LEANDRO APARECIDO GRANGE DEZIDERIO

**Extração das isoformas da proteína precursora do amilóide em
plasma rico em plaquetas para testes proteômicos como
biomarcador da doença de Alzheimer**

**Dissertação apresentada ao Instituto
de Química de São Carlos, da
Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Mestre em
Ciências.**

Área de concentração: Química Analítica

Orientador: Prof. Dr. Júlio César Borges

São Carlos

2008

Dedicatória

À Deus por sempre iluminar meu caminho e estar sempre presente em todos os momentos.

Dedico esse trabalho à minha mãe Clair que desde o início sempre acreditou em mim e me apoiou em todas as minhas escolhas.

À Fernanda, minha amada, que sempre me inspirou com sua força, determinação e esteve sempre ao meu lado compartilhando das minhas alegrias, frustrações e conquistas.

Agradecimentos

Ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo pela oportunidade de estudar em um centro de excelência acadêmica.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

Ao Professor Dr. Júlio César Borges pela orientação, por ser sempre receptivo e estar sempre disposto a discutir os problemas que encontrei no decorrer deste trabalho.

Ao Professor Dr. Orestes Vicente Forlenza pelo apoio estrutural de seu laboratório e pelas discussões.

Ao Professor Dr. Otávio Henrique Thiemann por ter gentilmente permitido que eu utilizasse seu laboratório e equipamentos para o desenvolvimento do meu trabalho, sem sua colaboração esse trabalho não teria sido realizado.

Ao Professor Dr. Emanuel Carrilho por também ter participado nas etapas iniciais de desenvolvimento deste trabalho.

À Professora Dra Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo por ter permitido que eu realizasse alguns experimentos em seu laboratório.

À Msc Sheila Barreto Guterres por termos trabalhado juntos, por contribuir significativamente e por enfrentarmos os mesmos desafios.

À toda a equipe do LIM-27 do Instituto de Psiquiatria do Hospital das Clínicas que foram sempre prestativos e colaborativos.

Ao pessoal do Laboratório de Cristalografia do Instituto de Física de São Carlos que também foram bastante amigáveis.

Aos colegas do Croma e Biomics.

Aos Professores do Instituto de Química de São Carlos que contribuíram significativamente na minha formação.

À Professora Dra Eny Maria Vieira pelas orientações e ensinamentos de experiência de vida.

À Bernadete (biblioteca do IQSC) por ser sempre prestativa.

À todos que direta ou indiretamente estão relacionados à este trabalho e que por alguma eventualidade não foram citados, meus sincero agradecimento.

Resumo

Este trabalho de mestrado teve como objetivo o desenvolvimento de uma metodologia analítica focada no preparo de amostra protéica. O objeto de estudo foram os fragmentos solúveis das isoformas da proteína precursora do amilóide (APPs) presentes no plasma rico em plaquetas. As APPs têm sido amplamente estudadas em diversos grupos de pesquisa no Brasil e em outros no mundo como possíveis biomarcadores para a doença de Alzheimer. O preparo de amostra é a etapa fundamental que influencia significativamente nos resultados seguintes, especialmente quando se trata de amostras protéicas que exigem maiores cuidados.

Para a avaliação dos melhores preparos de amostra para as APPs, foi utilizado SDS-PAGE e eletrotransferências de proteínas por *Western Blotting*. A eficiência dos preparos foi avaliada baseando-se nos resultados de revelação com anticorpos específicos para APP e medidas de densitometria de bandas. Após a escolha do melhor preparo de amostra utilizando SDS-PAGE e *Western Blotting*, as isoformas da APP foram separadas por eletroforese bidimensional (2DE).

Durante a etapa de preparo de amostra, os resultados inesperados de massa molecular, o que indicou possível biodegradação das APPs. A identificação da fonte de interferência foi realizada estudando as variáveis dos preparos de amostra. Com isso foi possível determinar a fonte de interferência, mas uma avaliação mais detalhada das isoformas (como utilização de espectrometria de massas) não foi possível.

Abstract

The goal of this Master's work was to develop an analytical methodology focused on protein sample preparation. The analyte studied were soluble amyloid precursor protein isoforms (APPs) which has been studied in many groups in Brazil and around the world as a possible biomarker for Alzheimer's disease. Sample preparation is a crucial step that influence significantly on next results, especially about biological samples which require more attention.

For the best sample preparation for APPs, was used SDS-PAGE and protein electrotransference by *Western Blotting* techniques. The efficiency of the sample preparations was evaluated based on specific antibody reactions and densitometry measures of these interactions. After that, the APP isoforms were analyzed by two dimensional electrophoresis (2DE).

During the sample preparation, were obtained unexpected molecular mass results, which indicated some APPs biodegradation. For the determination of the interference source, the variants steps of the sample preparation were analyzed. The sample preparation interference source was identified, but a more detailed study of the isoforms (by mass spectrometry) was not possible as well as the analysis of the identity of the possible fragmented isoforms.

