o anticorpo anti-iPLA2. **A2)** gel depois da transferência: 1a) Padrão; 2a) TCA 1D; 4a) TCA 2D; 6a) Acetona 1D; 7a) Acetona 2D; 8a) Etanol 1D; 9a) Etanol 2D; 10a) Padrão.

B1) Bandas reveladas com o anticorpo anti-iPLA2. **B2)** gel depois da transferência: 1b) Padrão; 3b) TCA/Acetona 1D; 5b) TCA/Acetona 2D; 6b) Clorofórmio/Metanol 1D; 7b) Clorofórmio/Metanol 2D; 9b) Padrão

Figura 19: SDS-PAGE de lisados de plaquetas provenientes dos 2 tipos de preparo, obtidos de diferentes agentes precipitantes e separado em gel de poliacrilamida 10%.

Esses resultados nos provocaram a seguinte reflexão: o objetivo da etapa anterior à precipitação é extrair o máximo possível de proteínas da amostra. Para isso é utilizado uma solução contendo agentes desnaturantes, redutores e solubilizantes para termos certeza de que a proteína estará no lisado. A etapa seguinte é antagônica: agora é necessário que todas as proteínas precipitem. Junto com o agente precipitante também temos os agentes solubilizantes que estão presentes na amostra. Os resultados mostraram que, no caso da iPLA2, não houve precipitação quando os agentes solubilizantes estavam presentes. No caso da precipitação com clorofórmio/metanol, os agentes solubilizantes/caótrofos podem ter sido solubilizados no clorofórmio e, como as proteínas estavam na fase metanol/água, ficaram insolúveis e precipitaram. Assim, passamos a preparar a amostra para o 2D-PAGE precipitando com clorofórmio/metanol utilizando os preparos 1D e 2D e com acetona utilizando o preparo 1D.

4.4 Eletroforese em gel bidimensional e imunodeteção com anti-iPLA2

Após determinado o método de extração da iPLA2 e a otimização das condições de detecção com o anticorpo anti-iPLA2 (Santa Cruz *Biotechnology*) em 1D SDS-PAGE, começamos o experimento de *Western blotting* do gel bidimensional. Após várias tentativas não detectamos nenhum sinal da iPLA2. A transferência e as condições de incubação com os anticorpos foram confirmadas e a partir de uma mesma amostra fizemos um gel 2D e 1D e, novamente, detectamos o sinal da conjugação com o anticorpo anti-iPLA2 no 1D e não no 2D. Chegamos a conclusão de que a proteína, por alguma razão, não estaria passando para a segunda dimensão, sendo perdida na etapa de focalização ou na transferência da

primeira para a segunda dimensão, visto que já tínhamos comprovado a presença da proteína no precipitado e, assim, tínhamos a certeza de estarmos aplicando a proteína na fita de focalização.

Muitas vezes, as proteínas focalizam, porém não são transferidas de forma eficiente para a segunda dimensão e por isso não são detectadas. Então os experimentos seguintes foram desenhados para se tentar detectar a proteína imediatamente após a IEF. Porém, para efetuar o *blotting* é necessário transferir as proteínas do gel para uma membrana e é justamente nessa etapa em que se encontram as dificuldades, pois a maioria dos métodos de transferência utiliza a eletroforese, que necessita de um meio condutor de eletricidade para transferir as proteínas. Como os géis de gradientes de pH imobilizado vêm suportados em um filme plástico, não é possível fazer a eletrotransferência. Buscamos na literatura outras maneiras para fazer a transferência e superar o problema.

Existem várias estratégias para contornar essa dificuldade e fazer a eletrotransferência: alguns autores inventaram um aparato para remover o filme⁹⁴, deixando só o gel. Outros suportaram o gel em materiais que conduzem a corrente elétrica, como tecido, por exemplo.⁹⁵ No entanto, essas alternativas não eram viáveis no momento, pois não tínhamos condições técnicas para colocá-las em prática. Por isso decidimos utilizar a transferência por difusão⁹⁶, cujo protocolo repetimos parcialmente. Montamos o sanduíche da mesma maneira que o autor, porém os géis, os filtros e as membranas foram submetidos aos mesmos tratamentos que já vínhamos aplicando.

Assim, fizemos um experimento com uma amostra de plaquetas, precipitando com clorofórmio/metanol, solubilizando completamente o precipitado em 500 µL de solução de reidratação e aplicando 250 µL em cada fita com gradiente

de pH 3 – 10 NL. Depois da IEF, uma fita foi submetida à transferência por difusão (fita n^o. 76643), conforme a Figura 8 (Métodos experimentais, p. 72). Terminada a transferência, foi corada com *coomassie*. A Figura 20 mostra a fita n^o. 76643 corada com *coomassie* e a membrana revelada com anticorpo.

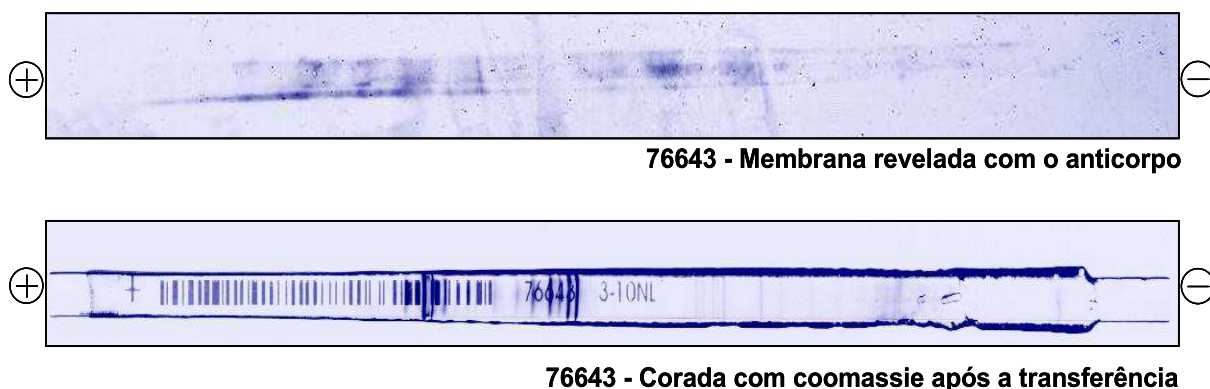


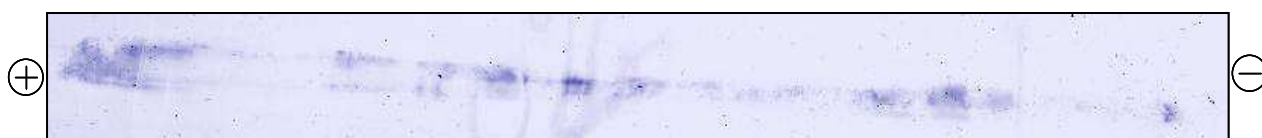
Figura 20. Na parte superior a fita n^o. 76643 submetida à IEF, transferida por difusão para a membrana de nitrocelulose e incubada com o anticorpo anti-iPLA2 (Santa Cruz). Na parte inferior a imagem da mesma fita corada com *coomassie* após a transferência das proteínas para a membrana.

Observamos várias bandas no gel corado com *coomassie* que não foram transferidas para a membrana (Figura 20). No entanto, quando coramos a membrana com *ponceau* verificamos a presença de bandas. Embora a transferência por difusão não tenha sido completa, algumas proteínas foram transferidas e quando revelamos a membrana, observamos sinais que podem ser interpretados como reação positiva com o anticorpo, indicando a presença da proteína na fita. Experimentos anteriores mostraram que a proteína estava presente no precipitado, então esperávamos observar o sinal da iPLA2 na fita. Assim, um resultado corrobora com o outro.

Uma outra fita (n^o. 76642) foi submetida à segunda dimensão e, após o término da corrida, as proteínas do gel 2D-PAGE foram transferidas para a membrana de *blotting*. A fita (n^o. 76642), recuperada com muito cuidado, foi

transferida por difusão para outra membrana seguindo o mesmo protocolo, cujo resultado está mostrado na Figura 21, onde vemos as bandas da iPLA2 reveladas com o reagente quimiluminescente ECL[®], indicando vestígios da proteína na fita depois de ter corrido a segunda dimensão.

Estes resultados foram o ponto chave do trabalho, pois mostram que a proteína, por algum motivo, fica na fita e não passa para o gel da segunda dimensão. A membrana com as proteínas transferidas do gel 2D-PAGE, também foi revelada com ECL[®], mas nenhum sinal foi observado. A partir desses resultados a suposição de que o problema estava na etapa de focalização ficou mais fortalecida.



76642 – Membrana revelada com o anticorpo

Figura 21. Membrana da fita n°. 76642 revelada com o anticorpo anti-iPLA2, transferida depois da realização da segunda dimensão.

O processo de solubilização das proteínas de interesse é extremamente importante, tanto na etapa de extração, quanto durante a execução da focalização isoeletrica.⁹⁷ Analisando as Figuras 20 e 21, podemos inferir que houve algum problema na focalização que gerou esse padrão irregular de bandas, provavelmente por deficiência na solubilização das proteínas na IEF, que é um ponto frágil dos IPG's.

Nos primórdios da IEF, o gradiente de pH era gerado por anfólitos condutores durante a análise, sob a aplicação do campo elétrico. A IEF-CA apresentava instabilidade do gradiente de pH com o tempo, irreprodutibilidade, limite baixo de quantidade de proteína aplicada, deslocamento catódico do gradiente de pH dificultando a análise de proteínas básicas, etc. Para contornar esses problemas,

foram introduzidos os IPG's, onde o gradiente de pH é formado pela copolimerização de agentes tamponantes com a acrilamida, tornando o gradiente de pH fixo no gel de poliacrilamida. Isso resolveu a maioria dos problemas encontrados nos gradientes gerados pelos CA's e aumentou ainda mais a resolução na separação. O ΔpI na IEF-CA era da ordem de 0,01, com a introdução dos IPG's, o ΔpI chegou a 0,001.^{98, 99}

Juntamente com a grande melhora na resolução, veio o problema relacionado com a interação das proteínas com a matriz do gel que, segundo alguns autores,¹⁰⁰ é o principal responsável pela maioria das dificuldades encontradas na IEF, que são: a não focalização, a precipitação, a transferência pouco eficiente das proteínas do gel de IEF para o gel 2D. A ausência da detecção das proteínas alvo no gel 2D, pode ser ocasionada por algum desses problemas, que são discutidos a seguir.

Durante a IEF, a precipitação pode ocorrer isoeétrica ou não isoeletricamente. A precipitação isoeétrica ocorre por que muitas proteínas quando estão próximas ou no pH correspondente ao seus pI 's, têm a solubilidade diminuída e por isso precipitam. Além disso, Adessi et al.¹⁰⁰ afirmam que no pI , ou próximo dele, existe uma interação maior entre a proteína e a matriz do gel.

A precipitação não isoeétrica ocorre única e exclusivamente por causa da interação das proteínas com a matriz do gel. Embora os relatos que discutem esse tipo de interação sejam dos anos iniciais dos IPG's, muitos outros, anos depois, ainda mencionam esse tipo de problema. É importante conhecermos o mecanismo que governa essas interações justamente para podermos eliminá-los e termos uma IEF melhor.

Existem duas hipóteses que indicam a natureza dessas interações, uma as considera de natureza iônica e outra de natureza hidrofóbica. Segundo Altland et al.¹⁰¹, o gel do IPG pode funcionar como uma coluna de troca iônica, cujas cadeias laterais carregadas imobilizadas (*immobilines*, grupos tamponantes que são copolimerizados com a acrilamida para manter a estabilidade do gradiente de pH) seriam a fase fixa com a qual as proteínas interagem diferencialmente. Os anfólitos condutores (CA's presentes no IPG buffer), que são adicionados junto com a amostra para melhorar a migração das proteínas, competem com elas pelos sítios iônicos de ligação (*immobilines*), funcionando como eluentes, pois, por terem uma afinidade maior com a fase fixa, deslocam as proteínas, deixando-as livre para focalizarem. Essa interação eletrostática com matriz e a baixa concentração de CA's é o que dificulta a focalização das proteínas. A teoria da interação iônica é suportada por três evidências: *i)* os grupos tamponantes estão carregados positiva ou negativamente em um grau variável, dentro de uma faixa de pH e, por isso, podem atuar como sítios de interação eletrostática. Com a diminuição da capacidade tamponante (diminuição da concentração dos *immobilines*) o autor verificou melhora na IEF; *ii)* Os efeitos de adsorção são verificados até mesmo em altas concentrações de uréia, com detergentes, com ou sem CA's; *iii)* a adição de CA's sempre reduz os efeitos de adsorção, sugerindo que os CA's deslocam as proteínas dos sítios de adsorção carregados presentes na matriz do gel. Além disso, os CA's são as únicas espécies iônicas presentes (além das proteínas), visto que as amostras são aplicadas com baixo conteúdo salino, e se tiverem um pouco a mais de sal, este é removido logo no início da focalização. Por tanto, os CA's são os únicos a competirem com as proteínas pelos sítios de adsorção iônicos. Com base nessas três evidências, o autor refuta a idéia de que a interação entre a matriz do

gel e as proteínas seria gerada por interações hidrofóbicas e por ligações de hidrogênio. Conclui afirmando que o uso de altas razões CA's/capacidade tamponante melhora a qualidade das separações em IEF, ou seja, adição de CA's até uma concentração máxima tolerada e de *immobilines* até uma concentração mínima que garanta a estabilidade tamponante, ao longo gradiente, durante o tempo necessário para a focalização. Como estratégia de otimização da separação, recomenda diminuir a capacidade tamponante do gel até 1 meq/pH/L e fazer a análise com e sem a adição de CA's, avaliando assim a real necessidade da adição dos CA's.¹⁰¹

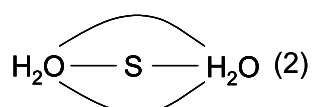
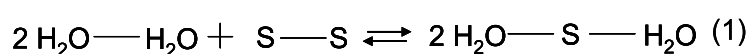
O outro mecanismo é descrito por Rabilloud et al.¹⁰² que afirmam que a interação entre a matriz do gel e as proteínas é devida à interação hidrofóbica e não está associada com a condutividade mínima ou com interações eletrostáticas causadas pela presença dos grupos carregados. Ainda, afirmam que o fenômeno de precipitação é mais geral, não se restringindo somente a proteínas de membrana, abrangendo também proteínas citoplasmáticas solúveis, como a ferritina. Atribuem o efeito a três monômeros *immobiline* básicos de pK's 6,2, 7,0 e 9,3, por terem um formato bifásico, ou seja, dois sítios de ligação com naturezas diferentes: um iônico e outro hidrofóbico.

Os autores mostraram que a interação iônica da ferritina com o *immobiline* (o que ocasionava a precipitação) era causada em condições de força iônica muito alta ou extremos de pH. Depois, modificaram o sítio de ligação hidrofóbico do *immobiline*, primeiramente deixando-o fortemente hidrofílico e posteriormente mais hidrofóbico. Na primeira situação, a precipitação da ferritina não ocorreu, enquanto que na segunda ela foi precipitada ainda mais facilmente. Por fim, argumentam que a adição de CA's ajuda a amenizar o problema, explicando que os CA's

funcionariam como um “escudo” protetor iônico, minimizando as interações hidrofóbicas das proteínas com a matriz.^{102, 103}

As focalizações realizadas por Rabilloud et al.¹⁰² e Righetti et al.¹⁰³ foram conduzidas em meio não desnaturante, ou seja, com a presença de água, pois a amostra aplicada era ferritina de baço de cavalo ou ferritina humana e não citavam a presença de nenhum agente desnaturante. Nos relatos, várias vezes as interações hidrofóbicas foram mencionadas como sendo a causa da interação proteína-matriz, mas ao refletirmos sobre a natureza das interações hidrofóbicas percebemos algo estranho na argumentação.

A interação hidrofóbica resulta da organização das moléculas de água ao redor das porções não polares das cadeias laterais dos aminoácidos que compõem as moléculas de proteínas. O efeito hidrofóbico é originado pela grande magnitude da força de atração entre as moléculas de água que, estando isotropicamente organizadas, deve ser rompida ou distorcida quando um soluto qualquer é dissolvido em água. Se o soluto é iônico ou muito polar, ele pode interagir fortemente com as moléculas de água, compensando a ruptura e a deformação das interações existentes em água pura. Assim, substâncias iônicas ou polares são facilmente solubilizadas em água. Quando temos grupos não polares a compensação não ocorre e, por isso, a sua solubilização em água é dificultada. Considerando as interações intermoleculares, podemos representar a solubilização de um soluto não polar S em água, de acordo com a reação abaixo representada¹⁰⁴:



A grande magnitude da força das ligações de hidrogênio entre as moléculas de água faz com que o equilíbrio representado na equação (1) seja deslocado para a esquerda. Para dimensionar o quão grande é a magnitude dessa força, o produto hipotético formado na equação (1) não chega a romper a interação, apenas causa a sua deformação, ou seja, a interação entre as moléculas existe mesmo tendo o soluto S como interponente (2), considerando o sistema em baixas temperaturas. Para minimizar a interferência do soluto S, a água se organiza ao seu redor formando estruturas semelhantes a uma gaiola, denominadas clatratos, que o aprisionam. Isso ocasiona uma diminuição da entropia no meio aquoso ao invés de diminuir a energia das ligações, desfavorecendo a energia livre do processo de desenovelamento da proteína em meio aquoso.¹⁰⁴

No caso das proteínas, os resíduos de aminoácidos com cadeias laterais apolares são “forçados” a se agruparem nas cavidades internas da macromolécula (cuja natureza é mais apolar, por que reúne os resíduos apolares), justamente para não ocorrer a organização das moléculas de água ao redor dos resíduos e não desfavorecer o processo. Assim, podemos dizer que as interações hidrofóbicas são entropicamente dirigidas e têm uma importante contribuição na estabilidade das conformações das proteínas. O Apêndice III, contém explicações mais aprofundadas sobre a termodinâmica do processo e qual o papel que as interações hidrofóbicas desempenham na estabilidade de uma proteína globular em meio aquoso com base na análise do artigo de Tanford.¹⁰⁵

Supondo que o meio em que os autores fizeram as análises fosse não desnaturante e contasse com a presença de água, e sendo a ferritina uma proteína citoplasmática e solúvel naturalmente os seus resíduos hidrofóbicos estariam escondidos no interior da proteína e os polares expostos ao meio. A interação

hidrofóbica iria atuar escondendo os resíduos hidrofóbicos e, assim, evitando que eles interagissem com os grupos apolares dos *immobilines*. Inversamente, os resíduos polares e iônicos da proteína estariam expostos e prontos para interagir com os grupos iônicos dos *immobilines*, mostrando uma interação eletrostática, e não hidrofóbica como os autores argumentaram. Mesmo que estivessem querendo se referir às interações de Van der Waals ao invés das interações hidrofóbicas, a interação dos resíduos polares e iônicos com o meio aquoso teria uma magnitude muito maior do que a interação de Van der Waals que eles têm com os grupos apolares dos *immobilines*. Em suma, as interações de Van der Waals com certeza teriam uma magnitude bem menor do que as ligações de hidrogênio e o poder de solvatação da água.

Supondo um meio desnaturante, contendo uréia, não é correto falar em interação hidrofóbica, visto que esta é entropicamente dirigida pela organização das moléculas de água, o que não ocorre com a uréia. Não há formação de clatrato na ureia, portanto, os resíduos apolares não precisam ficar “escondidos” no interior da proteína, ocorrendo a desnaturação pela ausência da interação hidrofóbica. E essa é a explicação do poder desnaturante da uréia.

Como os artigos não deixaram claro qual foi o meio em que a IEF foi conduzida, subentendemos que era não desnaturante e a teoria de interação eletrostática de Altland et al. nos parece mais razoável, embora em outros relatos Rabilloud et al. reafirmem que as principais forças responsáveis pela precipitação de proteínas sejam as interações hidrofóbicas e as ligações de hidrogênio.¹⁰⁶

Apesar das divergências quanto à causa do fenômeno, os dois grupos concordam que a adição de CA's melhora a qualidade da análise. Apesar de esse tipo de problema ter se dado no início do uso dos IPG's, essas argumentações não

podem ser desprezadas, sendo muito relevante realizarmos experimentos para tentarmos obter melhores resultados, seguindo essas indicações. Uma das alterações experimentais que já estamos colocando em prática é o aumento da concentração de IPG *buffer* no tampão de reidratação. Porém, a adição de altas concentrações de IPG *buffer* compromete a focalização no sentido de aumentar a condutividade do meio, implicando em aumento do tempo de focalização, o que também não é desejável, pois provoca a oxidação das cisteínas e alteração do pI da proteína que torna a migrar novamente produzindo estrias horizontais.¹⁰⁷

Outro problema que pode ter acontecido é que durante a entrada da amostra no gel de IEF, ocorre um efeito *stacking* causado pela transição entre a fase líquida e a fase do gel, esse efeito aumenta a concentração das proteínas, o que pode provocar a precipitação. [lopez, J.] Isso parece coerente com os resultados mostrados nas Figuras 20 e 21, pois não temos bandas bem definidas nas regiões de pI (entre 6,5 e 7) onde esperávamos encontrar as iPLA2. Como fazemos a aplicação da amostra junto com a reidratação, as proteínas poderiam ter precipitado antes de entrar, isso poderia justificar as bandas esparsas que observamos.

Pode acontecer de ocorrer a focalização das proteínas, mas quando chegam ao ponto isoelétrico, ou muito próximo dele, a solubilidade alcança um mínimo e por isso tendem a precipitar. Uma vez precipitadas, as proteínas não são transferidas adequadamente para o gel da segunda dimensão.¹⁰⁰ É mais provável que os problemas de solubilização estejam impedindo a focalização e, por precipitarem antes de alcançarem a focalização, as proteínas não passam para o gel da segunda dimensão.