Lista de figuras

- Figura 1.** Comparação entre cérebros de indivíduos portadores de DA e cérebros normais, mostrando a atrofia, aumento dos ventrículos, alargamento dos sulcos e erosão dos giros..... 20
- Figura 2.** Representação das isoformas da APP e o local de atuação da α , β e γ -secretases. Também é possível verificar na Figura 2 a parte N-terminal, que se encontra no meio extracelular, e a C-terminal na porção intracelular..... 22
- Figura 3.** Representação das etapas proteolíticas da APP. Na via não-amiloidogênica, a APP pode ser clivada pela α -secretase liberando um polipeptídeo N-terminal de 650 resíduos de aminoácidos (α -APPs) e um C-terminal de 120-124 resíduos de aminoácidos. O fragmento C-terminal pode ser clivado pela γ -secretase formando dois peptídeos menores não amiloidogênicos. Na via amiloidogênica, a APP é clivada pela β -secretase liberando um polipeptídeo N-terminal de 640 resíduos de aminoácidos (β -APPs) e outro que permanece ligado à membrana de 99 resíduos de aminoácidos. O peptídeo C-terminal, por sua vez, é clivado pela γ -secretase formando o peptídeo A β , que é amiloidogênico..... 24
- Figura 4.** Representação esquemática procedimento experimental da 2DE. Depois do preparo adequado da amostra, esta é reidratada com a fita de IPG e em seguida submetida a uma focalização isoeletrica. Depois da primeira separação, a fita é submetida à separação por SDS-PAGE..... 32
- Figura 5.** Gráfico ilustrando a variação de carga do analito durante a focalização isoeletrica..... 33

Figura 6. Representação de uma estrutura de um gel de poliacrilamida.	34
Figura 7. Posição da membrana de transferência, do gel e dos papéis de filtro (lado esquerdo). No lado direito está ilustrados as etapas de marcação com os anticorpos primário e secundário e a última etapa da revelação.....	35
Figura 8. Agregação de proteínas em meio aquoso-solvente orgânico...	40
Figura 9. Variação da carga das proteínas de acordo com a variação do pH.....	42
Figura 10. Sistema SDS-PAGE utilizado durante os preparos de amostra.....	44
Figura 11. Equipamentos de primeira e segunda dimensão da técnica 2DE.....	45
Figura 12. Análises iniciais de 2DE (10 % acrilamida) utilizando uma fita com uma faixa de pI 3-10 linear. A) Precipitação com acetato de amônio. B) Precipitação com TFA 10 %. C) Precipitação com TCA 10 %. D) Precipitação com acetona 90 %. E) Precipitação com clorofórmio/metanol (70:30, v:v). F) Concentrador centricon com corte de massa de 50 kDa. G) Concentrador amicon com corte de massa de 30 kDa.....	60
Figura 13. Géis 2DE (10 % acrilamida) utilizando reagente Destreak no lugar de DTT. A) Precipitação com clorofórmio/metanol (70:30, v:v). B) Precipitação com acetona 90 %.....	63

Figura 14. Gel SDS-PAGE (10 % acrilamida) com diferentes preparos de amostra utilizando solução de reidratação de 2DE. 1) Padrão de massa molecular (97, 66, 45, 30, 20 e 14 kDa). 2) Amostra bruta, sem nenhum tipo de precipitação, só adicionado tampão de amostra de SDS-PAGE. 3) Precipitação com acetona 90 %. 4) Precipitação com clorofórmio/metanol (70:30, v/v). 5) Precipitação com TFA 10 %. 6) Precipitação com TCA 10 %. 7) Precipitação com acetato de amônio. 8) Concentrador centricon com corte de MM de 10 kDa. 9) Concentrador amicon com corte de MM de 10 kDa. 10) Concentrador microcon com corte de MM de 10 kDa..... 66

Figura 15. Gel 1D (10 % acrilamida) com os diferentes preparos de amostra. 1) Padrão. 2) Amostra bruta sem sonicar e sem centrifugar. 3) Amostra bruta sonicada e centrifugada. 4) Precipitação com acetona 90%. 5) Precipitação com clorofórmio/metanol (70:30, v/v). 6) Concentrador centricon (corte de MM 10 kDa). 7) Concentrador amicon (corte de MM de 10 kDa). 8) Concentrador microcon (corte de MM de 10 kDa). 9) Precipitação com TCA 10 %. 10) Precipitação com TFA 10 %..... 68

Figura 16. Membrana de nitrocelulose revelada com os diferentes preparos de amostra (ver legenda da Figura 15)..... 69

Figura 17. Amostra precipitada com acetona em duplicata (1 e 2) e submetida à eletrotransferência e revelada com anticorpos específicos..... 70

Figura 18. Gel 8 % acrilamida corado com coomassie (A e B) e a membrana revelada com os anticorpos específicos para APP após eletrotransferência (C). A amostra PRP foi desnaturada em tampão de amostra de SDS-PAGE e fervida por 5 min..... 72

Figura 19. Gel de SDS-PAGE (10 % acrilamida) mostrando o efeito do aquecimento sobre a APP. As canaletas 2 e 4 correspondem às amostras fervidas; as canaletas 3 e 5 correspondem às amostras NÃO fervidas. A figura B é o mesmo gel da figura A, mas destacando algumas bandas. A figura C representa a membrana de nitrocelulose mostrando o resultado da eletrotransferência. 1) Padrão de MM (45, 66, 97 e 116 kDa). 2) Amostra do indivíduo sadio fervida por 5 min com tampão de amostra contendo β -mercaptoetanol. 3) Amostra do indivíduo sadio NÃO fervida, apenas adicionado tampão de amostra contendo β -mercaptoetanol. 4) Amostra do paciente 2 fervida por 5 min com tampão de amostra contendo β -mercaptoetanol. 5) Amostra do paciente 2 NÃO fervida, apenas adicionado tampão de amostra contendo β -mercaptoetanol..... 74

Figura 20. Gel de poliacrilamida 10 % com amostra fervida e não fervida (A) e a eletrotransferência (B). 1) Padrão de massa molecular (45, 66, 97, 116 kDa). 2) Amostra de paciente fervida por 5 min após adição de tampão de amostra com β -mercaptoetanol. 3) Amostra de paciente não fervida após adição de tampão de amostra com β -mercaptoetanol. 4) Amostra do indivíduo sadio fervida por 5 min após adição de tampão de amostra com β -mercaptoetanol. 5) Amostra do indivíduo sadio não fervida após adição de tampão de amostra com β -mercaptoetanol..... 76

Figura 21. Gel SDS-PAGE (10 % acrilamida) com vários preparos de amostra, sem a etapa de fervura. 1) Padrão de MM. 2) Amostra bruta (plasma rico em plaquetas). 3) Amostra precipitada com acetona 90 %. 4) Amostra precipitada com uma solução clorofórmio/metanol (70:30, v/v). 5) Amostra precipitada com TFA 10%. 6) Amostra precipitada com TCA 10%. 7) Amostra concentrada com concentrador do tipo microcon (corte de MM de 10 kDa). 8) Amostra concentrada com concentrador do tipo amicon (corte de MM de 10 kDa). 9) Amostra concentrada com concentrador do tipo centricon (corte de MM de 10 kDa)..... 79

Figura 22. Géis 2DE (10 % acrilamida) de amostra diferentes. Amostras não lisadas: A) Amostra bruta, B) Amostra precipitadas com acetona, C) Amostra precipitada com clorofórmio/metanol. Amostras lisadas com ultra-som: D) Amostra precipitada com acetona, E) Amostra precipitada com clorofórmio/metanol..... 83

Lista de tabelas

Tabela 1. Propriedades físico-químicas das principais isoformas da APP obtidas pelo programa Protparam Tool.....	22
Tabela 2. Seqüência de voltagem utilizada na focalização isoeletrica.....	54
Tabela 3. Etapas utilizadas para fixar, corar e descorar o gel 2DE.....	56
Tabela 4. Valores de densitometria obtidos da membrana com vários preparos de amostra.....	80
Tabela 5. Valores de absorbância obtidos e os valores das concentrações calculadas de proteína total.....	82

Lista de abreviaturas

β -APPs – Fragmento β da proteína precursora do amilóide solúvel
 α -APPs – Fragmento α da proteína precursora do amilóide solúvel
2DE – Eletroforese bidimensional
 $A\beta$ - Beta amilóide
Apo E – Apolipoproteína do tipo E
APP – Proteína precursora do amilóide
APPs – Proteína precursora do amilóide solúvel
APS – Persulfato de amônio
CHAPS – 3-[(3-colamidopril)dimetilamônio]-1-propanosulfonato
DA – Doença de Alzheimer
DIGE – Difference Gel Electrophoresis
DTE – Ditioeritritol
DTT – Ditiotretitol
IAA – Iodoacetamida
MALDI-TOF – Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight
MM – Massa molecular
MS – Espectrometria de massas
OMS – Organização Mundial de Saúde
pI – Ponto isoelétrico
PMF – Peptide mass fingerprint
PMSF – Fluoreto de fenilmetilsulfonila (inibidor de serino protease)
PRP – Plasma rico em plaquetas
SDS – Dodecilsulfato de sódio
TCA – Ácido tricloroacético
TEMED – N,N,N',N'-tetrametilenodiamina
TFA – Ácido trifluoracético

Sumário

Dedicatória

Agradecimentos

Resumo

Abstract

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de abreviaturas

1 - Introdução.....	17
1.1 - Quadro geral da doença de Alzheimer (DA).....	17
1.2 - Alterações fisiológicas da DA.....	19
1.3 - Proteína precursora do amilóide e seu metabolismo.....	21
1.4 - Proteômica.....	25
1.5 - Biomarcadores.....	27
1.6 - Técnicas bioanalíticas.....	30
1.6.1 - Técnica de SDS-PAGE.....	30
1.6.2 - Técnica de eletroforese bidimensional (2DE).....	31
1.6.3 - Técnica de western blotting.....	34
1.7 - Preparo de amostra.....	35
1.8 - Métodos de enriquecimento de proteínas.....	39

1.8.1 - Precipitação.....	39
1.8.2 - Centrifugação.....	42
2 - Objetivos	43
3 - Procedimentos experimentais.....	44
3.1 - Instrumentação analítica.....	44
3.1.1 - SDS-PAGE.....	44
3.1.2 - Eletroforese bidimensional (2DE).....	44
3.1.3 - Western blotting.....	45
3.3 - Coleta e preparo do plasma rico em plaquetas (PRP).....	45
3.4 - Preparo de amostra.....	46
3.4.1 - Precipitações com solventes orgânicos.....	47
3.4.2 - Precipitações com ácidos.....	48
3.4.3 - Precipitação com sais.....	50
3.4.4 - Concentradores.....	51
3.4.5 - Preparo de amostra para análise por SDS-PAGE.....	51
3.5 - Metodologia de separação.....	53
3.5.1 - Focalização isoeletrica (primeira dimensão).....	53
3.5.2 - SDS-PAGE (segunda dimensão).....	54
3.5.3 - Western blotting dos géis 2DE.....	56
4 - Resultados e discussões.....	58