As isoformas da iPLA2 que procuramos se encontram no citoplasma ou associadas à membrana. Desse modo, é interessante também considerar as

dificuldades de separação das proteínas de membrana ou mais hidrofóbicas, para podermos explicar a ausência de focalização. Wilkins et al.¹⁰⁸ publicaram um estudo interessante relacionando a hidrofobicidade das proteínas com a sua presença ou ausência no gel. Para fazer uma escala de hidrofobicidade ele considerou o índice GRAVY¹⁰⁹, onde as que têm o valor mais alto e positivo são as mais hidrofóbicas, enquanto que as que têm o valor mais baixo e negativo são as mais hidrofílicas. Analisando os bancos de dados 2D-PAGE, as proteínas identificadas em três espécies diferentes não tinham valores de GRAVY maiores que 0,3. A partir disso, o autor afirmou que proteínas com valores maiores são perdidas durante o processo e por isso não são identificadas.

As isoformas de nosso interesse têm valores de GRAVY (-0,221) isoforma A, (-0,237) isoforma B, (-0,194) ankirina 1 e (-0,248) ankirina 2, que estão entre 0 e -0,5. Segundo o relato, proteínas nessa faixa têm boa probabilidade de serem identificadas, porém quanto mais próximos de zero estão os valores, maiores são as dificuldades. Apesar da isoforma (A) estar associada à membrana, ela não tem um grau de hidrofobicidade muito elevado. Isso pode ser explicado pelo fato de que proteínas que estão ligadas a membrana, mas não a atravessam, não possuem aminoácidos com cadeias laterais apolares em sequência, isso deixa a proteína mais hidrofílica o que diminuem consideravelmente o GRAVY.¹¹⁰ Mesmo que a questão da hidrofobicidade não seja tão crítica, achamos válido fazer modificações nos experimentos, com o intuito de analisar proteínas mais hidrofóbicas¹¹¹.

Para ajudar na solução dos problemas de solubilização durante a IEF, vários relatos apontam o uso de novos reagentes para melhorarem a solubilidade das proteínas durante o processo de focalização, tais como: tiouréia, novas classes de

detergentes, como as amidosulfobetaínas, e agentes redutores, como a tributílfosfina.¹¹²

Com relação aos reagentes redutores, um dos mais populares e usuais é o DTT, sendo considerado melhor do que o β -mercaptoetanol. Porém, em condições de pH mais alcalinas o DTT é ionizado, adquirindo carga negativa ele migra em direção ao ânodo, deixando a região catódica com menor concentração de redutor, o que ocasiona precipitação das proteínas por causa da reestruturação das pontes dissulfeto intra- e intermoleculares. Com relação a esse problema, a tributílfosfina tem mostrado bons resultados pois *i)* não é iônica e por isso não migra durante a eletroforese, *ii)* não contém grupos tióis livres que interferem na segunda dimensão e, *iii)* o equilíbrio das fitas pode ser feito em um único passo.¹¹³ Apesar das vantagens, tem alguns inconvenientes que tornam o seu uso prático dificultado: não é solúvel em água e deve ser adicionada em pequenas concentrações, além de ser tóxica e volátil.¹¹¹

Ainda estamos longe do entendimento completo dos fenômenos envolvidos com a problemática do uso dos IPG's, é necessário mais estudos e, principalmente, mais experimentos para firmarmos uma posição. O interessante dessa discussão, primeiramente, é entender o que pode ocorrer na IEF, para podermos traçar estratégias para melhorarmos a nossa separação e verificarmos onde o problema está.

Modificação da solução de reidratação

Como não tínhamos um agente redutor alternativo ao DTT, que fosse um redutor não ionizável ao longo do gradiente de pH, usamos um papel encharcado com solução de 3,5% de DTT no cátodo. As Figuras 22 e 23 mostram dois géis onde foram aplicadas a mesma amostra preparada da mesma maneira (lisado precipitado com acetona), porém com procedimentos diferentes. Na Figura 22 a amostra foi aplicada no processo de reidratação da fita, o tampão de reidratação não foi modificado (7 mol L⁻¹ uréia, 2 mol L⁻¹ tiouréia, 2% CHAPS, de 0,5% IPG buffer, 0,002% azul de bromofenol) e o DDT não foi adicionado no cátodo. Na Figura 23, foi utilizado o *cup loading* anódico, o tampão modificado (7 mol L⁻¹ uréia, 2 mol L⁻¹ tiouréia, 4% CHAPS, 2,5% DTT, 10% isopropanol, 5% glicerol, 0,5% IPG buffer) e um papel encharcado com solução 3,5% DTT. Embora o conteúdo de proteínas na Figura 22 tenha sido maior na região ácida, os *spots* na Figura 23 foram separados melhor e menos linhas horizontais foram observadas na região básica desse gel.

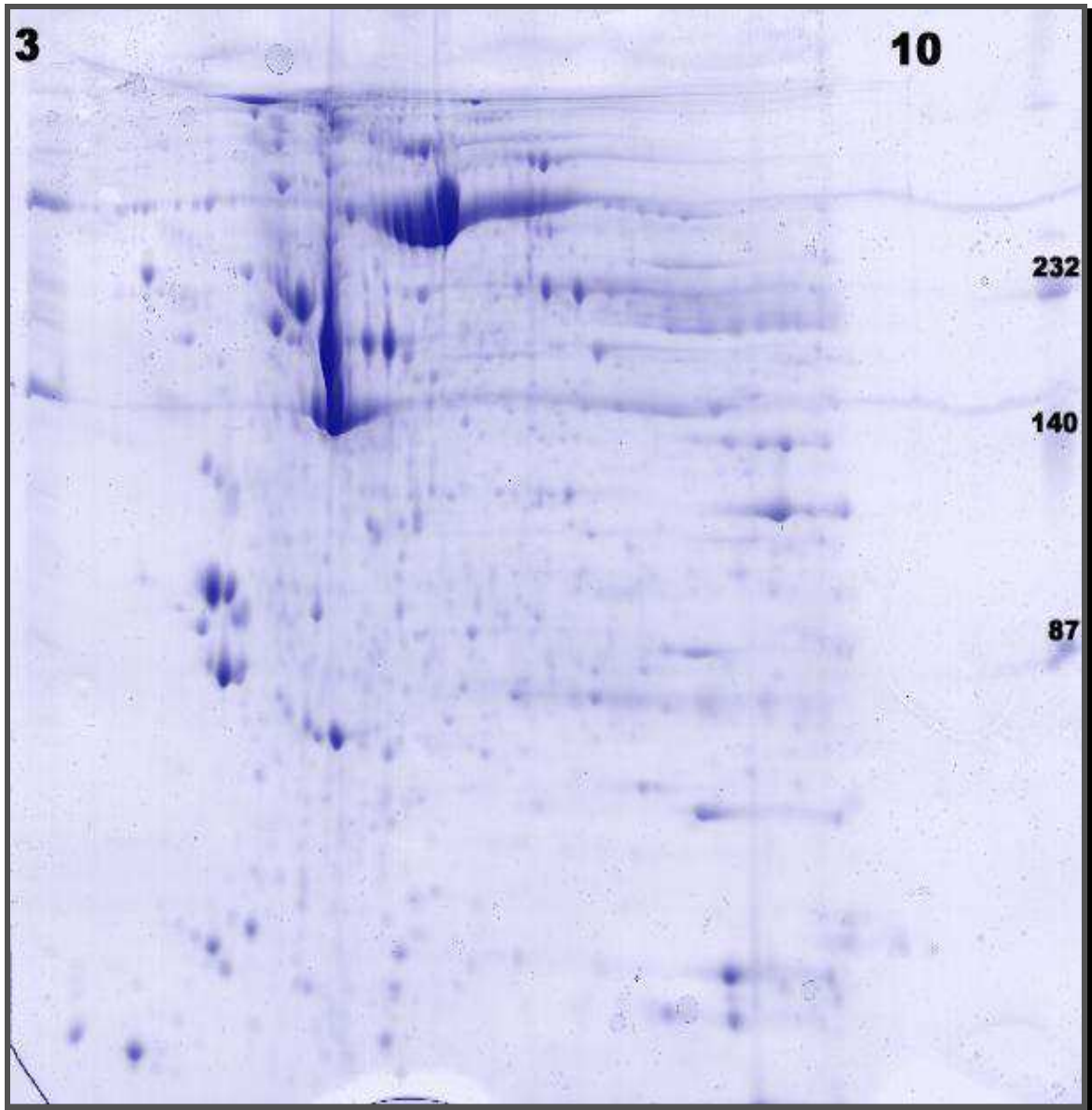


Figura 22: Gel 10% bidimensional da amostra (suspensão de plaquetas) preparada com precipitação com acetona. Condições: aplicação da amostra junto com a rehidração da fita; IPG *strip* 3-10; tampão sem isopropanol e glicerol (normal); corado com *Coomassie blue*.

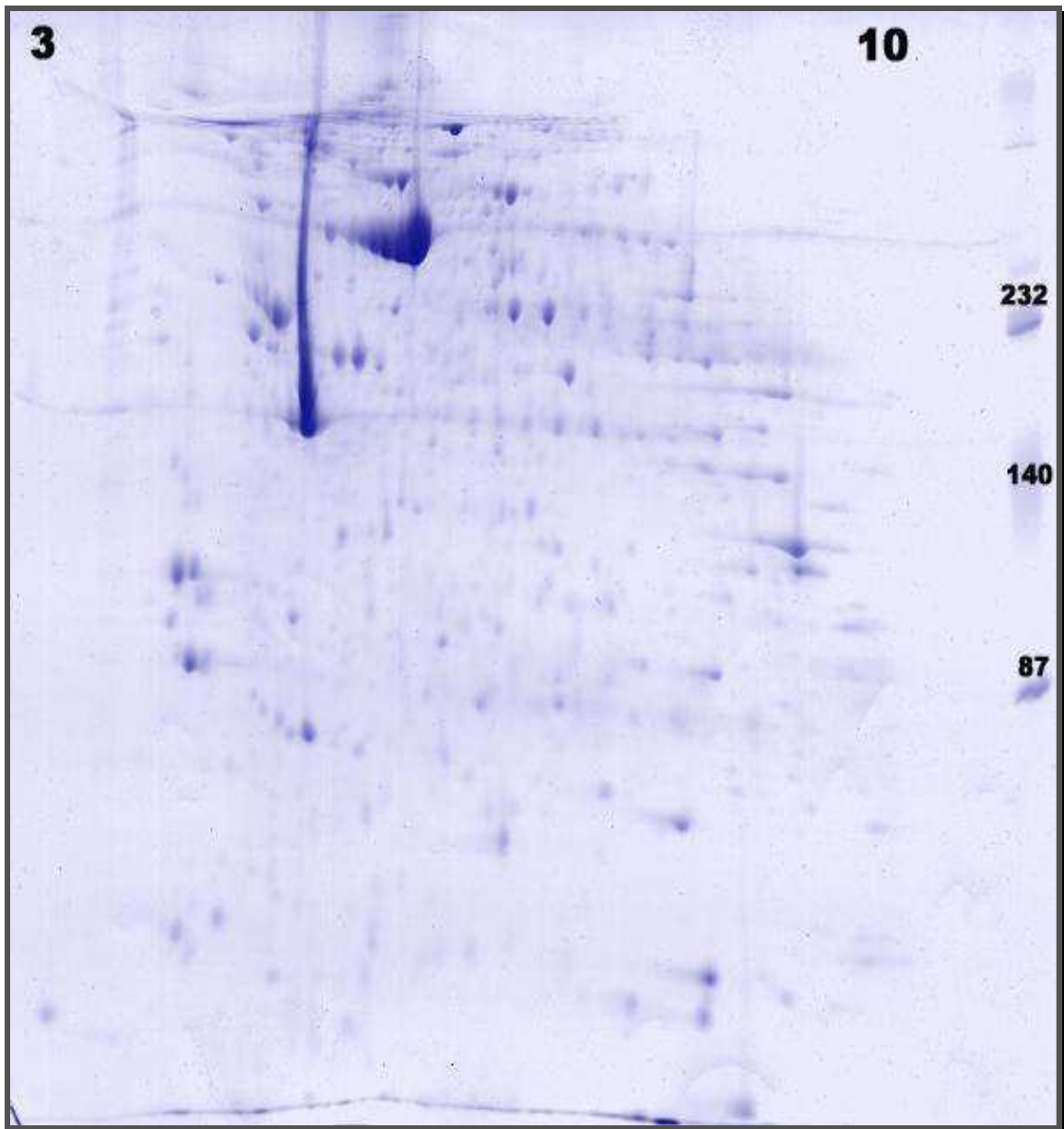


Figura 23. Gel 10% bidimensional da amostra preparada com precipitação com acetona. Condições: aplicação da amostra via *cup loading* anódico; IPG *strip* 3-10; tampão de rehidratação modificado com isopropanol e glicerol; reposição de DTT no cátodo; corado com *Coomassie blue*.

É interessante observar que tanto a Figura 23 quanto a Figura 17, o modo de aplicação da amostra foi o *cup loading*, no entanto temos géis com uma qualidade de separação diferente. Comparando as duas, vemos que o gel da Figura 23 tem padrão de separação melhor que o gel da Figura 17, principalmente na região básica. Podemos atribuir essa melhora às duas modificações feitas no experimento: o uso do tampão modificado (2,5% DTT, 10% isopropanol, 5% glicerol

além dos outros componentes do tampão normal) e a suplementação de DTT no cátodo. O uso do glicerol e do isopropanol na solução de reidratação melhora a focalização das proteínas na região alcalina e, por isso, os *spots* na região básica do gel da Figura 23 são visualizados mais nitidamente, quando comparado com os géis das Figuras 17 e 22.

Em eletroforese capilar a mobilidade do fluxo eletrosmótico (EOF) é inversamente proporcional à viscosidade da solução. No gel de poliacrilamida da fita existem alguns grupos carregados que proporcionam um EOF de pequena magnitude, mas que pode atrapalhar a separação. O isopropanol proporciona um aumento na viscosidade do meio e diminui ainda mais a magnitude do EOF, melhorando a separação. O glicerol deixa a matriz do gel mais flexível, diminuindo o atrito entre a matriz e a solução. Isso reduz o aumento de temperatura local, gerado pelo atrito, e diminui a precipitação de algumas proteínas.⁸⁸

O DTT é um ácido fraco cujo pKa está na região de pH 8-9 e, por isso, em regiões básicas uma parcela das moléculas estão ionizadas com cargas negativas. No momento em que a ddp é aplicada, o DTT começa a migrar do cátodo para o ânodo, deixando deficiente a região onde se encontram as proteínas básicas, ocasionando, assim, a reoxidação dos grupos tióis, fazendo com que as proteínas precipitem. Esse fenômeno pode ser observado nos géis como linhas horizontais, sem *spots* definidos. Pennington et al.⁸⁹ demonstraram a redução dessas linhas quando introduziram um papel encharcado com uma solução de 15 mmol L⁻¹ no terminal catódico da fita. Assim, o excesso de DTT no cátodo impediu que a região básica do gel ficasse com deficiência do redutor. Alternativamente, outro reagente redutor pode ser utilizado, desde que permaneça neutro e não migre durante a eletroforese. Diversos estudos relatam a eficácia do bis (2-hidroxietil) disulfeto

(componente do reagente Destreak™). Alguns testes preliminares que realizamos confirmam a melhora da separação na região básica (dados não mostrados) com o uso do reagente Destreak™. O método com o DTT apresentou resultados bons, porém quanto mais carga migrando no meio de separação, maior é a corrente e, conseqüentemente, maior o aquecimento e menor a qualidade da separação. Como cada amostra é um caso diferente em 2DE, é recomendável usar primeiro a técnica de reposição do DTT e se os resultados não forem satisfatórios, utilizar o reagente comercial Destreak™.

Assim, com o objetivo de minimizar as interações entre as proteínas e a matriz do gel, fizemos modificações na composição do tampão de reidratação, adicionando maior porcentagem de IPG buffer, uma quantidade de DTT muito maior que a recomendada, maior porcentagem de isopropanol e glicerol. A Figura 24 mostra o resultado do experimento obtido a partir da focalização realizada com a nova solução de reidratação (2,5 % de DTT, 20 % (v/v) de isopropanol, 10 % (v/v) de glicerol, 1 % de IPG buffer, 7 M de uréia, 2 M de tiouréia, 4 % CHAPS). Vemos que as alterações promoveram a focalização da iPLA2 e, possivelmente, o que atrapalhava a focalização era a interação com a matriz do gel.

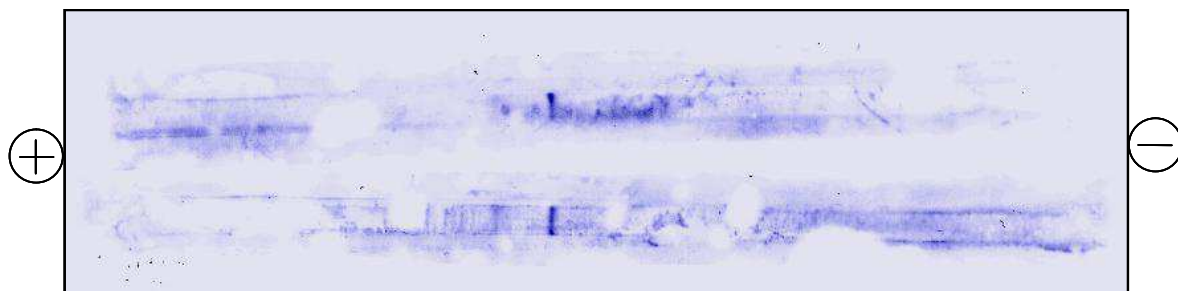


Figura 24: Membrana com as proteínas imobilizadas e identificadas com o anticorpo. IPG 3 – 10, 13 cm, reidratada com a amostra (suspensão de plaquetas) tampão de reidratação modificado com isopropanol e glicerol. Transferência das proteínas da fita para a membrana por difusão.

Agora tendo a certeza da focalização adequada, após o experimento de IEF realizamos a transferência das proteínas da fita para o gel poliacrilamida 10% e realizando a segunda dimensão. Após o experimento de *Western blot*, conseguimos detectar os *spot* que possuem grande probabilidade de serem as isoformas da iPLA2 (Figura 25).

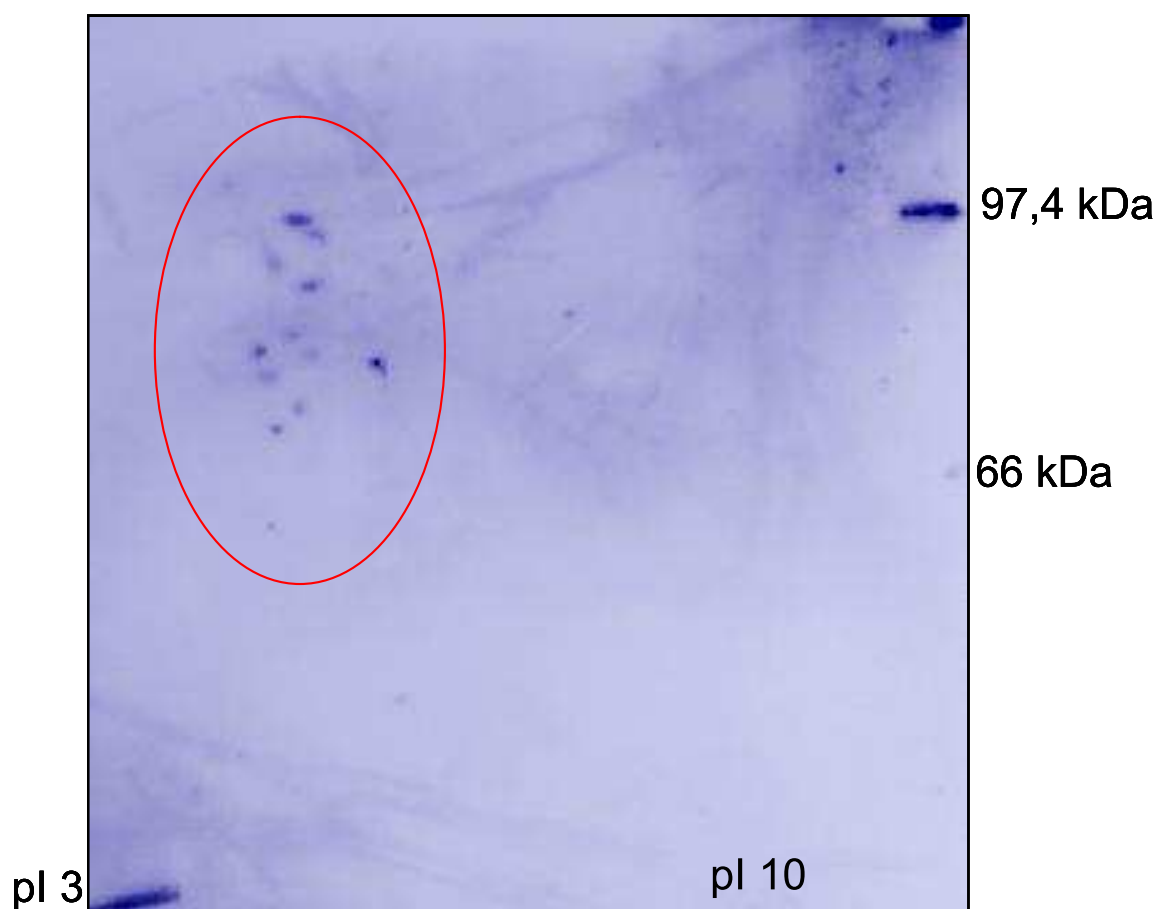


Figura 25: Membrana revelada com o anticorpo anti-iPLA2. Gel 10 %, amostra (suspensão de plaquetas) precipitada com acetona, tampão de rehidratação modificado com isopropanol e glicerol.

A etapa seguinte seria a confirmação da identidade dos *spots* encontrados por espectrometria de massas, porém a quantidade de proteína não foi suficiente para ser detectada no espectrômetro de massas e por esse motivo a abordagem *shotgun* foi usada como alternativa para contornar o problema.