4.1 – Teste inicial 2DE para avaliar a viabilidade dos preparos de amostra.....	58
4.2 – Substituição de DTT por reagente comercial <i>Destreak</i>	62
4.3 – Avaliação das soluções de preparo de amostra de 2DE e SDS-PAGE.....	64
4.4 – Avaliação de preparos de amostra por SDS-PAGE e <i>Western Blotting</i>	67
4.5 – Estudo da influência da temperatura nos preparos de amostra.....	72
4.6 – Amostra de PRP preparada e de outro voluntário utilizando metodologia diferente de preparo de amostra.....	75
4.7 – Preparo de amostras PRP sem a etapa de fervura.....	78
5 - Conclusões.....	85
6 - Referências bibliográficas.....	89
Apêndice 1 - Procedimento para preparo das soluções utilizadas em 2DE.....	99
Apêndice 2 - Procedimento utilizado em 2DE.....	105
Apêndice 3 - Preparo de PRP para medida de atividade de PLA2.....	110

1 – Introdução

1.1 – Quadro geral da doença de Alzheimer (DA)

Segundo dados da Organização das Nações Unidas, três quartos da população idosa viverá em nações pobres até 2025. O aumento da prevalência de doenças associadas ao envelhecimento, como as demências, é uma decorrência natural da maior expectativa de vida (ALMEIDA, 1997). A doença de Alzheimer (DA) é a forma mais comum de demência (CLARK, 1993) e corresponde a mais de 50% dos casos de transtornos demenciais. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que, atualmente, 18 milhões de pessoas no mundo estão com a doença e a previsão para 2025 é de 34 milhões de pessoas. Embora existam estudos epidemiológicos em comunidades específicas, não existem dados oficiais, para o Brasil, sobre o número de portadores, de mortes, nem estimativas de gastos com os pacientes acometidos pela doença. Segundo a Associação Brasileira de Alzheimer (ABRAz), estima-se que 1.200.000 pessoas sofrem do transtorno e parte recebe tratamento gratuito do governo nos estágios iniciais e intermediários da doença.

A DA é uma afecção neurodegenerativa progressiva e irreversível, de aparecimento insidioso que acarreta em perda de memória, diversos distúrbios cognitivos (FELICE, 2002; PADOVANI, 2002; SMITH, 1999), atrofia cortical difusa, desequilíbrios na transmissão da acetilcolina e acetiltransferases (SMITH, 1999).

A probabilidade de surgimento da doença aumenta significativamente com a idade atingindo todas as classes econômicas sem distinção de etnia ou sexo. No entanto, Stern et al. (1994) verificou que pessoas com maiores níveis de escolaridade apresentam menor incidência de desenvolvimento da doença, mas determinar a influência de fatores externos ainda é um grande obstáculo.

O início da doença pode ocorrer precocemente, antes dos 65 anos (chamada de pré-senil), ou ter início tardio, depois dos 65 anos (senil), sendo este o caso mais comum das ocorrências de DA (RAFFAI; WEISGRABER, 2003). A forma pré-senil da DA pode ocorrer de forma esporádica, decorrente da presença de uma cópia extra do cromossomo 21 (síndrome de Down), ou pode ocorrer devido a mutações no gene da proteína precursora do amilóide (APP) no cromossomo 21, gene presenilina-1 (cromossomo 14) e gene presenilina-2 (cromossomo 1) (NEVE et al., 2000). Já no caso senil da doença, a presença do alelo $\epsilon 4$ da apolipoproteína E (Apo E), que é uma proteína transportadora de colesterol, é um dos principais componentes de risco, mas, apesar disso, a presença do alelo $\epsilon 4$ da Apo E não é condição suficiente para o desenvolvimento da doença, embora o desenvolvimento da DA ainda não ser completamente conhecido (LOVEMAN et al., 2006).

O diagnóstico da DA apresenta-se de forma bastante desafiador já que seu aparecimento insidioso pode ser facilmente confundido com processos de envelhecimento natural, depressões, estresse, e passar despercebido por familiares e médicos. Atualmente, o diagnóstico da DA é baseado em testes tais como o Manual de Diagnóstico e Estatística de Transtornos Mentais (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 1994) e o Mini Exame do Estado Mental (MEEM) que avalia a orientação espacial e temporal, memória de fixação, atenção e cálculo, linguagem e habilidades construtivas (FOLSTEIN et al., 1975). Além desses testes, outros complementares também são utilizados, como a fluência verbal e testes de memória, exames de sangue, neuroimagens e, até mesmo, exames no líquido e eletroencefalograma (CARAMELLI; NITRINI, 1997).

As formas de tratamento da DA são considerados bem sucedidos se forem capazes de estabilizar ou retardar a progressão dos sintomas da doença.

Atualmente, nenhum tratamento curativo está disponível. O diagnóstico clínico da DA é mais simples quando a doença já está estabelecida, mas em estágios iniciais o diagnóstico pode ser complicado e algumas terapias que seriam benéficas nesses estágios podem não ser em estágios mais avançados. Portanto, existe uma grande necessidade de explorar técnicas capazes de detectar a doença precocemente, não apenas para auxiliar o diagnóstico, mas também para monitorar a efetividade dos tratamentos disponíveis. Para auxiliar o diagnóstico da DA em estágios iniciais, uma ferramenta de diagnóstico deve ser sensível para detectar alterações cognitivas e biológicas (este sendo resultado de processos celulares como o metabolismo de proteínas) e deve ser capaz de diferenciar a DA do envelhecimento normal, de desordens afetivas, de pseudo-demências, bem como de outras demências como a demência vascular, demência com corpúsculos de Lewy, entre outras. Essa ferramenta deve ser confiável, simples, de baixo custo e facilmente aplicável (Di LUCA et al., 2005).

1.2 – Alterações fisiológicas da DA

Estudos em tecido cerebral *post mortem* de pacientes com DA mostram que as principais regiões afetadas do cérebro são o córtex e hipocampo. Entre as principais características de um paciente com DA está o acúmulo de placas senis (composta pelo peptídeo β -amilóide), os emaranhados de neurofibrilas (agregados da proteína *tau*, que é uma proteína do citoesqueleto celular), perda de neurônios piramidais e degeneração sináptica no hipocampo e neocórtex (FRANCIS et al., 1999; RACCHI e GOVONI, 2003; CARAMELLI, 2000).

Nos estágios finais da DA, o cérebro apresenta atrofia do hipocampo e córtex, aumento dos ventrículos, alargamento dos sulcos e erosão dos giros (WALSH e

SELKOE, 2004; MOHS, HAROUTUNIAM, 2002; CARAMELLI, 2000). A Figura 1 mostra o corte de um cérebro de paciente com DA e um sem DA.

Figura 1. Comparação entre cérebros de indivíduos portadores de DA e cérebros normais, mostrando a atrofia, aumento dos ventrículos, alargamento dos sulcos e erosão dos giros (ZAINAGHI, 2007).

O acúmulo do peptídeo β -amilóide ($A\beta$) nas placas senis, é a principal característica fisiopatológica da DA. O $A\beta$ apresenta caráter hidrofóbico, possui 39-43 resíduos de aminoácidos e é formado a partir da proteólise da proteína precursora do amilóide (APP) (ZAINAGHI, 2007). O $A\beta$ se agrega formando oligômeros e se acumula no parênquima cerebral, dando origem às placas senis (HAASS, 2004). Supõe-se que essas placas senis podem levar à indução de disfunções sinápticas e dendríticas, além de ativar microglias e astrócitos, provocando uma resposta inflamatória local. Estas alterações evoluem e, ao mesmo tempo, ocorrem alterações celulares e bioquímicas, como a formação de radicais livres, reações oxidativas, prejuízo na homeostase iônica e, por último, morte neuronal (SELKOE, 2005).

1.3 – Proteína precursora do amilóide e seu metabolismo

Como já citado, a deposição do polipeptídeo A β é uma das principais características relacionadas à neurodegeneração na DA, formando as placas senis (COLCIAGHI et al., 2004; ROSENBERG et al., 1997). O A β é produto do processo de endoproteólise da APP (PALMERT et al., 1989; BUSH, TANZI, 1998). A APP é uma glicoproteína ácida transmembrana com uma única passagem pela membrana (ZAINAGHI et al., 2007), uma grande porção N-terminal extracelular e uma pequena porção C-terminal intracelular (DALY et al., 1998). A APP possui 10 isoformas oriundas de expressão diferencial (<http://br.expasy.org/uniprot/P05067>) oriundas de um único mRNA, produto do gene APP (PALMERT et al., 1989). Três principais isoformas (APP₆₉₅, APP₇₅₁ e APP₇₇₀) são encontradas em diferentes tecidos. A isoforma APP₆₉₅ é a forma predominante em tecido neuronal e as isoformas APP₇₅₁ e APP₇₇₀ são predominantes em células não-neuronais. A isoforma APP₇₅₁ é a mais abundante em linfócitos T.

As isoformas de APP podem ser clivadas em três diferentes pontos (pelas α , β e γ -secretase) (SELKOE, 2002) e, conseqüentemente, liberar as possíveis formas clivadas da APP (as formas solúveis APPs) para o plasma. A Figura 2 representa um esquema das três principais isoformas da APP, assim como os sítios de atuação das secretases.

Figura 2. Representação das isoformas da APP e o local de atuação da α , β e γ -secretases (ZAINAGHI, 2007). Também é possível verificar na Figura 2 a parte N-terminal, que se encontra no meio extracelular, e a C-terminal na porção intracelular.

As propriedades físico-químicas das proteínas precursoras das 3 principais isoformas e dos seus produtos de clivagem pela α -secretase são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Propriedades físico-químicas das principais isoformas da APP obtidas pelo programa Protparam Tool (<http://bo.expasy.org/tools/protparam.html>).

Isoformas	Propriedade			
	Swiss-Prot Acc. number	Nº de aminoácidos	MM(kDa)*	Ponto isoelétrico
APP ₇₇₀	P05067	770	86,943	4,73
APP ₇₅₁	P05067-8	751	84,818	4,71
APP ₆₉₅	P05067-4	695	78,662	4,73
Fragmentos da APP				
α -APP ₇₇₀	-	650	73,541	4,62
α -APP ₇₅₁	-	631	71,417	4,59
α -APP ₆₉₅	-	575	65,260	4,61
β -APP ₇₇₀	-	634	71,850	4,64
β -APP ₇₅₁	-	615	69,725	4,61
β -APP ₆₉₅	-	559	63,569	4,63

* MM deduzida pela sequência de aminoácidos sem considerar a glicosilação.

A APP é uma das proteínas mais abundantes no sistema nervoso central e também é expressa em tecidos periféricos como células epiteliais e sanguíneas (Di LUCA et al., 2000; RACCHI, GIOVONI, 2003). Entre as diferentes células periféricas que expressam a APP, as plaquetas representam uma importante fonte, pois expressam mais de 95% da APP circulante no corpo humano (ZAINAGHI, 2007). As plaquetas também apresentam concentrações das isoformas da APP equivalentes às encontradas no tecido cerebral, com exceção da isoforma 695 que é abundante no cérebro e praticamente indetectável em plaquetas. Em plaquetas a isoforma mais abundante é a isoforma 770 (PADOVANI et al., 2001).