4.5 Análise das proteínas extraídas das plaquetas utilizando *shotgun*

Como a tentativa de identificar a iPLA2 pelos *spots* obtidos na análise 2DE fracassou, possivelmente pela baixa abundância da proteína nas plaquetas, a estratégia *shotgun* foi escolhida para uma nova tentativa da detecção da iPLA2 em plaquetas. Obtivemos as plaquetas pelo método de lavagem, que foram precipitadas por centrifugação e posteriormente solubilizadas em tampão com uréia. Uma alíquota dessa solução correspondente a 50 µg de proteína total foi aplicada em um gel de SDS-PAGE. As proteínas foram separadas, o gel corado com prata e, posteriormente, as bandas (marcação verde Figura 26) foram recortadas e digeridas com tripsina, e sequenciadas por MS/MS.

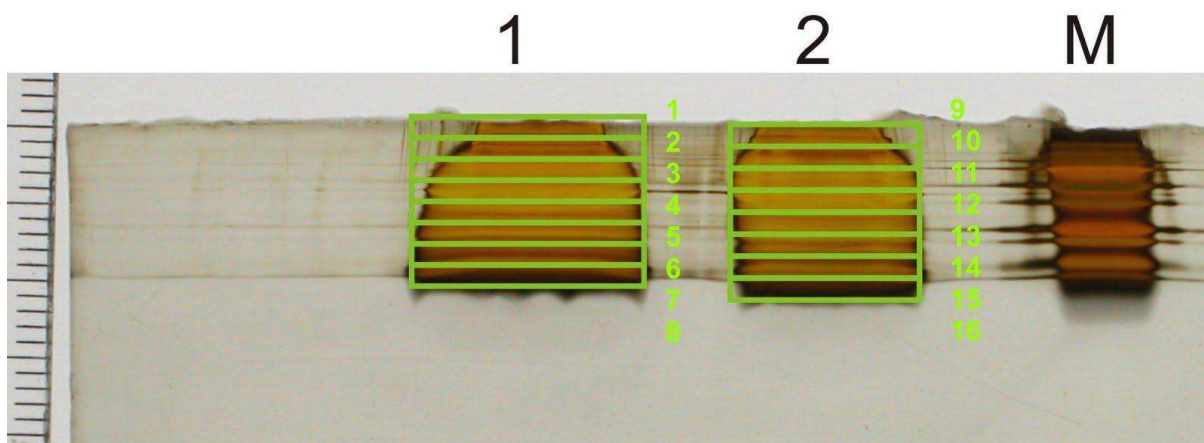


Figura 26: Gel de SDS-PAGE mostrando a pré-separação das proteínas extraídas das plaquetas obtidas e a secção das bandas analisadas.

Dentre as proteínas identificadas não conseguimos identificar nenhuma classe de fosfolipase A2, embora existam vários relatos atestando a presença de diversas classes de PLA2 em plaquetas.^{114, 115} . Apesar de a análise de espectrometria de massas, em especial a abordagem *shotgun*, ter vários aspectos

positivos e vantagens para análise de proteínas, existem fatores que devem ser levados em conta nos experimentos de análise proteômica. De acordo com Aebersold e Domon¹¹⁶, seis parâmetros devem ser considerados em experimentos proteômicos utilizando a MS para detecção: a seletividade^b, o limite de detecção^c, o intervalo ou faixa dinâmica^d (*dynamic range*), a densidade dos dados^e, a repetibilidade^f e a reprodutibilidade^g. Esses parâmetros variam com o tipo de arranjo instrumental utilizado (método de separação prévia, combinação de analisadores de massas, etc) e, por isso, os experimentos devem ser ponderados de acordo com os objetivos/alvos analíticos e a instrumentação disponível para a análise, pois muitas vezes o espectrômetro mais adequado ao experimento não é acessível.

Desses fatores, a seletividade e o intervalo dinâmico, podem ter pesado mais para a falha em identificar as PLA2's usando *shotgun*, que foi realizada em um equipamento com analisador *ion trap*. A seletividade aumenta de acordo com o poder de resolução do analisador, no caso da LC/MS, quanto melhor for a pré-separação dos peptídeos e a resolução do analisador (FT-ICR, orbitrap, TOF), maior será a confiabilidade da medida. Quanto menor o intervalo dinâmico, maior serão as chances de detectar analitos em baixa abundância, contudo, em matrizes complexas, os interferentes e o aumento do ruído de fundo diminuem esse intervalo, prejudicando a detecção e exigindo analisadores e métodos de separação com maiores resoluções, para evitar os efeitos de matriz e supressão da ionização. O

^b A seletividade de um detector é a sua capacidade de diferenciar e quantificar determinado analito em uma mistura sem a interferência dos outros componentes.

^c O limite de detecção é a menor quantidade de analito que pode ser detectada.

^d É o intervalo entre o sinal mais intenso e a menor quantidade de um analito que pode ser detectada numa mesma análise.

^e É o número de medidas obtidas durante um experimento.

^f É a capacidade de um método fornecer resultados iguais, quando o experimento é realizado várias vezes, em um curto intervalo de tempo, sempre mantendo as mesmas condições (amostra, preparo de amostra, parâmetros de análise, analista, etc).

^g É a capacidade de um método fornecer resultados iguais quando se utiliza o mesmo método na mesma amostra, porém em condições diferentes (analista, equipamento, laboratório, etc).

intervalo dinâmico pode ser aumentado com o uso de equipamentos com analisadores onde os íons chegam ao detector em feixe, como o quadrupolo, e diminuído em equipamentos que aprisionam os íons, como o *ion trap*.¹¹⁶ Assim, pode ser que o sistema de detecção não tenha sido otimizado para a detecção das PLA2's, por não estarem em grande quantidade na amostra.

A partir desses resultados podemos concluir que a detecção de proteínas com baixa abundância não é um problema exclusivo da 2DE, e pode ser observado nas análises de MS, o grande problema é a faixa dinâmica das proteínas em amostras biológicas. Evidentemente, a MS possui mais parâmetros que podem ser variados e otimizados para a detecção de tais proteínas do que a 2DE, no entanto, é um equívoco restringir essa limitação somente a 2DE.

4.6 Estabelecimento de um método de isolamento de iPLA2 utilizando imunoprecipitação

Com a dificuldade da detecção da iPLA2 tanto usando a 2DE/MS quanto a LC/MS, nos pareceu razoável usar uma técnica de enriquecimento do analito em etapa prévia no preparo da amostra. A técnica de imunoprecipitação foi escolhida para fazermos a análise qualitativa de iPLA2, pois existe a produção de mRNA da iPLA2 em plaquetas humanas (informação obtida da Prof. Dr. Maria Zellner).

A imunoprecipitação é uma técnica que permite o isolamento do antígeno pela ligação dele ao respectivo anticorpo imobilizado em uma matriz que pode ser separada da solução do lisado facilmente. Os anticorpos podem ser imobilizados de forma não covalente, pela adsorção na proteína A/agarose ou proteína G/agarose ou serem covalentemente ligados a uma matriz em fase sólida.

Como controle positivo utilizamos tecido cerebral, visto que a presença da iPLA2 em tecido cerebral é bem documentada. O tecido cerebral foi homogeneizado em dois tampões com composição de detergentes para ver o efeito do tipo de detergente na extração da iPLA2 do lisado. O tampão 1 foi preparado com Tween/NP-40 e o 2 com SDS/Triton x-100. Além da variação dos tampões, estudamos duas maneiras diferentes de proceder a imunoprecipitação: o primeiro incubando o lisado com o anticorpo e só depois adicionando a proteína A imobilizada em sepharose; e o segundo incubando as esferas de proteína A imobilizada em sepharose com o anticorpo e só depois adicionando o lisado.

A Figura 27 mostra o SDS-PAGE feito das proteínas eluídas após a imunoprecipitação. As bandas de interesse estão entre 75 e 100 kDa, além dessas bandas vemos outras que se ligaram inespecificamente ao anticorpo. Não encontramos grandes diferenças com relação ao tampão de lise nos experimentos 1 e 2, porém em 3 e 4 verificamos que as bandas de interesse são mais intensas quando utilizamos o tampão 1 com Tween 20 e NP-40. Analisando-se em termos de especificidade, o método de incubar a sepharose com o anticorpo (Figura 27, poços 3 e 4) foi melhor, pois apresentou menos proteínas inespecíficas nos dois tampões utilizados. Em termos de concentração da proteína alvo, a incubação do anticorpo com o lisado (Figura 27, poços 1 e 2) propiciou bandas de interesse mais intensas.

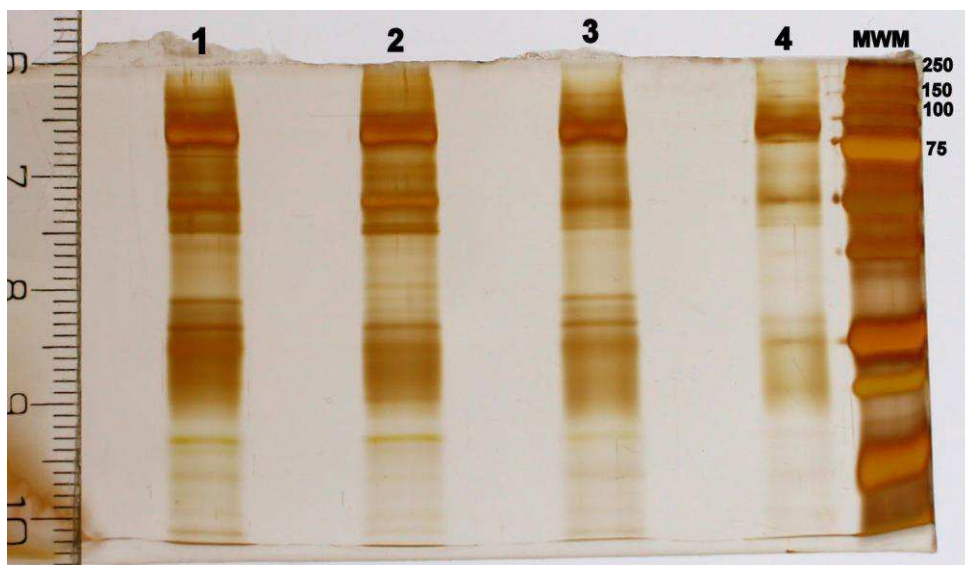


Figura 27. Gel de SDS-PAGE mostrando as seguintes separações: tampão de lise 1 com Tween/NP-40 e lisado incubado com o anticorpo (1); tampão de lise 2 com SDS/Triton X-100 e lisado incubado com o anticorpo (2); tampão de lise 1 com Tween/NP-40 e proteína A/sepharose incubada com o anticorpo (3); tampão de lise 2 com SDS/Triton X-100 e proteína A/sepharose incubada com o anticorpo (4).

Fizemos dois géis: um foi corado com prata para posteriormente extrairmos as bandas de interesse e fazermos a análise de MS; e o outro foi utilizado na análise de *Western blot*. Na Figura 27 vemos que as bandas correspondentes às possíveis isoformas da iPLA2 estão entre 80 kDa e 90 kDa e outra próxima a 150 kDa.

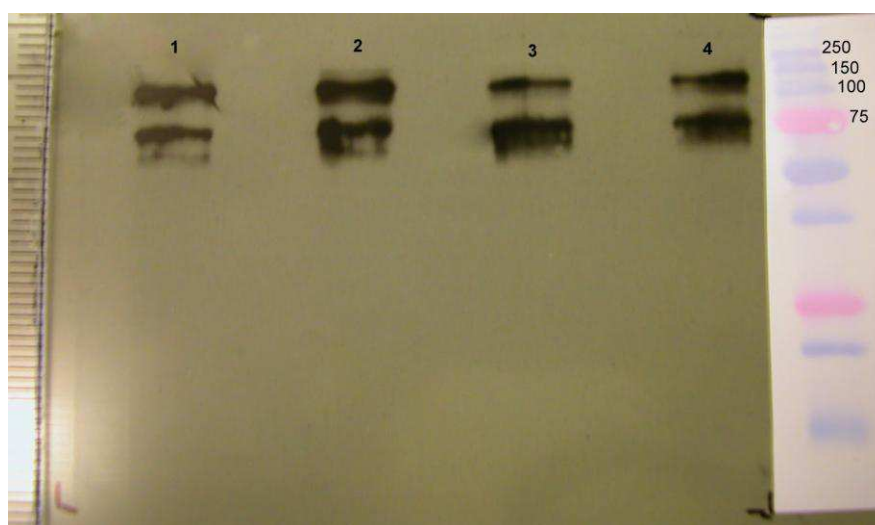


Figura 28: Resultado do western blot correspondente aos experimentos de imunoprecipitação.

A banda identificada entre 80 e 90 kDa poderia conter a iPLA2 α , a iPLA2 β e a iPLA2 γ , pois estas possuem massas muito próximas. A banda próxima a 150 kDa poderia ser a iPLA2 δ . As bandas foram recortadas e encaminhadas para a análise de MS. Dentre as proteínas identificadas não constava qualquer tipo de PLA2. Começamos o experimento utilizando plaquetas e outros controles tecido cerebral como controle positivo e hepático como negativo. As plaquetas foram isoladas por filtração em gel segundo o Método 3 e o precipitado solubilizado no tampão de lise 2 com SDS/Triton X-100. A Figura 29 mostra o gel com as seguintes amostras: A (lisado de plaquetas após a imunoprecipitação); B (lisado do tecido cerebral); C (lisado de plaquetas); D (lisado de tecido hepático). As bandas marcadas na Figura 29 foram correspondentes ao sinal de quimiluminescência no experimento de *Western blot* e foram recortadas e preparadas para o MS.

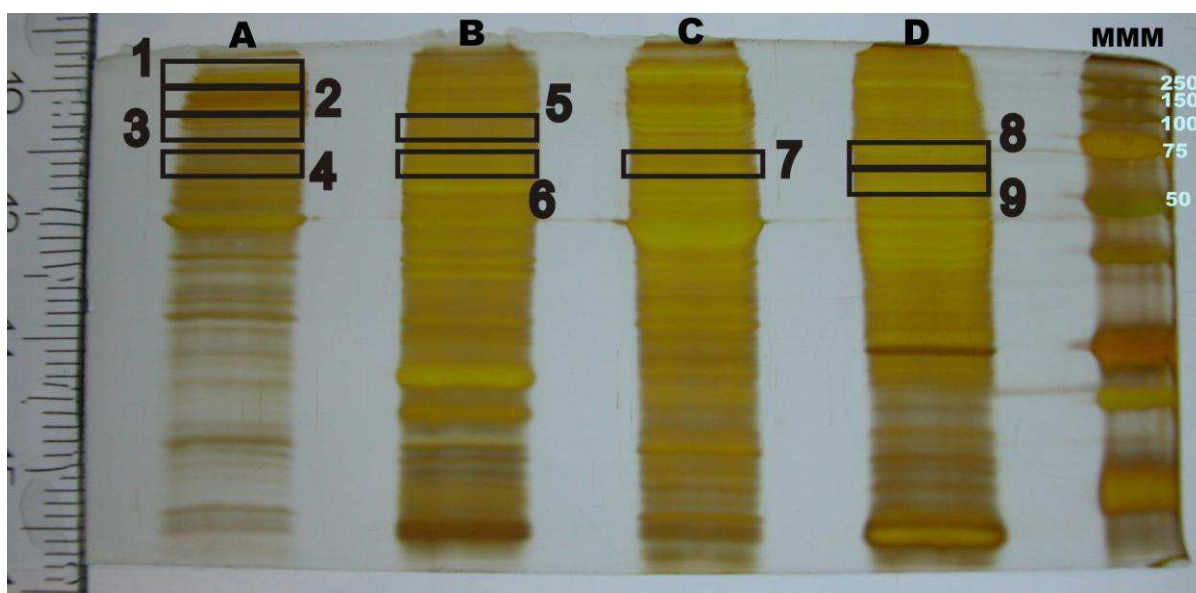


Figura 29: SDS-PAGE A (lisado de plaquetas após a imunoprecipitação); B (lisado do tecido cerebral); C (lisado de plaquetas); D (lisado de tecido hepático).

Novamente, nenhuma PLA2 foi identificada nas amostras analisadas. Os resultados mostraram um paradoxo, indicando a presença da proteína pela análise de *Western blot*, resultado que não foi confirmado pela análise de MS. O tecido hepático não deveria dar sinal e o tecido cerebral com certeza deveria ter a iPLA2. Assim, o que concluímos foi que o anticorpo usado não era específico e devia ter algum problema.

As dificuldades de detecção e identificação das isoformas da iPLA2, direcionaram o trabalho para uma análise proteômica comparativa, pois nesse estágio as amostras de pacientes já estavam em vias de serem alcançadas e os métodos de separação de proteínas extraídas de plaquetas já estavam estabelecidos.

4.7 Análise proteômica de plaquetas usando 2D-DIGE

Nesta etapa, usamos amostras de sangue coletadas de 18 pacientes com diagnóstico de esquizofrenia paranóide e usando medicação e 18 controles saudáveis. Os sexos, as idades e dados relacionados ao tabagismo dos pacientes e controles estão descritos nas Tabelas 4 e 5, assim como a contagem de plaquetas no sangue integral, PRP e GFP e a quantidade de proteína total de cada uma das amostras.

Tabela 4: Dados de sexo, idade, tabagismo, contagem de plaquetas e proteína total das amostras de pacientes.

	Sexo	Idade	Fumante	Plt 10 ³ /μL WB*	Plt 10 ³ /μL PRP [#]	Plt 10 ³ /μL GFP [§]	Uréia Buffer μL	Proteína total μg/μL
S001	Masculino	29	Não	164	401	166	59,7	3,74
S002	Masculino	23	Sim	252	569	210	72,9	3,93
S003	Masculino	52	Não	238	506	183	64,8	3,30
S004	Masculino	41	Não	223	456	165	59,4	3,47
S005	Feminino	29	Não	272	433	166	59,7	3,83
S006	Masculino	35	Não	167	254	85	35,4	3,33
S007	Feminino	24	Não	247	295	142	52,5	3,90
S008	Masculino	30	Sim	171	392	141	52,2	4,06
S009	Masculino	26	Sim	298	537	273	91,8	3,10
S010	Masculino	39	Sim	278	439	194	68,1	3,38
S011	Masculino	20	Não	208	476	186	65,7	3,63
S012	Masculino	31	Sim	198	347	108	42,3	2,97
S013	Masculino	32	Sim	259	495	197	69	3,56
S014	Feminino	72	Sim	208	227	66	30	3,20
S015	Masculino	62	Sim	254	488	203	71	3,11
S016	Feminino	35	Não	184	367	77	33,0	2,04
S017	Masculino	55	Sim	154	469	116	44,7	3,15
S018	Masculino	51	Sim	291	385	138	51,3	2,72

*Número de plaquetas por μL de sangue integral; # Número de plaquetas por μL de plasma rico em plaquetas; § Número de plaquetas por μL plaquetas filtradas em gel.

Tabela 5: Dados de sexo, idade, tabagismo, contagem de plaquetas e proteína total das amostras de controles saudáveis.

	Sexo	Idade	Fumante	Plt 10 ³ /μL WB*	Plt 10 ³ /μL PRP#	Plt 10 ³ /μL GFP§	Uréia Buffer μL	Proteína total μg/μL
C022	Feminino	25	Não	275	360	173	61,80	4,00
C023	Feminino	29	Não	310	618	257	87,00	4,68
C024	Feminino	24	Sim	276	467	169	60,60	3,54
C025	Masculino	35	Não	291	579	244	83,10	4,03
C026	Masculino	30	Sim	196	449	115	44,40	4,77
C027	Masculino	24	Não	212	381	160	57,90	4,20
C028	Masculino	33	Sim	158	386	117	45,00	4,79
C029	Feminino	27	Não	217	346	127	48,00	4,49
C030	Masculino	41	Não	287	379	157	57,00	4,25
C031	Masculino	25	Não	215	349	165	59,40	3,28
C033	Masculino	31	Não	200	268	53	26,00	2,92
C034	Masculino	31	Não	229	389	87	36,00	3,75
C035	Masculino	49	Não	188	375	77	33,00	3,36
C037	Feminino	34	Sim	242	86	18	15,30	1,57
C038	Masculino	59	Não	279	264	121	46,20	2,63
C039	Masculino	22	Não	257	341	87	36,00	3,51
C040	Masculino	52	Não	219	343	127	48,00	2,18
C041	Masculino	56	Não	299	588	284	95,10	2,24

*Número de plaquetas por μL de sangue integral; # Número de plaquetas por μL de plasma rico em plaquetas; § Número de plaquetas por μL plaquetas filtradas em gel.

Cada par de amostras foi analisado utilizando dois gradientes de pH, um na faixa ácida (4 – 7) e outro na básica (6 – 9), gerando 2 géis por par de amostra. A Figura 30 mostra o gel mestre do gradiente ácido (fita 53657) e a Figura 31 mostra gel mestre do gradiente básico (fita 86307). Esses géis foram utilizados como o modelo para fazer a correspondência de cada *spot* dos diferentes géis de cada uma das amostras.