O processamento proteolítico da APP pode ocorrer de duas maneiras: via não-amiloidogênica e via amiloidogênica (Figura 3). Na via não-amiloidogênica, a clivagem da APP ocorre dentro do domínio do polipeptídeo A β (entre os resíduos Lys 16 e Leu 17) devido à ação da α -secretase. Após a ação da α -secretase, ocorre a liberação para a circulação da fração N-terminal solúvel da APP, chamada de α -APPs. Buxbaum et al. (1998) e Lammich et al. (1998) mostraram em estudos que duas enzimas pertencentes à família ADAM (desintegrinas e metaloproteases) apresentam atividade de α -secretase: TACE ou ADAM 17 (enzima conversora do fator de necrose tumoral alfa) e a enzima ADAM 10.

A outra via proteolítica da APP, a via amiloidogênica, ocorre devido à ação da β -secretase (Asp 1 e Glu 11). Neste caso, também ocorre liberação de um fragmento maior da APPs para a circulação, mas chamada de β -APPs. Em seguida, o fragmento carboxiterminal (99 aminoácidos) que permanece ligado à membrana é clivado devido à ação da γ -secretase dentro da região hidrofóbica da bicamada lipídica (HAASS, 2004; CAPELL et al., 2005), dessa forma, liberando o polipeptídeo A β (ANDREASEN, BLENNOW, 2002; Di LUCA et al., 2000).

A β -secretase (BACE-1) é uma proteína transmembrana do tipo 1 com atividade de protease do tipo aspartil (HAASS, 2004) e pertence à família de pepsino proteases. Já a γ -secretase é uma aspartil protease formada por quatro componentes: PS-1 e PS-2 (presenilina-1 e presenilina-2), Nct (nicastrina), APh-1 (anterior pharynx-defective phenotype) e PEN-2 (presenilina enhancer-2).

Figura 3. Representação das etapas proteolíticas da APP. Na via não-amiloidogênica, a APP pode ser clivada pela α -secretase liberando um polipeptídeo N-terminal de 650 resíduos de aminoácidos (α -APPs) e um C-terminal de 120-124 resíduos de aminoácidos. O fragmento C-terminal pode ser clivado pela γ -secretase formando dois peptídeos menores não amiloidogênicos. Na via amiloidogênica, a APP é clivada pela β -secretase liberando um polipeptídeo N-terminal de 640 resíduos de aminoácidos (β -APPs) e outro que permanece ligado à membrana de 99 resíduos de aminoácidos. O peptídeo C-terminal, por sua vez, é clivado pela γ -secretase formando o peptídeo $A\beta$, que é amiloidogênico.

Li et al. (1998) propôs que as plaquetas possuem capacidade de produzir os subprodutos de clivagem da APP a partir da ação das secretases e que tanto os fragmentos solúveis da APP (APPs) quanto os fragmentos insolúveis ($A\beta$) podem ser estocados em grânulos e liberados devido à ativação das plaquetas. Entre os vários estímulos que podem liberar os fragmentos solúveis da APP, pode-se citar os

fatores de crescimento, neurotransmissores, citocinas e proteína quinase ativa. Apesar de ainda haver muitos questionamentos sobre as funções da APPs, já foram atribuídas funções como a adesão celular, propagação de neuritos e potenciação de longa duração (KOO, 2002). A APPs também apresenta o domínio KPI (Kunitz Protease Inhibitor) que é altamente homólogo à protease Nextin II e inibi a atividade de coagulação sanguínea dos fatores IXa, Xa e XIa. Cattabeni (2004) verificou que a APPs inibe o fator XII da cascata de coagulação, além de prolongar o tempo de tromboplastina.

Das possíveis isoformas encontradas em plaquetas, a quantidade de APP intacta (MM aparente de 140 e 150 kDa) é baixa, mas a quantidade dos fragmentos na forma solúvel (APPs), com MM aparente entre 120 e 130 kDa (armazenadas em grânulos) é alta e correspondem às isoformas 770 e 751 (Di LUCA et al., 1998; BUSH, TANZI, 1998), respectivamente. A diferença entre as MM apresentadas na Tabela 1 e as MM da proteína intacta (140 e 150 kDa) pode ser explicada pelas modificações pós-traducionais que a proteína sofre no decorrer de seu ciclo de vida. Entre as possíveis modificações pode-se citar a glicosilação e fosforilação, entre outras. Além disso, a carga das proteínas pode interferir na sua migração durante a 2DE e SDS-PAGE o que faz com que ela migre menos nos géis e, com isso, pode-se ocorrer uma atribuição errada de MM, ou seja, uma proteína pode ter MM menor, mas devido às suas cargas ela pode ter migrado menos, aparentando MM maior.

1.4 – Proteômica

Proteoma é definido como o conjunto de proteínas codificadas por um determinado organismo em um determinado momento e sob determinadas condições. Já a análise proteômica é definida como o conjunto de técnicas ou

metodologias analíticas aplicadas para analisar quali e quantitativamente um proteoma. Sua grande interdisciplinaridade faz com que essa área de estudo envolva distintos setores do conhecimento como a informática, biologia, química, física, matemática, medicina, entre outras. Com sua ampla interdisciplinaridade, a análise proteômica pode ser aplicada em diversos estudos, como na determinação da função de genes, baseando-se na identificação de proteínas codificadas e expressas por eles; aplicada na caracterização de isoformas de proteínas, análise de produtos de modificações pós-traducionais, interações entre proteínas, além de determinar o conjunto de proteínas em uma amostra e seus níveis de expressão (TYERS, MANN, 2003; AEBERSOLD, MANN, 2003; ONG, MANN, 2005).