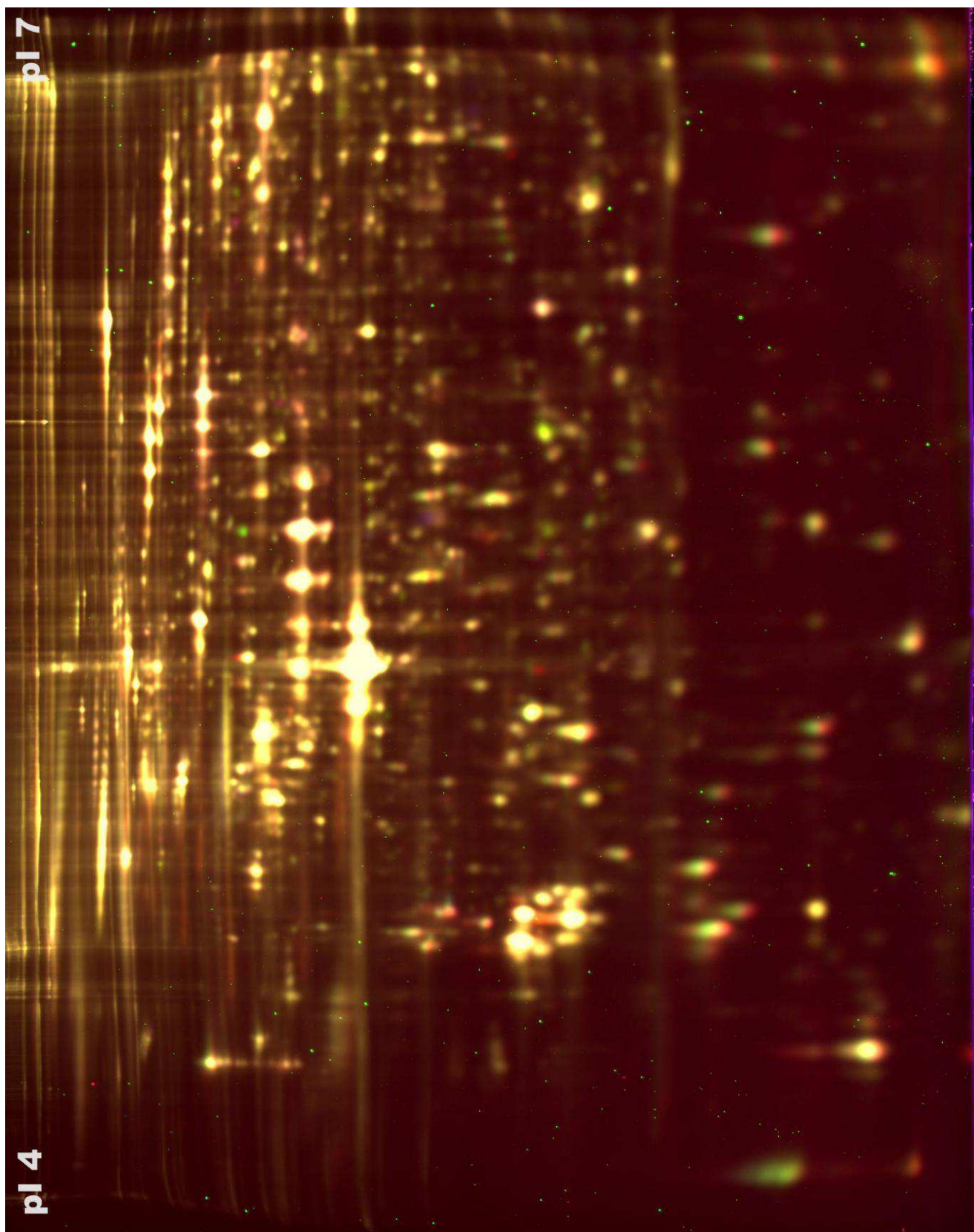


Figura 30. Gel mestre das proteínas separadas no gradiente ácido 4 – 7.

Utilizando o software DeCyder™, cada imagem foi processada no módulo DIA, fixando-se um número de 3.000 *spots* para serem reconhecidos em cada gel, em seguida utilizamos um filtro de exclusão para eliminar todos os *spots* com inclinação menor do que 1,14. Cada um dos *spots* excluídos foi visualizado para termos a certeza de não excluir nenhum *spot* pequeno. Após a identificação dos *spots*, utilizamos o módulo BVA para fazer o *matching* dos *spots* de cada gel com os correspondentes no gel mestre, ou seja, cada *spot* foi associado ao *spot* correspondente no gel mestre.

A análise estatística foi efetuada no mesmo módulo usando o teste t-*Student* pareado, pois os pares controles e pacientes foram combinados de acordo com o sexo e a idade. As alterações foram consideradas relevantes segundo os seguintes critérios: a) valores de $p < 0,050$, b) razões menores que 0,9 e maiores que 1,1 e c) *spots* com correspondência ao gel mestre maiores que 80%.

No gradiente de pH ácido foram observados vinte e nove *spots* com alterações relevantes, sendo que cinco deles foram identificados por espectrometria de massas, conforme mostrado na Tabela 6 e na Figura 32.

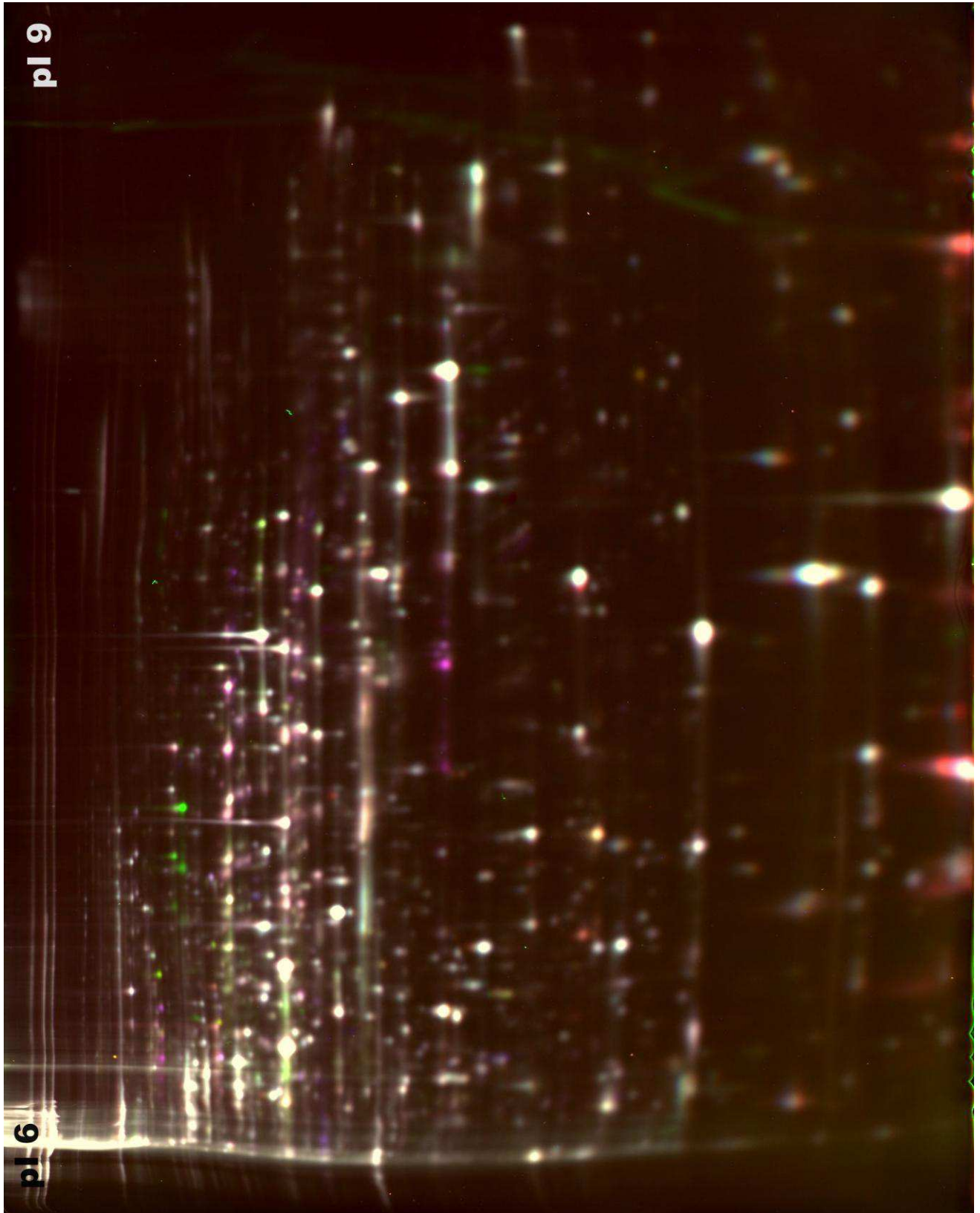


Figura 31: Gel mestre das proteínas separadas no gradiente básico 6 – 9.

Tabela 6: Spots que apresentaram alterações relevantes no gradiente de pH ácido.

Identidade do Spot	Número Acesso	Identidade da proteína	% de correspondência entre os spots	Razão	Valores de p não ajustados
1335			100	1,11	0,001
1038			100	0,88	0,003
1586			100	1,15	0,006
2155			93	0,73	0,006
1505			100	1,15	0,007
2405			86	1,15	0,010
812			86	1,14	0,011
1575			93	1,17	0,011
1576			86	1,53	0,013
1980			100	0,85	0,013
2028			98	1,17	0,014
1552*			84	1,49	0,018
780			86	1,14	0,020
2398*	P32119	Peroxiredoxin-2	100	1,47	0,021
1613			100	1,17	0,028
2479			100	0,77	0,032
786			100	1,1	0,033
2077			86	0,82	0,033
2124			100	0,88	0,035
1519			86	1,1	0,036
1253	P43304	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase	100	0,85	0,038
1754			100	1,18	0,039
1632			86	1,15	0,041
282			86	0,89	0,043
2185	P02649	Apolipoprotein E	93	1,18	0,044
821			93	1,11	0,045
2379	P09211	Glutathione S-transferase P	100	0,900	0,048
1638	P02679	Fibrinogen gamma chain	86	1,230	0,050
1434			93	0,900	0,050

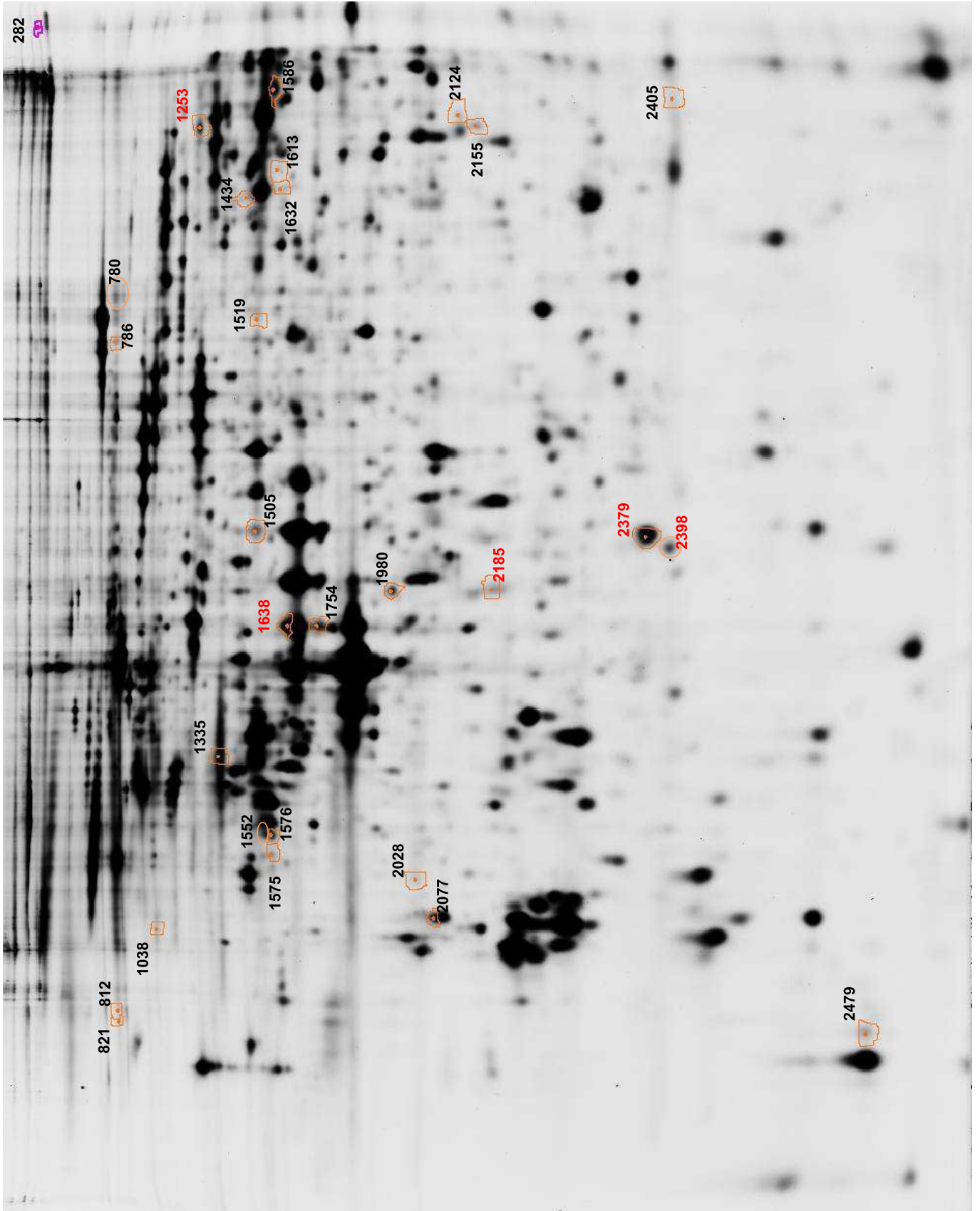


Figura 32: Spots que apresentaram alterações relevantes no gradiente de pH ácido, em preto os não identificados e em vermelho os identificados.

No gradiente de pH básico foram observados vinte e seis *spots* com alterações relevantes, sendo que seis deles foram identificados por espectrometria de massas, conforme mostrado na Tabela 7 e na Figura 33.

Tabela 7: *Spots* que apresentaram alterações relevantes no gradiente de pH básico.

Identidade do <i>Spot</i>	Número de Acesso	Identidade da proteína	% de correspondência entre os <i>spots</i>	Razão	Valores de p não ajustados
1010			91	1,11	0,001
1021			87	1,17	0,001
1729			85	1,14	0,008
1305			85	1,11	0,008
1752			80	1,24	0,011
1073	P06744	Glucose-6-phosphate isomerase	100	0,92	0,012
1331			98	1,16	0,015
1330			98	1,11	0,015
855	P29401	Transketolase	100	0,92	0,015
1018	Q9ULV4	Coronin-1C	100	0,92	0,016
1149			98	1,14	0,018
1990			94	1,14	0,021
1438			80	1,12	0,022
1200	Q9NVA2	Septin-11	94	0,89	0,024
1768	P00915	Carbonic anhydrase 1	100	1,81	0,025
1542			94	1,47	0,027
464			94	0,9	0,027
447			87	0,87	0,029
1546			80	1,22	0,031
1881			100	1,12	0,036
431			98	1,12	0,039
576			94	1,29	0,042
1544			100	1,6	0,045
154	P51659	Peroxisomal multifunctional enzyme type 2	80	0,83	0,045
569			100	0,9	0,046
641			87	0,8	0,049

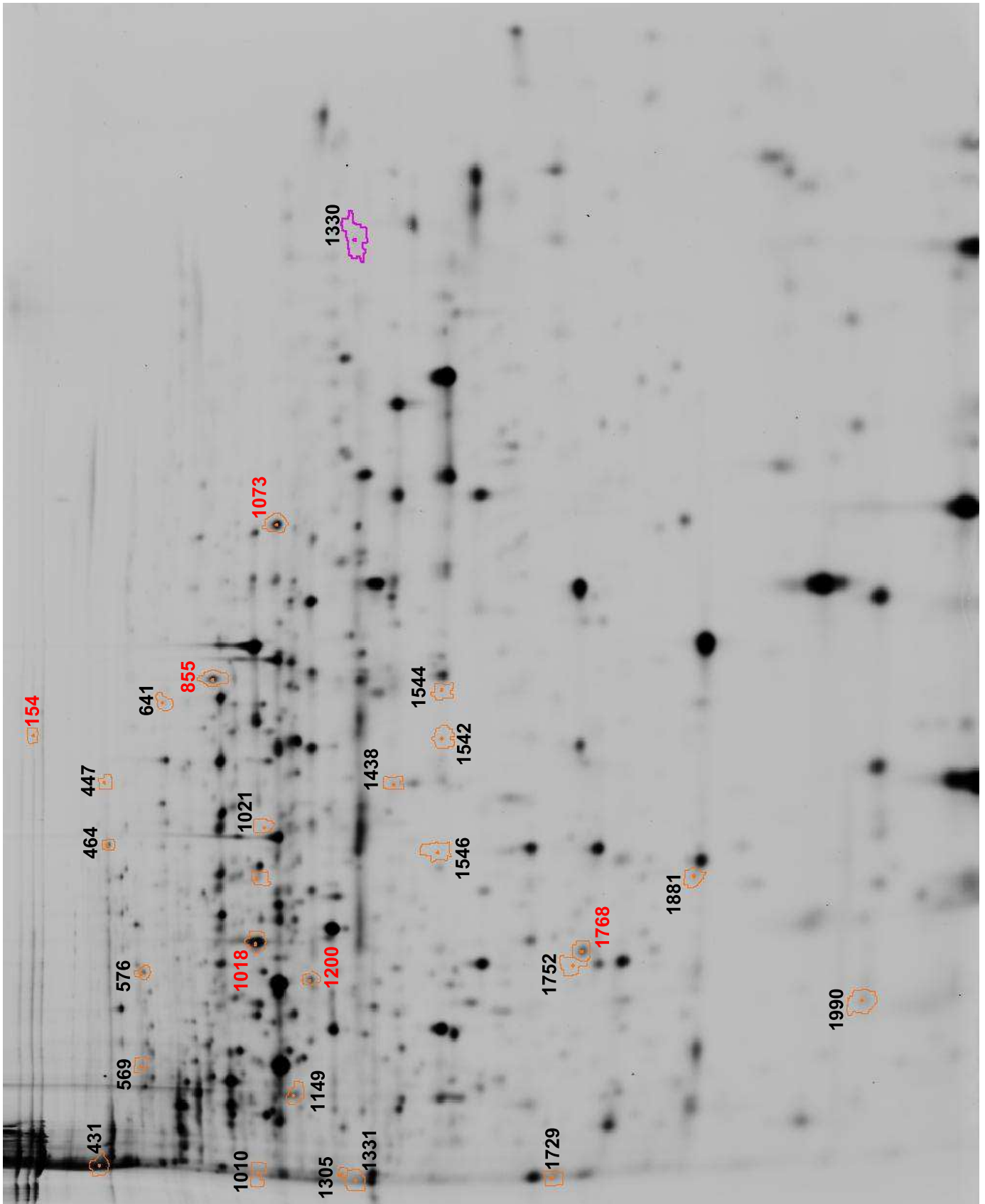


Figura 33. Spots que apresentaram alterações relevantes no gradiente de pH básico, em preto os não identificados e em vermelho os identificados.

As proteínas identificadas até o presente momento foram agrupadas de acordo com a função biológica exercida. Basicamente, as proteínas de interesse estão envolvidas com o metabolismo da glicose, estresse oxidativo, metabolismo de lipídeos e estrutura celular, conforme mostrado na Tabela 8.

Tabela 8: Proteínas com abundância diferenciada e identificadas por espectrometria de massas, processos biológicos do qual fazem parte, tipo de regulação relatada na literatura em tecido cerebral e regulação encontrada nas amostras de plaquetas que foram analisadas.

Processo biológico	Proteína	Regulação em SZ descrita em tecido cerebral	Regulação em SZ em plaquetas
Metabolismo da glicose	Transcetolase	↑ ¹¹⁷	↓
Metabolismo da glicose	Glicerol-3-fosfato desidrogenase	-	↓
Metabolismo da glicose	Glicose-6-fosfato isomerase	-	↓
Metabolismo da glicose	GAPDH	↓ ¹¹⁸	↓
Estresse oxidativo	Glutathiona S-transferase P	↑ ¹¹⁷	↓
Estresse oxidativo	Peroxiredoxina-2	↑	↑
Metabolismo lipídios	Apolipoproteína E	↑ ^{119, 120}	↑
Metabolismo lipídios	Enzima multifuncional peroxisomal tipo 2	-	↓
Estrutura celular	Septina-11	↓Sep2 ¹¹⁷ , ↑Sep4 ¹²⁰ , ↓Sep3 ¹²³	↓

Dentre vários estudos proteômicos que foram realizados em tecido cerebral de esquizofrênicos, Martins-de-Souza destaca uma lista de potenciais biomarcadores para esquizofrenia, sendo que 42% desses candidatos estão relacionados com o metabolismo de energia. Vários trabalhos relacionam a esquizofrenia com disfunção da mitocôndria e o estresse oxidativo, corroborando

com os resultados encontrados nesse trabalho.^{121,122} Prabakaran et al.¹²³ fizeram o estudo proteômico do córtex pré frontal de esquizofrênicos e verificaram que 70% das enzimas relacionadas à via glicolítica mostravam uma regulação diminuída, com relação aos controles.

Apesar de identificarmos proteínas com expressão diferenciada, nenhuma das variações foi grande o suficiente para classificá-las como um possível biomarcador para a doença. Observamos a existência de uma heterogeneidade entre as amostras de pacientes. Conforme podemos observar na Figura 34 a variação biológica calculada para o intervalo de pH 4 – 7 é ligeiramente maior em pacientes.