Outro ponto importante é a possibilidade da abordagem proteômica aplicada à medicina, ou proteômica clínica. Esta abordagem pode levar ao desenvolvimento de novas metodologias de diagnósticos; novas classificações de doenças e novos tratamentos; podem ser obtidas informações a respeito da organização e dinâmica do metabolismo, regulação e sinalização celular, além de evidências de como estes mecanismos tornam-se não funcionais nas doenças. A abordagem proteômica aplicada ao estudo de diferentes tipos de doenças tem levado à identificação de vários biomarcadores específicos, de importante utilização no diagnóstico de doenças pela detecção de alterações em fluidos biológicos (como o plasma sanguíneo, por exemplo).

Na DA, diversas alterações bioquímicas estão envolvidas e são decorrentes de processos celulares tais como o metabolismo da APP, estresse oxidativo, fosforilação da proteína *tau*, inflamação e desregulação lipídica. Assim, a busca por possíveis biomarcadores (aplicando estudos proteômicos), que não existem atualmente, tem sido o objetivo de diversos grupos de pesquisa ao redor do mundo.

O líquido tem sido utilizado para a busca de biomarcadores, já que este reflete com bastante precisão a composição dos fluidos extracelulares cerebrais. Hampel et al. (2004) verificou que pacientes com DA leve mostraram níveis elevados da proteína *tau* e níveis reduzidos do polipeptídeo $A\beta$ em líquido, quando comparado com controles. Estes estudos vêm se mostrando bastante promissores, no entanto, a obtenção de líquido requer punção lombar, que é um procedimento bastante invasivo e delicado. Dessa forma, a busca por biomarcadores em sangue tem sido extensamente estudada por diversos grupos por ser uma técnica de baixo custo, menos invasiva e rápida (IRIZARRY, 2004).

1.5 - Biomarcadores

Os biomarcadores são definidos como sendo decorrentes de processos biológicos e podem ser utilizados como indicativos destes processos, tais como processos patogênicos, monitoramento de respostas farmacológicas, entre outras. Com o estudo de biomarcadores busca-se uma resposta precoce ou, ao menos, um indicativo do estágio de tais processos. Além disso, espera-se através dos biomarcadores obter informações tais como: 1) se um determinado processo patogênico já iniciou; 2) qual é o seu estágio; 3) se o sistema biológico está respondendo de forma efetiva aos tratamentos realizados. Assim, os biomarcadores são extremamente úteis não só para a detecção precoce, mas também para o monitoramento da doença e da eficiência dos tratamentos (ATKINSON et al., 2001).

Os estudos para a busca de biomarcadores comumente envolvem a comparação entre amostras de indivíduos saudáveis e doentes. Assim, pode-se buscar por compostos ou produtos protéicos diferentemente expressos ou que podem

possuir modificações estruturais e que podem ser um indicativo do problema em estudo (HANCOCK, 2003).

Nos últimos anos, os subprodutos do metabolismo da APP em plaquetas têm sido considerados como possíveis biomarcadores da DA. Estudos recentes realizados no Brasil (ZAINAGHI et al., 2007) e em outros centros (Di LUCA et al., 1998; TANGE et al., 2006) mostraram que a razão entre as concentrações de fragmentos de APP de 120-130 kDa e os fragmentos de 110 kDa está diminuída em plaquetas de indivíduos portadores da DA, em relação aos controles. No entanto, para o desenvolvimento de uma metodologia bioanalítica voltada para o diagnóstico precoce da DA, ou seja, o monitoramento das isoformas da APP, é necessário a utilização de técnicas robustas para diferenciar e detectar alterações biológicas. Ademais, esta metodologia deve ser capaz de diferenciar a DA do envelhecimento normal, de desordens afetivas, de pseudo-demências, bem como de outras demências, além de simples e facilmente aplicável (Di LUCA et al., 2005).

Para tal propósito, a eletroforese bidimensional (2DE) possibilita o estudo completo do proteoma de células, organismos e tecidos (WITTMANN-LIEBOLD, 2006), assim como, na busca de biomarcadores específicos devido à sua alta resolução. A 2DE permite a separação de proteínas de mesma MM e cargas diferentes e *vice-versa*. A 2DE também apresenta resolução suficiente para estudos proteômicos diferenciais, o que não ocorre com eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), que apresenta baixa resolução e apenas um quadro geral das proteínas expressas ou presentes num determinado organismo de estudo. Em determinados estudos com 2DE, o modo de detecção é sensível o bastante para detectar apenas 3 µg de proteína total aplicado no gel, como é o caso da detecção por fluorescência (*Fluorescence Difference Gel*

Electrophoresis – DIGE) e que, além da detecção de baixas concentrações, possibilita a separação de proteínas de três fontes diferentes em um mesmo gel 2DE (controle, paciente 1 e paciente 2, por exemplo) (HELLING et al., 2006).