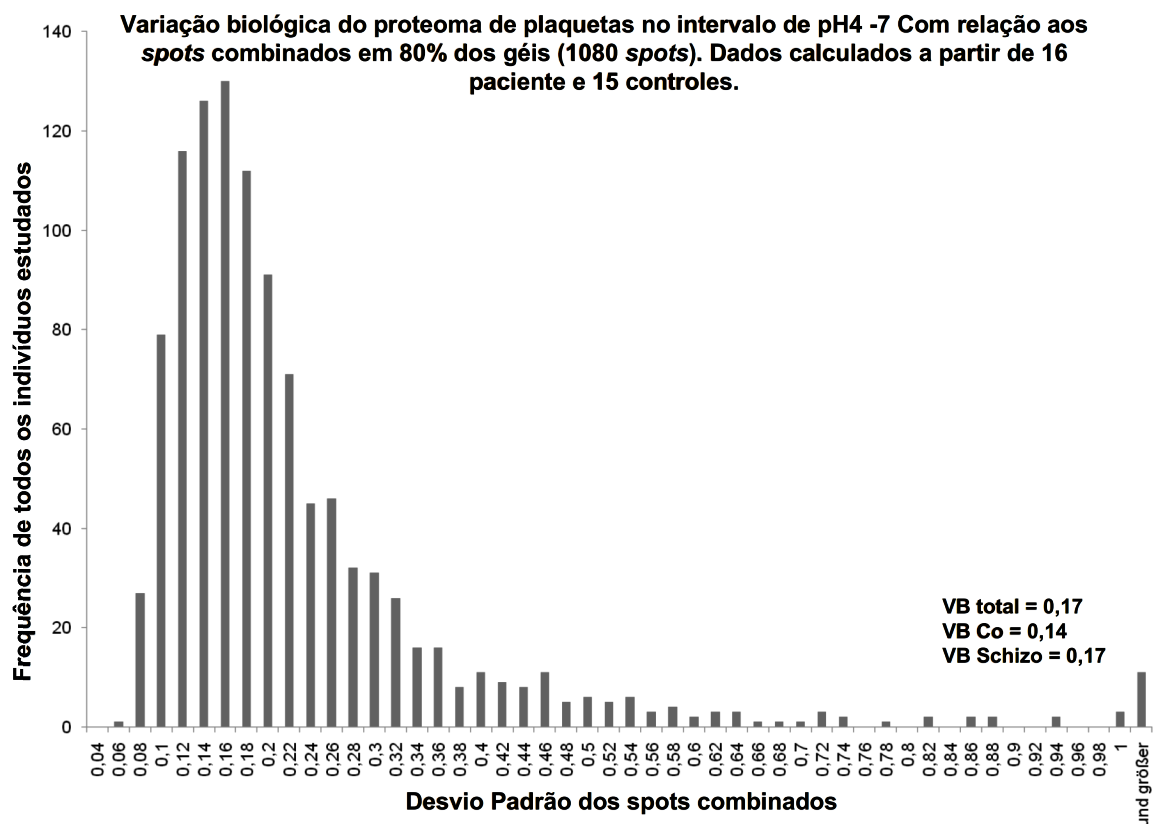


Figura 34. Variação biológica no proteoma de plaquetas dos indivíduos participantes do estudo.

A heterogeneidade observada pode ser atribuída à variação biológica entre os pacientes participante do estudo, pois além de todas as variáveis existentes relacionadas às diferenças naturais entre os indivíduos, todos os pacientes estavam sob o efeito da medicação. A condição ideal seria obter amostras de pacientes livres de medicação, porém como a esquizofrenia é uma doença grave, é muito difícil conseguir pacientes em tal condição. Corroborando com essas ideias, observamos uma variabilidade maior na expressão da enzima monoamina oxidase B (MaO B) em pacientes do que nos controles. Essa enzima está relacionada à síntese de neurotransmissores e também é afetada por determinados tipos de medicação. A Figura 34 mostra da expressão da MaO B em plaquetas dos grupos controle e esquizofrenia, evidenciando a grande variação da expressão em pacientes.

A técnica de 2D-DIGE já elimina grande parte da variação técnica experimental uma vez que as amostras são analisadas simultaneamente e com a presença de um padrão interno. Porém, a variação biológica ainda persiste e precisa ser avaliada. A partir desses resultados, constatamos a necessidade de se fazer um estudo da variação biológica no proteoma de plaquetas de esquizofrênicos para selecionar proteínas com variabilidade biológica baixa nessa doença para serem usadas como normalizador dos resultados obtidos ou como critério para separar grupos de doentes a ser comparados com os controles. O efeito da variabilidade biológica também pode ser minimizado com o aumento do número de amostras. As amostras foram obtidas a partir de 18 pacientes que, embora seja um número válido para os cálculos estatísticos, é pequeno para representar a extensão de uma doença complexa, de cunho genético e relacionada a todas etnias.

Infelizmente, não houve tempo suficiente e amostras novas para realizar novos experimentos. Porém, a proposta para continuação do projeto é realizar esse estudo, visto que os resultados iniciais são promissores, embora não sejam espetaculares.

Expressão da MaO B em plaquetas em esquizofrenia e controles

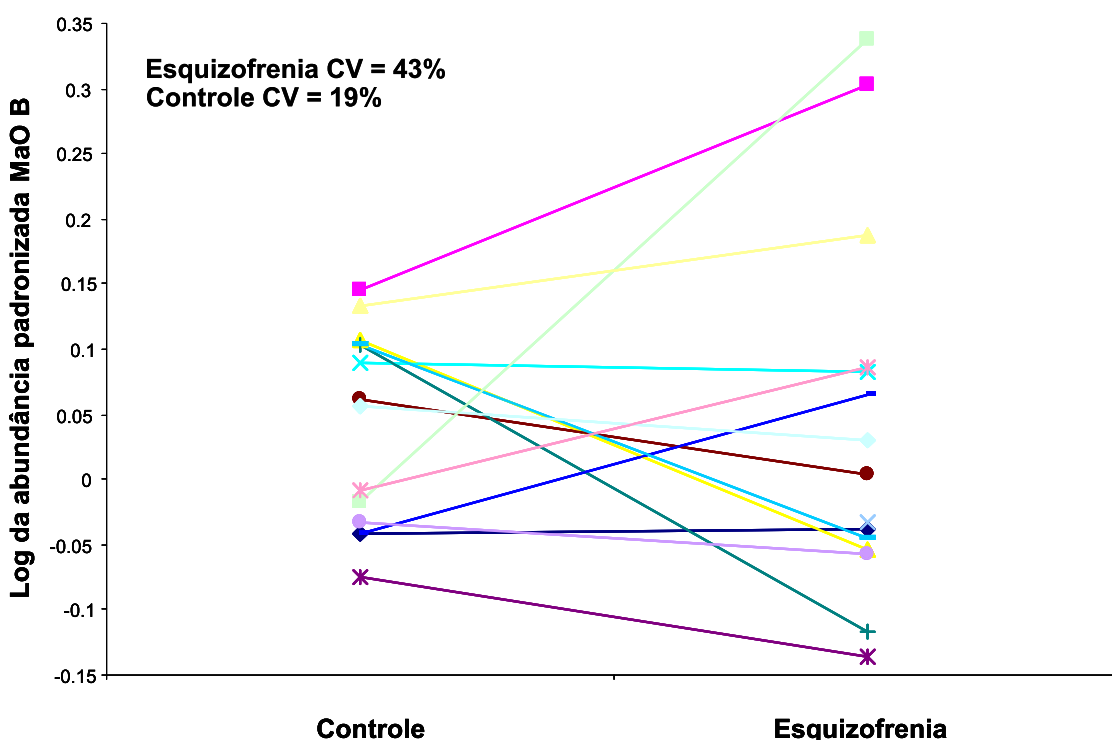


Figura 35. Expressão da MaO B nos grupos controle e esquizofrenia determinada nos experimentos de 2D-DIGE.

A Figura 36 mostra a análise de PCA (*Principal Components Analysis*), que é utilizada para localizar quais amostras estão fora da tendência geral das da maioria das amostras, nesse caso avaliando os mapas de *spots*. Na Figura 35 os controles são os círculos azuis (amostras analisadas em uma única etapa) e verdes (amostras analisadas em etapa posterior); os pacientes são os círculos rosa (amostras analisadas em uma única etapa) e amarelos (amostras analisadas em

etapa posterior). Vemos que temos uma separação entre os grupos controle e esquizofrenia, embora o último tenha quatro amostras fora e o primeiro tenha três.

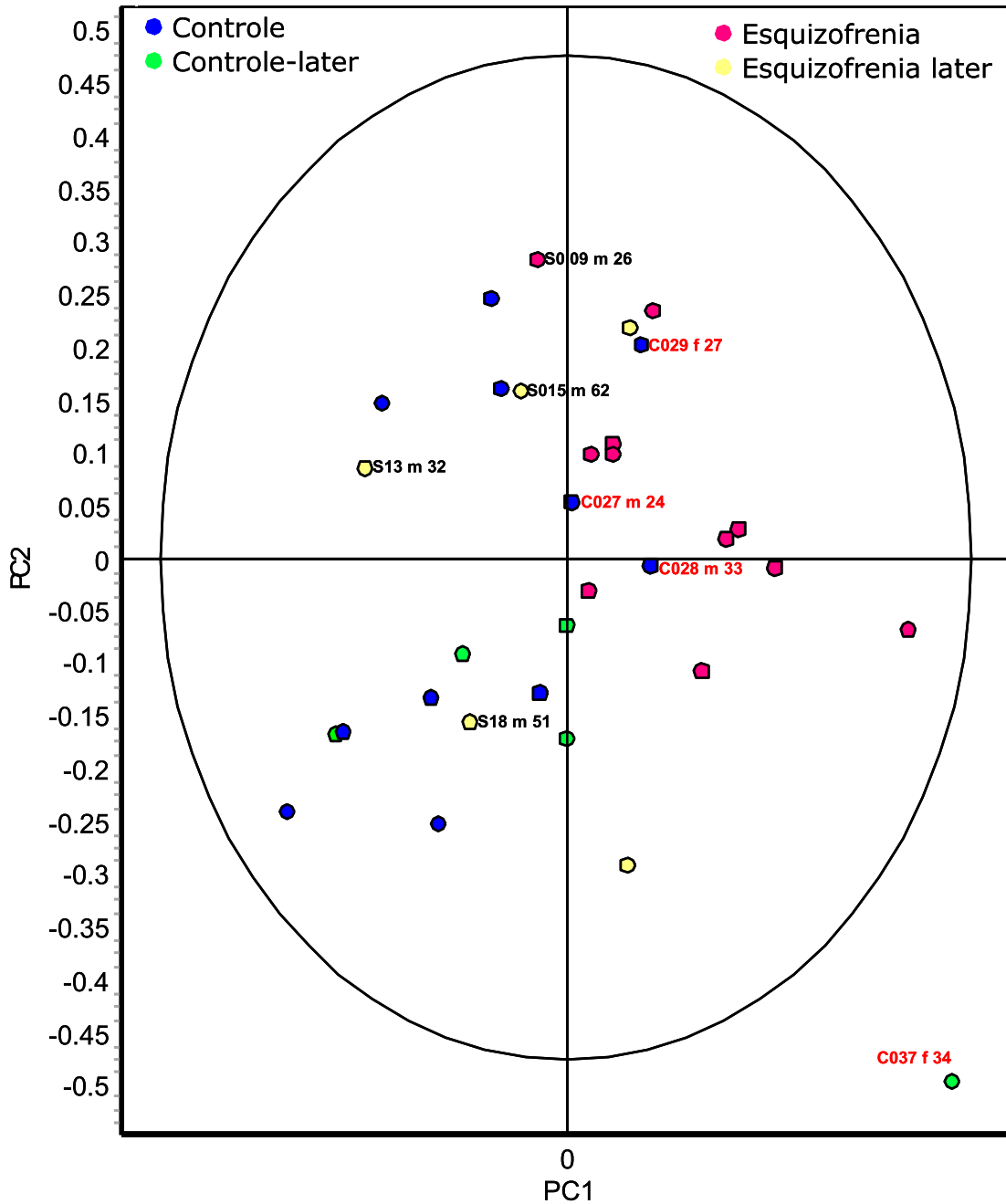


Figura 36. Análise dos componentes principais dos mapas de spots dos grupos controle e esquizofrenia.

Dentre as proteínas identificadas, a peroxiredoxina-2 é a que apresentou a alteração mais interessante, visto que a anidrase carbônica é devido a uma contaminação por eritrócitos. A proteína peroxiredoxina-2 é encontrada no citoplasma e regula o sistema redox das células, catalisando a redução dos peróxidos gerados metabolicamente de forma a eliminá-los do organismo. Pode atuar na cascata de sinalização de fatores de crescimento e do fator de necrose tumoral alfa (TNF - α) pela regulação da concentração intracelular de peróxido de hidrogênio.¹²⁴ A Figura 37 mostra a relação do logaritmo das abundâncias padronizadas em relação aos dois grupos estudados. Verificamos um aumento significativo da abundância desta proteína nas amostras de pacientes.

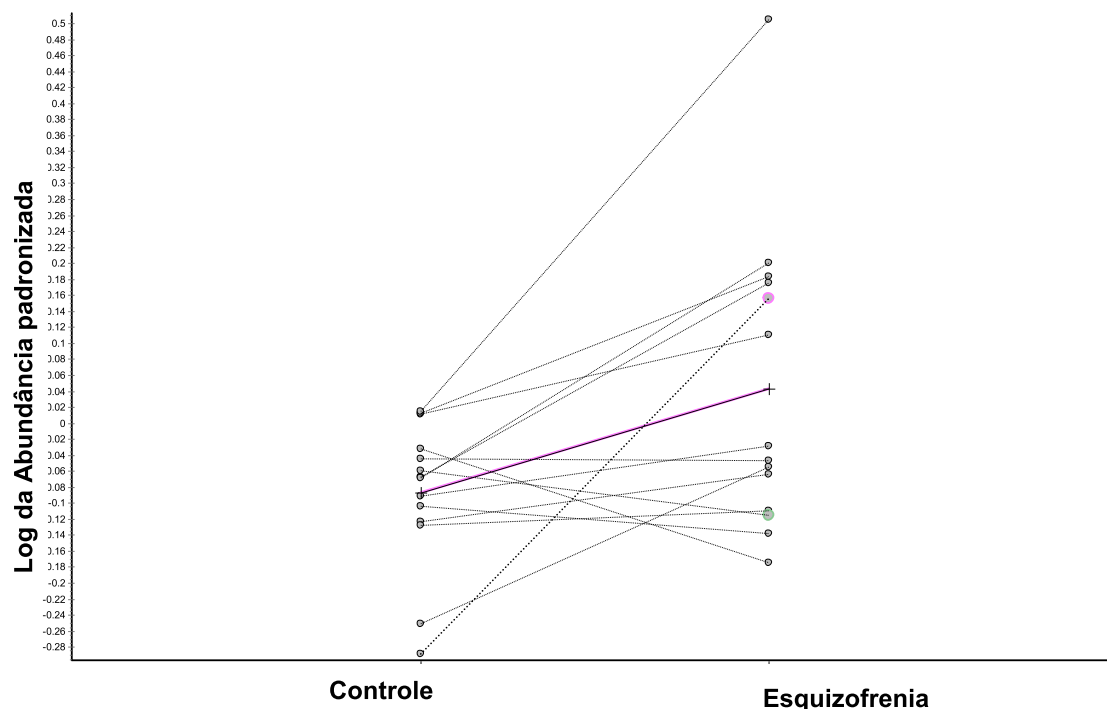


Figura 37. Logaritmo da abundância padronizada dos spots correspondentes a peroxiredoxina-2 presentes em cada gel analisado em função dos grupos estudados.

Dentre as diversas anormalidades encontradas em processos bioquímicos na esquizofrenia, Yao e Keshavan¹²⁵ destacam que as alterações no sistema de

defesa antioxidante e na sinalização redox são evidentes e muito estudadas nesse estado patológico. A observação das perturbações no sistema de defesa antioxidante e a relação dessas alterações com outros sistemas (estrutura da membrana, sistema imune e neurotransmissão) associada com o quadro clínico embasa grande parte dos argumentos que defendem a relação entre a esquizofrenia e o estresse oxidativo.

Os radicais livres são espécies muito reativas produzidas normalmente no curso dos processos metabólicos, cujo excesso pode causar danos a vários tecidos, principalmente as membranas celulares. O corpo possui um sistema de defesa que as elimina (através de substâncias antioxidantes, enzimas neutralizadoras, etc.) mantendo a sua concentração em uma faixa que não é prejudicial. É justamente a deficiência desse sistema que vários estudos relacionam com a esquizofrenia.

A peroxiredoxina neutraliza as espécies reativas oxigenadas juntamente com a tioredoxina e são liberada em situações de estresse crônico, sendo consideradas marcadoras de estresse oxidativo. Zhang et al.¹²⁶ compararam a concentração de tioredoxina em soro de pacientes no primeiro surto (não medicados) com pacientes crônicos (medicados) e com indivíduos controles saudáveis e encontraram um aumento significativo na quantidade dessa enzima em pacientes no primeiro surto. Embora essa diferença não tenha sido observada entre os outros dois grupos (controles e pacientes crônicos), mesmo quando fatores como idade, sexo, duração da doença e fumo foram levados em conta, a diferença encontrada no grupo não medicado mostrou-se significativa. Dietrich-Muszalska et al.²⁹ constataram que espécies reativas de oxigênio e nitrogênio estão presentes em plaquetas através do estudo das modificações químicas em proteínas de plaquetas causadas por esses radicais mostrando que as espécies radicalares não só danificam os lipídios de

membrana, mas também provocam modificações químicas nas proteínas. Relatam também que a concentração de grupos tióis em plaquetas de esquizofrênicos paranóides foi significativamente menor do que a dos controles saudáveis, provavelmente oxidados pelo excesso de espécies reativas com oxigênio.

A peroxiredoxina-2 catalisa a decomposição dos peróxidos segundo a reação: $2 R' - SH + ROOH \leftrightarrow R' - S - S - R' + H_2O + ROH$, de maneira tão rápida quanto a catalase, e por ser abundante no meio celular é uma enzima muito eficaz para eliminar os peróxidos formados no metabolismo. Ela possui 3 grupos tióis livres que são protegidos por um domínio cuja conformação favorece oxidação dos tióis pelos peróxidos, contudo desfavorece a oxidação deles por outros agentes tióis oxidantes e de agentes alquilantes como a iodoacetamida. A regeneração das ligações dissulfetos formadas é realizada pela tioredoxina, que juntas atuam na conversão de espécies reativas em não reativas. Esses resultados sugerem que o aumento da concentração de peróxidos pode exigir um aumento na expressão de peroxiredoxina que, por sua vez, exige um aumento na expressão da tioredoxina. O aumento da abundância da peroxiredoxina-2 que verificamos em plaquetas de pacientes esquizofrênicos pode ser explicado pela conhecida disfunção do sistema antioxidante de defesa corroborando com essa teoria e também com os resultados publicados por Zhang et al.

Os resultados obtidos em plaquetas, mostram uma concordância com os obtidos em tecido cerebral, exceto a transcetolase e a glutathione S-transferase P, cuja relação da abundância foi oposta. Porém, como nos trabalhos citados a quantificação foi feita em usando a eletroforese em gel bidimensional convencional, que definitivamente não serve para análise proteômica quantitativa para busca de biomarcadores, é necessário a confirmação desses resultados em novos

experimentos usando tecido cerebral. Comparando os conjunto de dados, verificamos que é possível utilizar as plaquetas como um modelo periférico para o estudo de doenças neuropsiquiátricas.

O uso de tecido cerebral para as análises de busca de biomarcadores não é conveniente, visto que as amostras são difíceis de conseguir e, como consequência, temos no estudo sempre um número de indivíduos (n) pequeno. Devido a grande variabilidade biológica entre os seres humanos, um n pequeno aumenta a probabilidade de resultados equivocados. Sendo o cérebro um dos órgãos mais plásticos do corpo humano, ele é “moldado” não só com a expressão genética, mas também com as experiências únicas e particulares de cada pessoa, acrescentando uma dificuldade adicional à busca por biomarcadores. Essa seria a grande vantagem do uso de plaquetas, pois podemos aumentar o n de modo a minimizar as chances de resultados errôneos. A próxima etapa a ser realizada é a validação das proteínas encontradas, utilizando Western blot e espectrometria de massas.

5 CONCLUSÕES

A técnica de Western blot de grande valia para a validação das alterações de proteínas encontradas utilizando 2D-DIGE, porém é necessário que a especificidade dos anticorpos sejam verificadas em processo posterior à validação.

A presença da iPLA2 GVI não foi confirmada em plaquetas e as análises de Western blot mostraram a necessidade de avaliar controles de aplicação da amostra adequados ao estudo das doenças neuropsiquiátricas.

Para a busca de biomarcadores, é essencial a combinação de técnicas robustas e modernas com as antigas, combinando as suas vantagens e evitando as suas desvantagens. A MS é indispensável na análise proteômica clínica, porém 2DE é insubstituível até esse momento, pois fornece muitas informações e dados que somente LC/MS não é capaz de fornecer. Portanto, 2D-DIGE e LC/MS devem ser usadas de forma complementar.

Em uma primeira etapa, a análise proteômica é uma abordagem mais interessante do que o estudo individual das proteínas, conforme a bioquímica de proteínas clássica, pois as doenças apresentam um efeito em cascata, alterando vários níveis metabólicos. No entanto, não afirmamos que o estudo individual das proteínas não é importante, mas que a análise proteômica prévia pode ser uma boa estratégia para complementar os estudos sobre o funcionamento das proteínas de maneira isolada.

A relação da esquizofrenia com distúrbios no metabolismo da glicose, dos lipídeos e o estresse oxidativo amplamente relatado na literatura foi confirmado pelos dados obtidos nesse trabalho.

A similaridade entre os resultados de expressão proteica em plaquetas de pacientes com esquizofrenia com dados publicados com relação a expressão proteômica em tecido cerebral reforça a hipótese de que as plaquetas podem ser um modelo periférico para o estudo de doenças neuropsiquiátricas.

A variabilidade biológica é uma grande barreira a ser vencida nas análises quantitativas de fluidos biológicos, para a obtenção de resultados mais confiáveis. Uma sugestão para a minimização dessa variável é aumentar o número de amostras utilizadas nestes estudos. Por isso, uma matriz periférica de fácil acesso, como as plaquetas, é muito conveniente e promissora para a busca de biomarcadores.

6 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

-
- ¹ World Health Organization, Genebra, Suíça, 2011. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs220/en/>>. Acesso em: 21 abril 2011.
- ² World Health Organization, Genebra, Suíça, 2011. Disponível em: <http://www.who.int/topics/mental_disorders/en/> Acesso em: 21 abril 2011.
- ³ AVISSAR, S.; SCHREIBER, G. Toward molecular diagnostics of mood disorders in psychiatry. *TRENDS in Molecular Medicine*, v. 8, n. 6, p. 294, 2002.
- ⁴ World Health Organization, Genebra, Suíça, 2011. Disponível em: <http://www.who.int/mental_health/management/schizophrenia/en/>. Acesso em: 23 abril 2011.
- ⁵ LARSEN, T. K.; FRIIS, S.; HAAHR, U.; JOA, I.; JOHANNESSEN, J. O.; MELLE, I.; OPJORDSMOEN, S.; SIMONSEN, E.; VAGLUM, P. Early detection and intervention in first-episode schizophrenia: a critical review. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, v. 103, p. 323-334, 2001.
- ⁶ Tor K. Larsen *, Lars C. Moe, Lars Vibe-Hansen, Jan Olav Johannessen. Premorbid functioning versus duration of untreated psychosis in 1 year outcome in first-episode psychosis. *Schizophrenia Research*, v. 45, p. 1–9, 2000.
- ⁷ WORLD HEALTH ORGANIZATION. Nations for mental health: schizophrenia and public health, 1998. World Health Organization, 1998. Disponível em: <http://www.who.int/mental_health/resources/schizophrenia/en/index.html>. Acesso em: 23 abril 2011.
- ⁸ BOTTLENDER, R.; SATO, T.; JÄGER, M.; WEGENER, U.; WITTMANN, J.; STRAUSS, A.; MÖLLER, H. J. The impact of the duration of untreated psychosis prior to first psychiatric admission on the 15-year outcome in schizophrenia. *Schizophrenia Research*, v. 62, p. 37– 44, 2003.
- ⁹ BOTTLENDER, R.; MÖLLER, H. J. The impact of the duration of untreated psychosis on short- and long-term outcome in schizophrenia. *Current Opinion in Psychiatry*, v. 16, p. S39–S43, 2003.
- ¹⁰ McGLASHAN, T. H. Duration of untreated psychosis in first-episode schizophrenia: marker or determinant of course? *Biological Psychiatry*, v. 46, p. 899–907, 1999.
- ¹¹ McGLASHAN, T. H. Is active psychosis neurotoxic? *Schizophrenia Bulletin*, v. 32, n. 4, p. 609–613, 2006.
- ¹² McGRATH, J.; WELHAM, J.; CHANT, D.; SAHA, S. A systematic review of the prevalence of schizophrenia. *PLOS medicine*, v. 2, n. 5, p.413, 2005.

-
- ¹³ LAKHAN, S. E. Schizophrenia proteomics: biomarkers on the path to laboratory medicine? *Diagnostic Pathology*, v. 1, n.11, 2006. Disponível em: <<http://www.diagnosticpathology.org/content/1/1/11>>. Acesso em: 21 abril 2011.
- ¹⁴ HUANG, J. T. J. et al. Disease biomarkers in cerebrospinal fluid of patients with first-onset psychosis. *PLoS Medicine*, v. 3, n. 11, p. e428, 2006.
- ¹⁵ CRADDOCK, R. M. et al. Increased α -defensins as a blood marker for schizophrenia susceptibility. *Molecular & Cellular Proteomics*, v. 7, p. 1204–1213, 2008.
- ¹⁶ LIOTTA, L. A.; FERRARI, M.; PETRICOIN, E. Written in blood. *Nature*, v. 425, p. 905-905, 2003.
- ¹⁷ DEUTSCH, V. R.; TOMER, A. Megakaryocyte development and platelet production. *British Journal of Haematology*, v. 134, p. 453-466, 2006.
- ¹⁸ GARCÍA, A.; WATSON, S. P.; DWEK, R. A.; ZITZMANN, N. Applying proteomics technology to platelet research. *Mass Spectrometry Reviews*, v. 24, p. 918-930, 2005.
- ¹⁹ PLEIN, H; BERK, M. The platelet as a peripheral marker in psychiatric illness. *Human Psychopharmacol Clin Exp*, v. 6, n. 3, p. 229-236, 2001.
- ²⁰ DA PRADA, M.; CESURA, A. M.; LAUNANY, J. M'; RICHARDS, J. C. Platelets as a model for neurons? *Experientia*, v. 44, p. 115–126, 1988.
- ²¹ CAMACHO, A.; DIMSDALE, J. E.; Platelets and psychiatry, lessons learned from old and new studies. *Psychosomatic Medicine*, v.62, p. 326–336, 2000.
- ²² BERK, M.; PLEIN, H.; CZISMADIA, T. Super-sensitive platelet glutamate receptors as a possible peripheral marker in schizophrenia. *International Clinical Psychopharmacology*, v. 14, p. 119–122, 1999.
- ²³ NUSS, P.; TESSIER, C.; FERRERI, F.; DE HERT, M.; PEUSKENS, J.; TRUGNAN, G.; MASLIAH, J.; WOLF, C. Abnormal transbilayer distribution of phospholipids in red blood cell membranes in schizophrenia. *Psychiatry Research*, v. 169, p. 91–96, 2009.
- ²⁴ GATTAZ, W. F.; SCHMITT, A.; MARAS, A. Increased platelet phospholipase A2 activity in schizophrenia. *Schizophrenia Research*, v. 16, p. 1-6, 1995.
- ²⁵ BUCHSBAUM, M. S. The frontal lobes, basal ganglia and temporal lobes as sites for schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin*, v. 16, p. 377–387, 1990.
- ²⁶ WHATLEY, S. A.; CURI, D.; MARCHBANKS, R. M. Mitochondrial involvement in schizophrenia and other functional psychoses. *Neurochemical Research*, v. 21, p. 995–1004, 1996.

-
- ²⁷ DROR, N. et al. State-dependent alterations in mitochondrial complex I activity in platelets: a potential peripheral marker for schizophrenia. *Molecular Psychiatry*, v. 7, p. 995–1001, 2002.
- ²⁸ DIETRICH-MUSZALSKA, A.; OLAS, B.; RABE-JABLONSKA, J. Oxidative stress in blood platelets from schizophrenic patients. *Platelets*, v. 16, p. 386–391, 2005.
- ²⁹ DIETRICH-MUSZALSKA, A.; OLAS, B. Modifications of blood platelet proteins of patients with schizophrenia. *Platelets*, v. 20, n. 2, p. 90–96, 2009.
- ³⁰ ZUCKER, M.; VALEVSKI, A.; WEIZMAN, A.; REHAVI, M. Increased platelet vesicular monoamine transporter density in adult schizophrenia patients. *European Neuropsychopharmacology*, v. 12, p. 343–347, 2002.
- ³¹ DENNIS, E. A. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A2. *Journal of Biological Chemistry*, v. 269, n. 18, p. 13057-13060, 1994.
- ³² NELSON, D. L.; COX, M. M. *Lehninger: principios de bioquímica*. 3^o Ed, São Paulo: Sarvier, 2002. 292 p.
- ³³ MURAKAMI, M.; KUDO, I. Phospholipase A2 enzymes. *Prostaglandins & other lipid mediators*, v. 68-69, p. 3-58, 2002.
- ³⁴ DENNIS, E. A.; SIX, D. The expanding superfamily of phospholipase A2 enzymes: classification and characterization. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1488, p. 1-19, 2000.
- ³⁵ DENNIS, E. A.; SCHALOSKE, R. H. The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1761, p. 1246-1259, 2006.
- ³⁶ FAROOQUI, A. A.; YANG, H. C.; HORROCKS, L. Involvement of phospholipase A2 in neurodegeneration. *Neurochemistry International*, v. 30, n. 6, p. 517-522, 1997.
- ³⁷ FENTON, W. S.; HIBBELN, J.; KNABLE, M. Essential fatty acids, lipid membrane abnormalities, and the diagnosis and treatment of schizophrenia. *Biological Psychiatry*, v. 47, p. 8-21, 2000.
- ³⁸ GATTAZ, W. F.; TAVARES Jr, H.; YACUBIAN, J.; TALIB, L. L.; BARBOSA, N. R. Increased phospholipase A2 activity in schizophrenia with absent response to niacin. *Schizophrenia Research*, v. 61, p. 1-6, 2003.
- ³⁹ GATTAZ, W. F.; BRUNNER, J. Phospholipase A2 and the hypofrontality hypothesis of schizophrenia. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, v. 55, n. 1 e 2, p. 109-113, 1996.
- ⁴⁰ GATTAZ, W. F.; KÖLLISCH, M.; THUREN, T.; VIRTANEN, J. A.; KINNUNEN, P. K. J. Increased plasma phospholipase A2 activity in schizophrenic patients: reduction after neuroleptic therapy. *Biological Psychiatry*, v. 22, p. 421-426, 1987.

-
- ⁴¹ GATTAZ, W. F.; HÜBNER, C. K.; NEVALAINEN, T. J.; THUREN, T.; KINNUNEN, P. K. J. Increased serum phospholipase A2 activity in schizophrenia: a replication study. *Biological Psychiatry*, v. 28, p. 495-501, 1990.
- ⁴² LAW, M. H.; COTTON, R. G. H.; BERGER, G. E. The role of phospholipases A2 in schizophrenia. *Molecular Psychiatry*, v. 11, p. 547–556, 2006.
- ⁴³ BALBOA, M. A.; NIETO, I. V.; LUCAS, K. K.; DENNIS, E. A. Expression and function of phospholipase A2 in brain. *FEBS Letters*, v. 531, p. 12-17, 2002.
- ⁴⁴ ACKERMANN, E. J.; KEMPNERLL, E. S.; DENNIS, E. A. Ca²⁺- independent Cytosolic Phospholipase A2 from Macrophage-like P388D1 Cells: isolation and characterization. *The Journal of Biological chemistry*, v. 269, n. 12, p. 9227 - 9233, 1994.
- ⁴⁵ BALSINDE, J.; DENNIS, E. A. Function and Inhibition of Intracellular Calcium-independent Phospholipase A2. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 272, n. 26, p. 16069–16072, 1997.
- ⁴⁶ FORSELL, P. K. A. L.; KENNEDY, B. P.; CLAESSION, H. E. The human calcium-independent phospholipase A2 gene: multiple enzymes with distinct properties from a single gene. *European Journal of Biochemistry*, v. 262, p. 575 – 585, 1999.
- ⁴⁷ WINSTEAD, M. V.; BALSINDE, J.; DENNIS, E. A. Calcium-independent phospholipase A2: structure and function. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1488, p. 28 – 39, 2000.
- ⁴⁸ BALBOA, M. A.; NIETO, I. V.; LUCAS, K. K.; DENNIS, E. A. Expression and function of phospholipase A2 in brain. *FEBS Letters*, v. 531, p. 12 – 17, 2002.
- ⁴⁹ TALIB, Leda L. Desenvolvimento de métodos para a determinação da atividade das frações da fosfolipase A2 em plaquetas. 2006. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciências, área de concentração Psiquiatria) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.
- ⁵⁰ MORRISON, R. S.; KINOSHITA, Y.; JOHNSON, M. D.; CONRADS, T. P. Proteomics in the Postgenomic Age. *Advances in Protein Chemistry*, v. 65, p. 1-23, 2003.
- ⁵¹ AEBERSOLD, R.; GELB, M. H.; TURECEK, F.; GERBER, S. A.; RIST, B.; GYGI, S. P.; *Nature Biotechnology*, v. 17, p. 994-999, 1999.
- ⁵² SICKMANN, A.; WAGNER, I.; MOEBIUS, J.; LEWANDROSKY, U.; REINDERS, J.; *Proteomics*, v. 4, p. 3686-3703, 2004.
- ⁵³ WEIR, M. P.; BLACKSTOCK, W. P.; Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trends Biotechnology*, v. 17, n. 3, p. 121-127, 1999.
- ⁵⁴ HANASH, S. M. Clinical applications of proteomics. In: *Proteome Analysis: interpreting the Genome*. Elsevier science, 2004, c. 9, p. 225-241.

-
- ⁵⁵ DOWNING, G. J. et al. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, v. 69, n. 3, p. 89-95, 2001.
- ⁵⁶ CORTHALS, G. L. et al. The dynamic range of protein expression: a challenge for proteomic research. *Electrophoresis*, v. 21, n. 6, p. 1104-1115, 2000.
- ⁵⁷ DANZER, K.; VAN STADEN, J. F.; BURNS, D. T. Concepts and applications of the term "dimensionality" in analytical chemistry. *Pure Applied Chemistry*, v. 74, n. 8, p. 1479-1487, 2002.
- ⁵⁸ GIDDINGS, J. C. Two-dimensional separations: concept and promise. *Analytical Chemistry*, v. 56, n. 12, p. 1258A-1270A, 1984.
- ⁵⁹ HANASH, S. M. Biomedical applications of two-dimensional electrophoresis using immobilized pH gradients: current status. *Electrophoresis*, v. 21, p. 1202-1209, 2000.
- ⁶⁰ LÓPEZ, J. L. Two-dimensional electrophoresis in proteome expression analysis. *Journal of Chromatography B - analytical Technologies in The Biomedical and Life Sciences*, v. 849, p. 190-202, 2007.
- ⁶¹ DUPREE, P.; RAZZAQ, A.; LILLEY, K. S. Two-dimensional electrophoresis: recent advances in sample preparation, detection and quantitation. *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 6, p. 46-50, 2001.
- ⁶² MOLLOY, M. P. Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins using immobilized pH gradients. *Analytical Biochemistry*, v. 280, p. 1-10, 2000.
- ⁶³ GÖRG, A. et al. 2-DE with IPGs. *Electrophoresis*, v. 30, p. S122-S132, 2009.
- ⁶⁴ RABILLOUD, T.; LUCHE, S.; SANTONI, V.; CHEVALLET, M. Detergents and chaotropes for protein solubilization before two-dimensional electrophoresis. *Methods in Molecular Biology*, v. 355, p. 111-119.
- ⁶⁵ BERKELMAN, T.; STENDTEDT, T. 2-D Electrophoresis using immobilized pH gradients: principles & methods. Amersham Pharmacia Biotech Inc. 1998.
- ⁶⁶ ZELLNER, M.; et al. Quantitative validation of different protein precipitation methods in proteome analysis of blood platelets. *Electrophoresis*, v. 26, p. 2481 – 2489, 2005.
- ⁶⁷ KARAS, M.; HILLENKAMP, F.; Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Analytical Chemistry*, v. 60, p. 2299-2301, 1988.
- ⁶⁸ FENN, J.B.; MANN, M.; MENG, C.K.; WONG, S.F.; WHITEHOUSE, C.M.; Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*, v. 246, p. 64-71, 1989.

⁶⁹ CANTÚ, M. D.; CARRILHO, E.; WULFF, N. A.; PALMA, M. S. Sequenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático. *Química Nova*, v. 31, p. 669-675, 2008.

⁷⁰ WOLFF, S. et al. Gel-free and gel-based proteomics in *Bacillus subtilis*. *Molecular & Cellular Proteomics*, v. 5, n. 7, p. 1183-1192, 2006.

⁷¹ MOLLOY, M. P. et al. Overcoming technical variation and biological variation in quantitative proteomics. *Proteomics*, v. 3, n. 10, p. 1912-9, 2003.

⁷² ÜNLÜ, M.; MORGAN, M. E.; MINDEN, J. S. Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis*, v. 18, p. 2071-2077, 1997.

⁷³ GE Healthcare. 2D Electrophoresis: principles and methods. München, 2004.

⁷⁴ GE Healthcare, 2011. Disponível em: <<http://www.gelifesciences.com/aptrix/upp01077.nsf/Content/Products?OpenDocument&moduleid=166392>>. Acessado em: 20 Maio 2011.

⁷⁵ DECODON, 2011. Disponível em: <<http://www.decodon.com>>. Acessado em: 20 Maio 2011.

⁷⁶ MOTOYAMA, A.; YATES, J. R. 3rd. Multidimensional LC separations in shotgun proteomics. *Analytical Chemistry*, v. 80, n. 19, p. 7187-7193, 2008.

⁷⁷ HAUDEK, V. J.; SLANY, A.; GUNDACKER, N. C.; WIMMER, H.; DRACH, J.; GERNER, C. Proteome Maps of the Main Human Peripheral Blood Constituents. *Journal of Proteome Research*, v. 8, p. 3834–3843, 2009.

⁷⁸ LIM, M.D.; DICKHERBER, A.; COMPTON, C. C. Before you analyze a human specimen, think quality, variability, and bias. *Analytical Chemistry*, v. 83, p. 8-13, 2011.

⁷⁹ GARCÍA, A.; SENIS, Y.; TOMLINSON, M. G.; WATSON, S. P. Platelet genomics and proteomics. In: Michelson AD editor. *Platelets* (second edition). Elsevier/Academic Press, USA, 2007. pp. 99-116.

⁸⁰ MANADAS, B. J.; VOUGAS, K.; FOUNTOLAKIS, M.; DUARTE, C. B. Sample sonication after trichloroacetic acid precipitation increases protein recovery from cultured hippocampal neurons, and improves resolution and reproducibility in two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis*, v. 27, p. 1825–1831, 2006.

⁸¹ RABILLOUD, T. Use of thiourea to increase the solubility of membrane proteins in two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis*, v. 19, n. 5, p. 758-760, 1998.

⁸² MAGUIRE, P. B.; FITZGERALD, D. J. Platelet proteomics. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, v. 1, p. 1593 – 1601, 2003.

-
- ⁸³ ZELLNER, M.; et al. Quantitative validation of different protein precipitation methods in proteome analysis of blood platelets. *Electrophoresis*, v. 26, p. 2481 – 2489, 2005.
- ⁸⁴ HAMMACK, B. N.; OWENS, G. P.; BURGOON, M. P.; GILDEN, D. H. Improved resolution of human cerebrospinal fluid proteins on two-dimensional gels. *Multiple Sclerosis*, v. 9, p. 472 – 475, 2003.
- ⁸⁵ TANTIPAIBOONWONG, P. et al. Different techniques for urinary proteins analysis of normal and lung cancer patients. *Proteomics*, v. 5, p. 1140 – 1149, 2005.
- ⁸⁶ BAE, S. H. et al. Strategies for the enrichment and identification of basic proteins in proteome projects. *Proteomics*, v. 3, p. 569 – 579, 2003.
- ⁸⁷ LUCHE, S.; DIEMER, H.; TASTET, C.; CHEVALLET, M.; VAN DORSSELAER, A.; LEIZE-WAGNER, E.; RABILLOUD, T. About thiol derivatization and resolution of basic proteins in two-dimensional electrophoresis. *Proteomics*, V. 4, P. 551–561, 2004.
- ⁸⁸ CHINNASAMY, G.; RAMPITSCH, C. Efficient solubilization buffers for two-dimensional gel electrophoresis of acidic and basic proteins extracted from wheat seeds. *Biochimica et Biophysica Acta*, V. 1764, P. 641 – 644, 2006.
- ⁸⁹ PENNINGTON, K.; MCGREGOR, E.; BEASLEY, C.; EVERALL, I.; COTTER, D.; DUNN, M. J. Optimization of the first dimension for separation by two-dimensional gel electrophoresis of basic proteins from human brain tissue. *Proteomics*, v. 4, p.27–30, 2004.
- ⁹⁰ HOVING, S.; GERRITS, B.; VOSHOL. H.; MÜLLER, D.; ROBERTS, R. C.; VAN OOSTRUM, J. Preparative two-dimensional gel electrophoresis at alkaline pH using narrow range immobilized pH gradients. *Proteomics*, v. 2, p.127–134, 2002.
- ⁹¹ BARRY, R. C.; ALSAKER, B. L.; ROBISON-COX, J. F. DRATZ, E. A. Quantitative evaluation of sample application methods for semipreparative separations of basic proteins by two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis*, v. 24, p. 3390–340
- ⁹² WESTERMEIER, R.; NAVEN, T. Proteomics in practice: a laboratory manual of proteome analysis. Ed. WileyVCH. Primeira edição, p. 15 27. Weinheim, 2002.
- ⁹³ RABILLOUD, T. Solubilization of proteins for electrophoresis analyses. *Electrophoresis*, v. 17, p. 813-829, 1996.
- ⁹⁴ RIGHETTI, P. G. Immobilized pH gradients: theory, methodology and applications. Elsevier, Amsterdam, 1990.
- ⁹⁵ POLAND, J.; BÖHME, A.; SCHUBERT, K.; SINHA, P. Revisiting electroblotting of immobilized pH gradient gels: A new protocol for studying post-translational modification of proteins. *Electrophoresis*, v. 23, p. 4067–4071, 2002.

-
- ⁹⁶ TOWBIN, H.; ÖZBEY, Ö.; ZINGEL, O. An immunoblotting method for high-resolution isoelectric focusing of protein isoforms on immobilized pH gradients. *Electrophoresis*, v. 22, p. 1887 – 1893, 2001.
- ⁹⁷ FOUNTOULAKIS, M.; TAKÁCS, B. Effect of strong detergents and chaotropes on the detection of proteins in two-dimensional gels. *Electrophoresis*, v. 22, p. 1593–1602, 2001.
- ⁹⁸ RIGHETTI, P. G.; BOSSI, A. Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: recent analytical and preparative developments. *Analytical Biochemistry*, v. 247, p. 1-10, 1997.
- ⁹⁹ HANASH, S. M. Biomedical applications of two-dimensional electrophoresis using immobilized pH gradients: current status. *Electrophoresis*, v. 21, p. 1202-1209, 2000.
- ¹⁰⁰ ADESSI, C.; MIEGE, C.; ALBRIEUX, C.; RABILLOUD, T. Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins: a current challenge for immobilized pH gradients. *Electrophoresis*, v. 18, p. 127-135, 1997.
- ¹⁰¹ ALTLAND, K. *et al.* Hybrid isoelectric focusing: adsorption of proteins onto immobilized pH gradient matrices and desorption by carrier ampholytes. *Electrophoresis*, v. 8, p. 52-62, 1987.
- ¹⁰² RABILLOUD, T.; GELFI, C.; BOSSI, M. L.; RIGHETTI, P. G. Protein precipitation induced by alkaline immobilines for isoelectric focusing in immobilized pH gradients: causes and remedies. *Electrophoresis*, v. 8, p. 305-312, 1987.
- ¹⁰³ RIGHETTI, P. G.; GELFI, C.; BOSSI, M. L.; BOSCHETTI, E. Isoelectric focusing and no-isoelectric precipitation of ferritin in immobilized pH gradients: an improved protocol overcoming protein-matrix interactions. *Electrophoresis*, v. 8, p. 62-70, 1987.
- ¹⁰⁴ TANFORD, C. The hydrophobic effect: formation of micelles and biological membranes. Wiley, New York, p. 1-3, 1980.
- ¹⁰⁵ TANFORD, C. Contribution of hydrophobic interactions to the stability of the globular conformation of proteins. *Journal of the American Chemical Society*, v. 84, n. 22, p. 4240-4247, 1962.
- ¹⁰⁶ RABILLOUD, T. Solubilization of proteins for electrophoresis analyses. *Electrophoresis*, v. 17, p. 813-829, 1996.
- ¹⁰⁷ LÓPEZ, J. L. Two-dimensional electrophoresis in proteome expression analysis. *Journal of Chromatography B*, v. 849, p. 190-202, 2007.
- ¹⁰⁸ WILKINS, M. R.; GASTEIGER, E.; SANCHEZ, J. C.; BAIROCH, A.; HOCHSTRASSER, D. F. Two-dimensional gel electrophoresis for proteome projects: the effects of protein hydrophobicity and copy number. *Electrophoresis*, v. 19, p. 1501-1505, 1998.
- ¹⁰⁹ KYTE, J.; DOOLITTLE, R. F. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology*, v. 157, p. 105-132, 1982.

-
- ¹¹⁰ SANTONI, V.; MOLLOY, M. P.; RABILLOUD, T. Membrane proteins and proteomics: un amour impossible? *Electrophoresis*, v. 21, p. 1054-1070, 2000.
- ¹¹¹ MOLLOY, M. P. Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins using immobilized pH gradients. *Analytical Biochemistry*, v. 280, p. 1-10, 2000.
- ¹¹² HERBERT, B. Advances in protein solubilisation for two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis*, v. 20, p. 660-663, 1999.
- ¹¹³ HERBERT, B. R.; MOLLOY, M. P.; GOOLEY, A. A.; WALSH, B. J.; BRYSON, W. G.; WILLIAMS, K. L. Improved protein solubility in two-dimensional electrophoresis using tributyl phosphine as reducing agent. *Electrophoresis* 1998, 19, 845-851.
- ¹¹⁴ APITZ-CASTRO, R. J.; CRUZ, M. R.; MAS, M. A.; JAIN, M. K. Further studies on a phospholipase A2 isolated from human platelet plasma membrane. *Thrombosis Research*, v. 23, p. 347-354, 1981.
- ¹¹⁵ TRUGNAN, G.; BEREZIAT, G.; MANIER, M. C.; POLONOVSKY, J. Phospholipase activities in subcellular fractions of human platelets. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 573, p. 61-72, 1979.
- ¹¹⁶ AEBERSOLD, R.; DOMON, B.; Options and considerations when selecting a quantitative proteomics strategy. *Nature Biotechnology*, v. 28, n. 7, p.710-721, 2010.
- ¹¹⁷ MARTINS-DE-SOUZA, D. et al. Proteome analysis of the thalamus and cerebrospinal fluid reveals glycolysis dysfunction and potential biomarkers candidates for schizophrenia. *Journal of Psychiatric Research*, v. 44, p. 1176-1189, 2010.
- ¹¹⁸ MARTINS-DE-SOUZA, D. et al. Proteome analysis of schizophrenia brain tissue. *The World Journal of Biological Psychiatry*, v. 11, p. 110–120, 2010.
- ¹¹⁹ MARTINS-DE-SOUZA, D. et al. Different apolipoprotein E, apolipoprotein A1 and prostaglandin-H2 D-isomerase levels in cerebrospinal fluid of schizophrenia patients and healthy controls. *The World Journal of Biological Psychiatry*, v. 11, p. 719–728, 2010.
- ¹²⁰ MARTINS-DE-SOUZA, D. et al. Prefrontal cortex shotgun proteome analysis reveals altered calcium homeostasis and immune system imbalance in schizophrenia. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscienc*, v. 259, p. 151–163, 2009.
- ¹²¹ MARTINS-DE-SOUZA, D. et al. Proteome analysis of schizophrenia brain tissue. *The World Journal of Biological Psychiatry*, v. 11, p. 110–120, 2010.
- ¹²² CLAYA, H. B.; SILLIVAN, S.; KONRADI, C. Mitochondrial dysfunction and pathology in bipolar disorder and schizophrenia. *International Journal of Developmental Neuroscience*, v. 29, p. 311–324, 2011.

¹²³ PRABAKARAN, S. Mitochondrial dysfunction in schizophrenia: evidence for compromised brain metabolism and oxidative stress. *Molecular Psychiatry*, v. 9, p. 684–697, 2004.

¹²⁴ National Center for Biotechnology Information, Bethesda, USA, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/P32119>>. Acesso em: 01 jun 2011.

¹²⁵ YAO, J. K.; KESHAVAN, M. S. Antioxidants, Redox signaling, and pathophysiology in schizophrenia: an integrative view. *Antioxidants & Redox Signaling*, indisponível, doi:10.1089/ars.2010.3603, 2011.

¹²⁶ ZHANG, X. Y. The novel oxidative stress marker thioredoxin is increased in first-episode schizophrenic patients. *Schizophrenia Research*, v. 113, p. 151-157, 2009

APÊNDICE I: documentação do processo de coleta das amostras

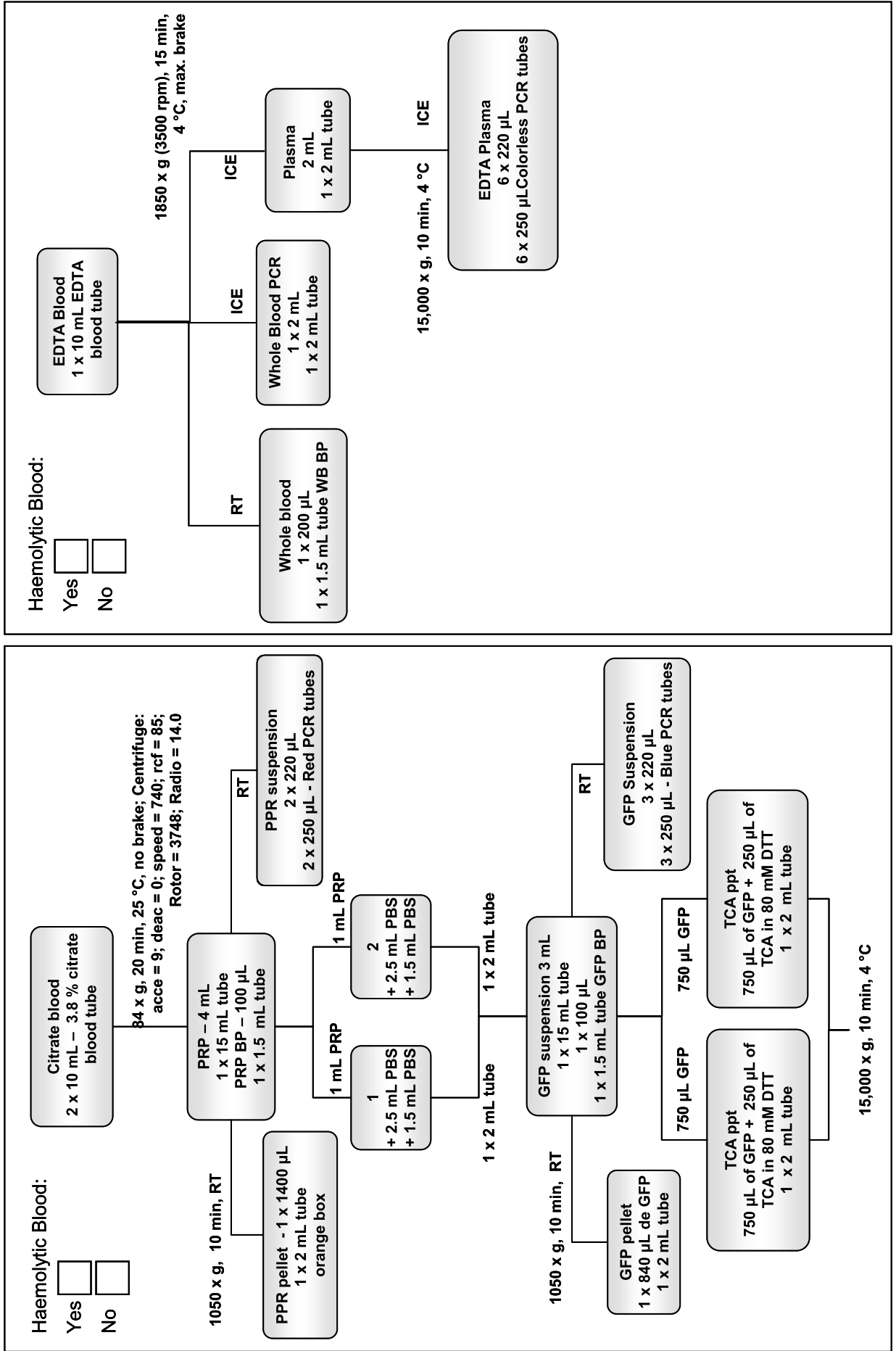
DATA blood collection: _____ / _____ / _____ PATIENT code: _____ Age: _____

Sex: Male / Female

Smoker: Yes / No

Time: _____

OBSERVATION:



APÊNDICE II: protocolos de preparo das soluções utilizadas as análises de 2DE

Tampão de ressolubilização com uréia

Reagente	Concentração final	g/20 mL
Uréia	7 M	8,41
Tiouréia	2 M	3,04
Amberlite IRN-150L	1% m/v	
Remova as impurezas iônicas com a amberlite por 1 h e depois filtrar a solução (0,2 µm)		
Tris base	15 mM	0,0363
O pH deve ser ≥ 8,5. Verifique antes de continuar.		
CHAPS	4% m/v	0,8
Filtre (0,2 µm) e faça alíquotas de 400 µL e estoque a – 20 °C.		

Solução de reidratação

Reagente	Concentração final	g/20 mL
Uréia	7 M	8,41
Tiouréia	2 M	3,04
Amberlite IRN-150L	1% m/v	
Remova as impurezas iônicas com a amberlite por 1 h e depois filtrar a solução (0,2 µm)		
CHAPS	4% m/v	0,8
Azul de bromofenol 1%	0,002%	40 µL
Filtre (0,2 µm) e faça alíquotas de 400 µL e estoque a – 20 °C. Adicione na hora do uso para um volume de 450 µL:		
IPG buffer (pH 4 – 7 ou 6 – 9)	1% ou 2% v/v	
DTT 4 M (pH 4 – 7 ou 6 – 9)	70 ou 150 mM	

Solução estoque de azul de bromofenol 1%

Reagente	Concentração final	Quantidade
Azul de bromofenol	1%	10 mg
Tris base	50 mmol L ⁻¹	6 mg
Água		1 mL

Solução de rehidratação alternativa com uréia e tiouréia

Reagente	Concentração final	Quantidade(p/ 10 mL)
Uréia ($60,06 \text{ g mol}^{-1}$)	7 M	4,20 g
Tiouréia ($76,12 \text{ g mol}^{-1}$)	2 M	1,52 g
CHAPS	2% (m/v)	200 mg
IPG buffer	de 0,5 % até 2 % (v/v)	50 μL (0,5 %)
Isopropanol	10 % (v/v)	1 mL
Glicerol	5 % (v/v)	500 μL
Azul de bromofenol 1%	0,002 %	20 μL
Água ultra-pura	-	10 mL (4 mL)

Solução estoque de acrilamida 30% Manter à 4 °C. e protegida da luz

Reagente	Concentração final	Quantidade
Acrilamida ($71,08 \text{ g mol}^{-1}$)	30 %	300 g
N,N'-metilenobisacrilamida ($154,17 \text{ g mol}^{-1}$)	0,8 %	8 g
Água		q.s.p 1000 mL

Tris-base $1,5 \text{ mol L}^{-1}$ pH 8,88 (4x resolving gel buffer solution)

Reagente	Concentração final	Quantidade
Tris base ($121,1 \text{ g mol}^{-1}$)	$1,5 \text{ mol L}^{-1}$	36,3 g
Água		170 mL
HCl		200 μL (ajustar o pH para 8,88)
Água		q.s.p 200 mL

Preparo do gel de poliacrilamida 11,5%

Reagente	Concentração final	Quantidade para 500 mL
Solução de acrilamida 30%	11,58% m/v	193 mL
Tampão tris pH 8,88	375 mM	125 mL
Água ultra purificada		178 mL
SDS	0,1% m/v	0,5 g
	Desgasificar por 1 h	
Persulfato de sódio 10%	0,075% m/v	3,75 mL
TEMED	0,033% v/v	0,165 mL

Solução estoque de agarose 0,5 %

Reagente	Concentração final	Quantidade
Tampão tris base 1,5 M pH 8,88	375 mM	25 mL
Agarose	0,5% m/v	0,5 g
SDS 10%	0,1%	1 mL
Azul de bromofenol 1%	0,002% m/v	200 µL
Água		q.s.p 100 mL
Aquecer para dissolver		

Persulfato de amônio 10% (preparado na hora do uso)

Reagente	Concentração final	Quantidade
Persulfato de amônio ($228,20 \text{ g mol}^{-1}$)	10% (m/v)	0,4 g
Água		4 mL

Tampão de corrida concentrado (10x Laemmli electrophoresis buffer)

Reagente	Concentração final	Quantidade
Tris-base ($121,1 \text{ g mol}^{-1}$)	250 mmol L^{-1}	30,3 g
Glicina ($75,07 \text{ g mol}^{-1}$)	$1,92 \text{ mol L}^{-1}$	144,1 g
SDS ($288,38 \text{ g mol}^{-1}$)	1 % (m/v)	10 g
Água		1 L

Solução de equilíbrio

Reagente	Concentração final	Quantidade
Tris-basse $1,5 \text{ mol L}^{-1}$ pH 8,8	75 mmol L^{-1}	5 mL
Uréia 6 mol L^{-1} ($60,06 \text{ g mol}^{-1}$)	6 mol L^{-1}	36,05 g
Glicerol (87 % m/m)	29,3 % (v/v)	34,5 mL (42,1 g)
SDS ($288,38 \text{ g mol}^{-1}$)	2% (m/v)	2 g
Azul de bromofenol 1%	0,002% (m/v)	200 µL
Água		q.s.p 100 mL

*Estocar alíquotas de 25 mL (fitas de 24 cm) a - 20 C.

Solução de DTT (preparada na hora do uso)

Reagente	Concentração final	Quantidade
DTT (ditiotreitól)	10 mg/mL	250 mg
Solução de equilíbrio		25 mL

Solução de IAA (preparar na hora do uso)

Reagente	Concentração final	Quantidade
IAA (iodoacetamida)	25 mg/mL	625 mg
Solução de equilíbrio		25 mL

Determinação de proteína total pelo método de Bradford

Padrões de albumina bovina (BSA)

	Concentração [mg/mL]	Volume de BSA [1mg/mL] (μ L)	Volume de PBS (μ L)
S1	0.00	0	950
S2	0.05	50	900
S3	0.10	100	850
S4	0.15	150	800
S5	0.20	200	750
S6	0.25	250	700
S7	0.30	300	650

Adicionar a 95 μ L de cada padrão 5 μ L de sample buffer (matriz interferente).

Diluir 5 μ L da amostra em 95 μ L PBS (1:20).

Adicionar 20 μ L de cada padrão/amostra em cada poço fazendo triplicata.

Adicionar 200 μ L do reagente de Bradford (Coomassie Plus Protein, Pierce: Lot: 23236)

Fazer a leitura em leitor de microplacas no $\lambda = 595$ nm.

Coloração com prata compatível com MS

Tratamento do gel após a 2ª dimensão Ettan Dalt géis

Etapa	Solução	Tempo (min)
Fixação	50% Metanol (etanol) e 5% ácido acético em água	60
Lavagem	50% Metanol (etanol) em água	20
Lavagem	Água bidestilada	10
Lavagem	Água bidestilada	120
Sensibilização	0,025% Na ₂ S ₂ O ₃ em água	3
(2x) Lavagem	Água bidestilada	1
Coloração	0,15% AgNO ₃ em água gelada	45
(2x) Lavagem	Água bidestilada	1
Revelação	3% Na ₂ CO ₃ e 0,05% de formaldeído em água	3 - 10 min
(3x) Interrupção	5% de ácido acético em água	5 min
Estoque	1% ácido acético à 4 °C	

Protocolo de digestão triptica

Solução descolorante 15 mM $K_3Fe(CN)_6$ 50 mM $Na_2S_2O_3$ em H_2O	Misture antes de usar: 1 mL 150 mM $K_3Fe(CN)_6$ + 1 mL 500 mM $Na_2S_2O_3$ + 8 mL H_2O	Instável, prepare diariamente	Descoloração	Adicione 500 μL [15 mM $K_3Fe(CN)_6$ / 50 mM $Na_2S_2O_3$] em cada tubo.	Vortex até descolorar completamente, 2-5 min; Centrifugue e remova o sobrenadante.	Vortex bem, pois é importante remover completamente o reagente colorante.
Solução de lavagem 50% Etanol, 10% CH_3COOH 40% H_2O	50 mL Etanol, 10 mL CH_3COOH 40 mL H_2O	Mantenha à 4 °C.	Lavagem	Adicione 500 μL [50% EtOH, 10% CH_3COOH , 40% H_2O] em cada tubo.	Incube 4 x em um thermomixer (800 rpm, TA, 5-5-10-10 min).	Mantenha a amostra na última solução de lavagem se necessário interromper o procedimento.
Solução tampão 50 mM NH_4HCO_3 MM = 79,06 g/mol	Dissolva 0,1977 g NH_4HCO_3 em 50 mL H_2O . Prepare diariamente.	O NH_4HCO_3 se CO_2 , NH_3 and H_2O .	Ajuste do pH	Adicione 500 μL [50 mM NH_4HCO_3] em cada tubo.	Incube 1 x em um thermomixer (800 rpm, TA, 5 min).	Cuide para não perder nenhum pedaço de gel, pois eles grudam na ponteira da pipeta.
Redução - SH 10 mM DTT em 50 mM NH_4HCO_3	50 μL 1 M DTT (100x solução estoque) q.s.p 5 mL 50 mM NH_4HCO_3	Prepare diariamente.	Redução	Adicione 500 μL [10 mM DTT in 50 mM NH_4HCO_3] in each tube.	Incube 1 x em um thermomixer (800 rpm, 56 °C, 30 min).	Centrifugue e remova o sobrenadante.
Solução tampão 50 mM NH_4HCO_3 MM = 79,06 g/mol	Dissolva 0,1977 g NH_4HCO_3 em 50 mL H_2O . Prepare diariamente.		Lavagem	Adicione 500 μL [50 mM NH_4HCO_3] em cada tubo.	Incube 1 x em um thermomixer (800 rpm, TA, 5 min).	
Alquilação 50 mM IAA em 50 mM NH_4HCO_3	Adicione 500 μL de 500 mM IAA (100x solução estoque em NH_4HCO_3) a 4,5 mL de 50 mM NH_4HCO_3	Prepare diariamente.	Alquilação	Adicione 500 μL [50 mM IAA in 50 mM NH_4HCO_3] em cada tubo.	Incube 1 x (TA, 20 min, no escuro).	Descarte a solução de IAA em local adequado pois é muito tóxica.
Solução tampão 50 mM NH_4HCO_3 MM = 79,06 g/mol			Lavagem	Adicione 500 μL [50 mM NH_4HCO_3] em cada tubo.	Incube 1 x em um thermomixer (800 rpm, TA, 5 min).	
Acetonitrila 100% (ACN)			Desidratação	Adicione 100 – 200 μL ACN em cada tubo.	Incube 1 x in thermomixer (800 rpm, TA, 2-5 min). Centrifugue e remova o sobrenadante.	Os géis devem estar desidratados (brancos), porém não tanto a ponto de grudarem.

				Secagem							
8x solução estoque Tripsina	25 µg / 250 µL 1 mM HCl; Faça alíquotas de 10 µL. A tripsina é inativa nesse pH.										
Solução de trabalho Tripsina	Diluição de 1:8 10 µL alíquota + 70 µL 50 mM NH ₄ HCO ₃ A tripsina é ativa nesse pH.										
Solução tampão 50 mM NH ₄ HCO ₃ MM = 79,06 g/mol	Dissolva 0,1977 g NH ₄ HCO ₃ em 50 mL H ₂ O. Prepare diariamente.										
Solução de eluição 50% Acetonitrila 5% ácido fórmico.	50 mL Acetonitrila 100% 5,5 mL ácido fórmico 90% Completar até 100 mL H ₂ O										
Solução de eluição 50% Acetonitrila 5% ácido fórmico.	50 mL Acetonitrila 100% 5,5 mL ácido fórmico 90% Completar até 100 mL H ₂ O										

APÊNDICE III: Contribution of hydrophobic interactions to the stability of the globular conformation of proteins.

TANFORD, C. Journal of the American Chemical Society, v. 84, n. 22, p. 4240-4247, 1962.

É bem estabelecido que o processo de desenovelamento de uma proteína com estrutura nativa em solução é reversível. Isso sugere que a conformação nativa é termodinamicamente estável, determinada pela natureza e sequência de aminoácidos que a constituem e por suas interações entre si e com o solvente ao redor. Tanford calculou o ΔG para a seguinte reação:

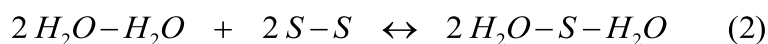


$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S$$

Onde: X_0 é a proteína na forma nativa, X_1 é a proteína desenovelada. O aumento da entropia conformacional (gerada pela aumento de flexibilidade da cadeia), que acompanha o desenovelamento é a principal contribuição para o ΔG dessa reação. Quando ΔS é positivo e com uma grande magnitude, o termo $- T \Delta S$ torna-se muito grande e negativo, favorecendo a forma desenovelada. Porém, observamos que, em água, a conformação globular compacta é bastante estável. Desse modo, é necessário supor que existam interações locais que gerem uma grande contribuição positiva para o ΔG . Uma dessas interações é chamada de interação hidrofóbica, que resulta da organização das moléculas de água ao redor das porções não polares das cadeias laterais dos aminoácidos que compõem as moléculas de proteínas.

O efeito hidrofóbico é originado pela grande magnitude da força de atração entre as moléculas de água que, estando isotropicamente organizadas, deve ser rompida ou distorcida quando um soluto qualquer é dissolvido em

água. Se o soluto é iônico ou muito polar, ele pode interagir fortemente com as moléculas de água, compensando a ruptura e a deformação das ligações existentes em água pura. Assim, substâncias iônicas ou polares são facilmente solubilizadas em água. Quando temos grupos não polares a compensação não ocorre e, por isso, a sua solubilização em água é dificultada. Considerando as interações intermoleculares, podemos representar a solubilização de um soluto não polar S em água, de acordo com a reação abaixo representada:



A grande magnitude da força das ligações de hidrogênio entre as moléculas de água, faz com que o equilíbrio representado na equação (2) seja deslocado para a esquerda. Para dimensionar o quão grande é a magnitude dessa força, o produto hipotético formado na equação (2) não chega a romper a ligação, apenas causa a sua deformação, ou seja, a interação entre as moléculas continua, mesmo tendo o soluto S como interponente, considerando o sistema em baixas temperaturas. Para minimizar a interferência do soluto S, a água se organiza ao seu redor formando estruturas semelhantes à gaiolas, denominadas clatratos, que o aprisionam. Isso ocasiona a diminuição da entropia ao invés de diminuir a energia das ligações, desfavorecendo a energia livre do processo. Assim, podemos dizer que as interações hidrofóbicas são entropicamente dirigidas.

As moléculas de proteínas são anfífilas, pois contêm aminoácidos com cadeias laterais de natureza hidrofóbica e também aminoácidos com cadeias laterais iônicas e polares. A cadeia polipeptídica contém grupos de

peptídeos muito hidrofílicos, mas este efeito pode ser anulado pela formação de ligações de hidrogênio interpeptídicas, como as que existem nas α -hélices e estruturas β . O contato entre a água e as porções não polares da molécula de proteína ocorre com uma freqüência muito maior quando a proteína está desenovelada, quando comparada com a sua forma nativa (Figura 1), resultando, assim, em uma contribuição positiva para o ΔG . O aumento de entropia conformacional gerado pelo desenovelamento é superado pela diminuição da entropia quando as partes não polares da proteína são expostas e entram em contato com a água. A entropia do sistema (proteína) aumenta com o processo de desenovelamento mas a entropia da vizinhança (água) diminui numa magnitude muito maior devido ao efeito hidrofóbico, resultando numa diminuição da entropia do universo desfavorecendo o processo. O fator entrópico não é o único utilizado para explicar a estruturação da conformação das proteínas, existem outros que podem contribuir para isso. No entanto, considerando as interações hidrofóbicas, o principal fator que contribui a favor do enovelamento, como dito antes, é a entropia. [2]

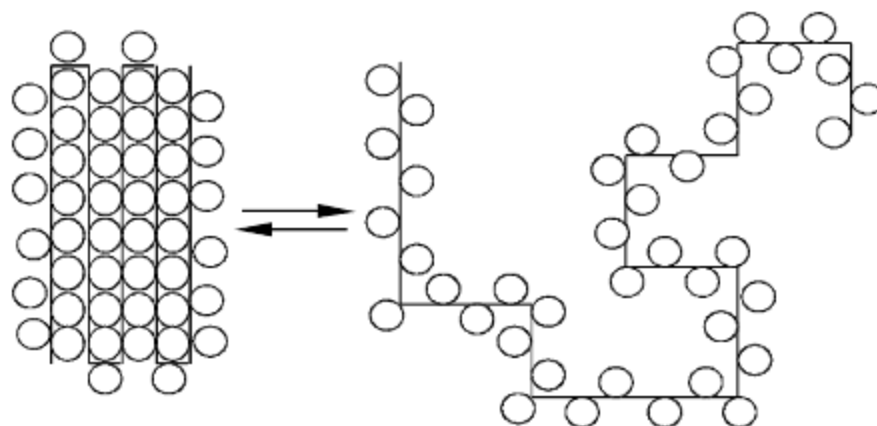


Figura 1: Diagrama esquemático dos estados nativo e desenovelado de uma proteína. Os círculos representam as cadeias laterais dos aminoácidos. [1]

Quando os aminoácidos com cadeias laterais não polares são dissolvidos em água, as mesmas interações ocorrem. A magnitude dessas interações pode ser estimada pelas solubilidades relativas de aminoácidos apropriados em água e outros solventes. Tais estimativas foram feitas por C. Tanford^[1], que concluiu que as interações hidrofóbicas sozinhas pode ser capazes de explicar a instabilidade de uma proteína desenovelada, com relação a conformação globular adequada, em solução aquosa.

Desenvolvimento do modelo

Antes de descrever o modelo, algumas considerações gerais utilizada nos cálculos devem ser salientadas:

- As contribuições de energia e entropia para a energia livre são calculadas separadamente.
- A natureza macromolecular do soluto entra somente no cálculo da entropia, de duas maneiras: (a) na forma de um volume de exclusão potencialmente grande, o que conduz a um efeito da concentração do soluto potencialmente grande na energia livre e (b) na forma de uma entropia configuracional da cadeia polimérica potencialmente grande.
- A contribuição energética para o ΔG é computada unicamente como a soma das energias de interação dos vizinhos mais próximos, com diferentes valores atribuídos às interações devido aos contatos segmento do polímero/segmento do polímero, segmento do polímero/solvente e solvente/solvente (nessa parte do cálculo somente o ambiente imediato de qualquer parte da cadeia polimérica precisa ser especificado). Os efeitos das

interações vicinais podem ser computados como se as partes interagentes fossem pequenas moléculas ao invés de macromoléculas.

- A variação de energia livre será calculada a diluição infinita de modo que os termos dependentes da concentração da energia livre não entrem no cálculo.
- A conformação nativa é considerada a única enovelada com nenhuma flexibilidade, cujo interior é inacessível e completamente desprovido do solvente.
- A conformação desenovelada é considerada flexível e randômica, suficientemente estendida de modo que todas as suas partes estejam em contato com o solvente ao redor.
- A diferença de flexibilidade das cadeias entra no cálculo da variação da entropia configuracional enquanto que a influência das ligações de dissulfeto não são consideradas nesse cálculo.
- Na proteína nativa, muitas de suas partes estão em contato com um ambiente formado por outras partes da proteína. Isso gera mudanças grandes na contribuição das interações vicinais para a energia livre. Para calcular essas mudanças é necessário ser um pouco específico com relação à estrutura atual da proteína enovelada. Três suposições são consideradas: (1) os grupos carregados da proteína na conformação nativa estão na interface proteína/solvente; isto significa que esses grupos têm o mesmo ambiente (solvente aquoso) tanto na forma nativa quanto na desenovelada; (2) a maior parte das porções não-polares ou hidrofóbicas da molécula estão no interior da estrutura nativa, considerando como hidrofóbicas as cadeias laterais totalmente não polares, como a leucina, mas também as cadeias laterais com partes não

polares que contêm grupos carregados ou polares, como os 4 metilenos da lisina; (3) na estrutura primária da molécula não existe uma separação espacial bem definida entre as partes polares e não polares da cadeia polimérica. Os grupos polares podem estar presentes tanto no interior da proteína nativa (formando ligações de hidrogênio entre si) como na superfície (formando ligações de hidrogênio com a água).

Cálculo da energia livre de desenovelamento em água

A energia livre de desenovelamento pode ser calculada de acordo com a equação (3).

$$\Delta G = \sum \Delta f_u - T \Delta S_{\text{conf}} \quad (3)$$

$\Delta S_{\text{conf}} \equiv$ é a variação da entropia conformacional da cadeia polipeptídica.

$\Delta f_u \equiv$ é a variação de energia livre para a transferência de pequenos grupos da molécula, do ambiente em que ele ficam quando na forma nativa para o ambiente quando na forma desenovelada.

Cálculo da ΔS_{conf}

$$\Delta S_{\text{conf}} = R \ln z^x \quad (4)$$

$x \equiv$ é o número de pontos de flexibilidade por molécula.

$z \equiv$ é o número de orientações possíveis de igual energia em cada um dos pontos x .

Na conformação nativa (assumida como completamente inflexível) ΔS_{conf} é zero. Kauzmann^[3] sugere que as proteínas com configuração aleatória podem ter, em média, três posições de flexibilidade por resíduo com $z = 2$ em cada posição. Isto nos dá um entropia de $4,1 n$ e. u. por mol, onde n é o número de resíduos. A consideração de Kauzmann nos fornece uma contribuição ($- T \Delta S_{\text{conf}}$) para energia livre, à 25 °C, igual a $- 1.200$ cal/resíduo. Este fator entrópico, sozinho, estabiliza a forma desenovelada da molécula de proteína por uma quantidade muito grande. Nesse cálculo as contribuições para a entropia vindas das ligações cruzadas de dissulfeto foram desconsideradas.

Cálculo do $\sum \Delta f u$

Pelo cálculo anterior, vemos que o fator entrópico estabiliza a forma desenovelada, favorecendo o processo. Assim, o fator $\sum \Delta f u$ deve ser correspondentemente grande e positivo para resultar na estabilização da forma nativa globular. São duas as principais possibilidades para que isso ocorra:

(1) os grupos polares não carregados, têm uma energia livre menor quando eles participam da ligações de hidrogênio dentro da estrutura nativa do que quando fazem estas ligações com a água na forma desenovelada.

(2) a interações hidrofóbicas entre a água e as partes não polares da molécula de proteína dão uma grande contribuição para o $\sum \Delta f u$. Estas

interações geram um aumento da energia livre sempre que exista contato entre a água e as partes não polares da proteína. Na forma desenovelada ocorrem muitos desses contatos, enquanto que na forma nativa nenhum contato ocorre (idealmente). Assim, $\sum \Delta f_u$ tem de possuir um valor elevado e positivo.

As ligações de hidrogênio formadas com a água são mais fortes que as intramoleculares. ^[4] Isso dá um valor negativo para $\sum \Delta f_u$. A contribuição que as interações hidrofóbicas dão, sozinhas, para o $\sum \Delta f_u$ será calculada a partir do valor das solubilidades de aminoácidos em etanol e em água, medidas em vários laboratórios.

A equação (5) mostra como relacionar os valores de solubilidades obtidos com a variação de energia livre de transferência.

$$\Delta G_t = RT \ln (N_{\text{etOH}}/N_{\text{H}_2\text{O}}) \quad (5)$$

$\Delta G_t \equiv$ é a variação de energia livre para a transferência de um mol de aminoácido, na mesma concentração, do etanol para a água. ΔG_t é uma medida das parcelas do potencial químico das moléculas de aminoácidos que se originam da interação com o solvente.

N_{EtOH} e $N_{\text{H}_2\text{O}} \equiv$ são as solubilidades dos aminoácidos, em unidades de fração molar, para o etanol e a água, respectivamente.

Esses dados são utilizados para calcular a contribuição das cadeias laterais dos aminoácidos (principalmente aqueles não-polares) para o ΔG_t , com cada contribuição sendo a diferença entre o ΔG_t para um aminoácido qualquer e o ΔG_t para a glicina.

$$\Delta G_t = \sum \Delta g_t \quad (6)$$

$\Delta g_t \equiv$ é uma contribuição constante originada de várias partes da molécula de aminoácido, ou seja, contribuição da cadeia lateral. Cada Δg_t é uma constante, como é observado analisando os dados da tabela 1.

O rearranjo de $H_2N-CO-CHR-OH$ para $^+H_3N-CHR-COO^-$ (sendo R qualquer cadeia lateral) sempre diminui ΔG_t por cerca de 3.700 cal.

A tabela 1 mostra o efeito do grupo metileno no ΔG_t . O etano tem um CH_3 a mais que o metano, enquanto que a alanina tem um CH_3 mais que a glicina e a leucina tem um CH_2 a mais que a valina. A diferença na contribuição para o Δg_t é constante, em torno de 700 cal mol⁻¹.

Tabela 1: Variação de energia livre (cal mol⁻¹) para a transferência de etanol para água à 25 °C.

Contribuição de um grupo CH_2		
	ΔG_t	Δg_t
Etano	+ 3020	
Metano	+ 2260	
Etano-metano		+ 760
Alanina-Glicina		+ 730
Leucina-valina		+ 730

Cohn e Edsall^[5] mostraram que os valores de Δg_t obtidos para a transferência das cadeias laterais de aminoácidos não polares do etanol para a água não foram significativamente diferentes daqueles obtidos a partir da

transferência da norleucina ($^+H_3N-CH-(CH_2)_3CH_3-COO^-$) de vários solventes para a água. Na tabela 2 vemos que os valores de $\Delta g_t = \Delta G_{t\text{ NOR}} - \Delta G_{t\text{ GLI}}$ são muito próximos, refletindo o efeito das interações hidrofóbicas quando o solvente é a água, visto que esta foi mantida constante enquanto que os outros solventes é que variaram. A partir desses resultados podemos assumir que a energia livre de transferência das cadeias laterais dos aminoácidos não polares, que estão dentro da molécula de proteína, para o meio aquoso, tem a mesma ordem de magnitude que esses Δg_t . Assim, podemos igualar Δg_t com o Δf_u da equação (3) Temos, então, que $\Delta g_t = \Delta f_u$ (7)

Tabela 2: Variação de energia livre (cal mol^{-1}) para a transferência da cadeia lateral da norleucina de vários solventes orgânicos para a água à 25 °C.

	ΔG_t		Δg_t
	Norleucina	Glicina	cadeia lateral - norleucina
Metanol	- 900	- 3430	+ 2530
Etanol	- 1930	- 4630	+ 2700
Butanol	- 2330	- 5190	+ 2860
Acetona	- 3320	- 6000	+ 2680

Anteriormente, assumimos que as cadeias laterais não polares contendo grupos carregados ou polares também estariam sujeitas ao efeito hidrofóbico. Comparando os valores de Δg_t para a tirosina e a fenilalanina, na tabela 3, vemos que o fato de a tirosina contar com o grupo polar OH, não provoca grandes alterações no valor da contribuição dada pelas suas cadeias laterais. Isso resulta que o Δg_t da tirosina pode ser igualado com o valor Δf_u na equação 1. Em contrapartida, quando comparamos as contribuições das

cadeias laterais da lisina e da norleucina (tabela 3) vemos que os grupos metilenos da lisina $-(\text{CH}_2)_4-$ não são tão hidrofóbicos, quanto os da norleucina $-(\text{CH}_2)_3-$. Isso devido ao efeito do grupo amina da lisina. O mesmo ocorre argina e a alanina. Mesmo a arginina tendo três grupos metilenos $-(\text{CH}_2)_3-$ enquanto que a alanina possui só um, os Δg_t 's são da mesma magnitude. Isso pode ser explicado pelo grande grupo polar situado na cadeia lateral da arginina. Mesmo que essas medidas não tenham sido realizadas em outros solvente, podemos aproximar que $\Delta g_t = \Delta f_u$. Essa aproximação também pode ser feita para a treonina, que tem grupos metil na sua cadeia lateral.

Os aminoácidos com cadeias laterais contendo grupos polares e não polares, sendo que a parte não polar tem pequena extensão e os terminais são grupos polares ou carregados, mostram uma especificidade para as suas interações com o ambiente local quando comparados com os que possuem cadeias puramente não polares. Isso fica claro quando comparamos os ácidos glutâmico e aspártico (tabela 3), o Δg_t é praticamente o mesmo para os dois, mesmo tendo o ácido glutâmico dois grupos metilenos.

Assim, para os aminoácidos com cadeias laterais parcialmente polares não podemos assumir que $\Delta g_t = \Delta f_u$.

Tabela 3: Variação de energia livre (cal mol^{-1}) para a transferência de etanol para água à 25 °C.

	ΔG_t molécula inteira	Δg_t Contribuição da cadeia lateral	Cadeias laterais
Fenilalanina	-1980	+2650	$-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5$
Tirosina	- 930	+ 2870	$-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5-\text{OH}$
Lisina	-	+ 1500	$-(\text{CH}_2)_4-\text{N}^+\text{H}_3$
Norleucina	- 1930	+ 2700	$-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}_3$
Arginina	-	+ 730	$-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-\text{CNH}_2 \square \text{N}^+\text{H}_2$
Alanina	- 3900	+ 730	$-\text{CH}_3$
Metionina	- 3330	+ 1300	$-(\text{CH}_2)_2-\text{S}-\text{CH}_3$
Asparagina	- 4640	- 10	$-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}_2$
Glutamina	- 4730	- 100	$-(\text{CH}_2)_2-\text{CO}-\text{NH}_2$
Ácido aspártico*	- 4090	+ 540	$-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{OH}$
Ácido glutâmico*	- 4080	+ 550	$-(\text{CH}_2)_2-\text{CO}-\text{OH}$
Treonina	- 4190	+ 440	$-\text{HOCH}-\text{CH}_3$

Com o Δf_u calculado para cada cadeia lateral e de posse do termo $-T \Delta S_{\text{conf}}$ ($-1200 \text{ cal mol}^{-1}$), podemos calcular a principal parcela da contribuição das interações hidrofóbicas das partes não polares da molécula de proteína para o $\sum \Delta f_u$. A tabela 4 mostra os resultados dos cálculos para três proteínas: mioglobina, β - lactoglobulina e ribonuclease. Comparando os valores de $-T \Delta S_{\text{conf}}$ com os do $\sum \Delta f_u$, vemos que para a mioglobina e a β - lactoglobulina os valores são da mesma ordem de magnitude. Anteriormente, estimamos que o valor do termo $\sum \Delta f_u$ deveria ser positivo e superar o do termo $-T \Delta S_{\text{conf}}$. O resultado obtido não mostra uma compensação tão grande como o previsto e, no caso da ribonuclease, o valor de $\sum \Delta f_u$ ficou bem abaixo do previsto. O

modelo utilizado é idealizado e considera uma série de restrições para o cálculo.

Tabela 4: Contribuição da mais importante interação hidrofóbica para a energia livre de desenovelamento à 25 °C.

Cadeia lateral	Δfu por cadeia lateral (cal mol ⁻¹)	Número de aminoácidos presentes em		
		Mioglobina	β - Lactoglobulina	Ribonuclease
Triptofano	3000	2	2	0
Isoleucina	2970	9	10	3
Tirosina	2870	3	4	6
Fenilalanina	2650	6	4	3
Prolina	2600	4	8	4
Leucina	2420	18	22	2
Valina	1690	8	10	9
Lisina	1500	19	15	10
Metionina	1300	2	4	4
Alanina	730	17	14	11
Arginina	730	4	3	4
Treonina	440	5	8	10
Número total de resíduos		153	162	124
$-\ T \Delta S_{\text{conf}}$ (kcal mol ⁻¹)		- 184	- 194	- 149
$\sum \Delta fu$ (kcal mol ⁻¹)		+ 173	+ 192	+ 100

O valor do termo $- T \Delta S_{\text{conf}}$ de $- 1200$ cal mol⁻¹ representa um palpite inteligente e pode embutir um fator de erro de até duas vezes. O valor de $\sum \Delta fu$ está menos sujeito ao erro, mas ainda assim pode variar em até 10 % se igualarmos Δfu com os valores de Δg_t quando a transferência se dá do butanol para a água ao invés do etanol para a água. Ainda, cinco resíduos não foram

considerados no cálculo por não ter sido encontrado dados sobre eles (cisteína, cistina, histidina, e o glutamato e aspartato ionizados).

Como o modelo é idealizado, algumas considerações feitas podem afetar o resultado. Consideramos inicialmente que as partes não polares da molécula estariam livres das moléculas de água no interior da proteína, o que na realidade pode não ocorrer. É pouco provável, também, que a forma desenovelada esteja completamente desnaturada e que todas as partes da molécula estejam em contato com o solvente. O desenovelamento incompleto, além de alterar o termo $\sum \Delta f_u$, também modifica a entropia conformacional, pois o desenovelamento incompleto pode deixar a molécula menos flexível. Consideramos a molécula na forma nativa completamente inflexível, quando na verdade, ela tem um certo grau de flexibilidade. O termo $T \Delta S_{\text{conf}}$ seria menor se considerássemos esses desvios da flexibilidade da cadeia.

As estabilidades da mioglobina e da β -lactoglobulina em água podem ser explicadas, dentro das incertezas do cálculo, pelas interações hidrofóbicas das partes não polares da molécula. No caso da ribonuclease, a diferença entre o valor calculado e o previsto pode ser explicado pelo fato de que no cálculo não consideramos a influência das ligações de dissulfeto que estão presentes na ribonuclease.

REFERÊNCIAS

- [1] TANFORD, C. Journal of the American Chemical Society, v. 84, n. 22, p. 4240-4247, 1962.
- [2] TANFORD, C. The hydrophobic effect: formation of micelles and biological membranes. Ed. John Wiley & Sons, Inc. págs. 1-3, 120-125. New York, 1973.
- [3] KAUZMANN, W. The mechanism of enzyme action. Ed. McElroy and B. Glass. Baltimore, 1954, p. 40.
- [4] KLOTZ, I. M. Science, v. 128, p. 815, 1958.
- [5] Apud [1]