A eletroforese bidimensional permite a análise de mais de 10.000 proteínas em combinação com uma técnica de alta sensibilidade como a espectrometria de massas (MS) (LIEBOLD et al., 2006; DOMON, AEBERSOLD, 2006; BECKER et al., 2006) e grande precisão na determinação de massas de peptídeos (erro de 0,1 a 0,2 Da), no caso de um espectrômetro do tipo MALDI-TOF (*matrix assisted laser desorption ionization-time of flight*), por exemplo. A atuação da bioinformática também é bastante significativa. Os espectros de massas obtidos e não interpretados são correlacionados com seqüências de aminoácidos de proteínas depositadas em banco de dados (CHAMRAD et al., 2004; ELIAS et al., 2005). Essa correlação é feita por ferramentas de busca como o Mascot (ENG et al., 1994) e o Sequest (PERKINGS et al., 1999) que basicamente tentam encontrar a seqüência de aminoácidos em um banco de dados que apresente grande correspondência aos dados de fragmentação obtidos na parte experimental de MS. Essas ferramentas de busca utilizam os dados de MM do peptídeo (*peptide mass fingerprint* - PMF) e o espectro de fragmentação (MS/MS).

Além da 2DE, o SDS-PAGE também é bastante utilizado em estudos proteômicos, mas com certas limitações devido à baixa resolução (HELLING et al., 2006). O SDS-PAGE aplica-se perfeitamente durante as etapas prévias de escolha do melhor preparo de amostra (precipitações, concentradores, etc), no monitoramento de bandas durante as etapas de purificação.

1.6 – Técnicas bioanalíticas

1.6.1 – Técnica de SDS-PAGE

A técnica de SDS-PAGE consiste em separações por tamanho, que é controlada pela malha ou porosidade de um gel. No caso de proteínas, a separação é realizada em um gel de poliacrilamida formado pela copolimerização de monômeros de acrilamida e bis-acrilamida. O SDS é um detergente que tem a função de desnaturar as proteínas evitando interferências nas separações devido às formas das proteínas. As proteínas desnaturadas por tensoativos são submetidas a um campo elétrico e migram através de um gel que possui certa porosidade que é determinada pela quantidade de acrilamida e o grau de intercruzamento, devido à ação da bis-acrilamida. As proteínas que possuem maiores MM serão mais retidas, ou seja, demoraram mais tempo para atravessar o gel, enquanto que as de menores MM migrarão mais rápido. A taxa de migração depende de fatores como a carga da proteína, tamanho e forma (HOEHN et al., 2005). O SDS interage com as proteínas, resultando em um complexo proteína-SDS com carga líquida altamente negativa (aproximadamente 1,4 g de SDS para cada grama de proteína). Dessa forma, apenas a carga negativa proveniente do SDS influencia de forma significativa para a migração das proteínas, ou seja, a carga da proteína influencia muito pouco já que o SDS está presente em todo o sistema (LEFKOVITS, 2003). O SDS-PAGE também é utilizado como a segunda dimensão do 2DE (descrito no item 1.6.2).

A utilização do SDS-PAGE em estudos proteômicos torna-se relevante durante a etapa de preparo de amostra, por ser rápido e por utilizar pouco reagente (quando comparado com a 2DE). Assim, o monitoramento das etapas de concentração e purificação da proteína alvo, quando essa existir, torna-se bastante conveniente e prática com a técnica de SDS-PAGE. Tipicamente, um gel 2DE leva

de quatro a cinco dias (desde o preparo de amostra até a aquisição da imagem do gel de 2DE corado com azul de coomassie). Para um gel SDS-PAGE, a análise pode ser realizada em um dia (desde preparo da amostra e a aquisição da imagem do gel corado com azul de coomassie).

1.6.2 – Técnica de eletroforese bidimensional (2DE)

A 2DE, desenvolvida por O'Farrell em 1975, é uma eficiente ferramenta bioanalítica de separação e muito utilizada em estudos de matrizes complexas como lisados celulares, tecidos, entre outras amostras biológicas (O'FARRELL, 1975). A 2DE tem sido amplamente empregada em estudos proteômicos (GARCIA et al., 2004; YATE, 1998; MARVIN et al., 2003) por possibilitar a análise conjunta de mais de 10.000 proteínas em uma única análise (LIEBOLD et al., 2006; DOMON e AEBERSOLD 2006; BECKER et al., 2006; GYGI et al., 2000).

A 2DE consiste de duas etapas principais que é a focalização isoeletrica (chamada de 1ª dimensão, separação de acordo com o ponto isoeletrico, pI, da proteína) e a separação por tamanho por SDS-PAGE (2ª dimensão). A Figura 4 ilustra um esquema dos princípios de separação num sistema de 2DE.

Figura 4. Representação esquemática procedimento experimental da 2DE. Depois do preparo adequado da amostra, esta é reidratada com a fita de IPG e em seguida submetida a uma focalização isoeletrica. Depois da primeira separação, a fita é submetida à separação por SDS-PAGE.

Na focalização isoeletrica, as proteínas são separadas em um gradiente de pH, de acordo com seus pI. Quando é aplicado um campo elétrico, um soluto negativamente carregado migra em direção ao anodo (eletrodo positivo). Durante sua migração, o soluto passa por regiões de pH progressivamente menores. Assim, uma fração cada vez maior do soluto torna-se protonado e, desta forma, a carga efetiva é alterada durante a migração até que a carga total do soluto torne-se nula e sua migração seja interrompida. Cada componente da amostra migra para uma região de pH igual ao seu pI, e permanecerá nesta posição enquanto o campo elétrico for operante (ROCHA et al., 2005). O gráfico na Figura 5 ilustra de forma

simplificada o processo no qual o analito adquire carga positiva ou negativa até atingir seu respectivo ponto isoelétrico.

Figura 5. Gráfico ilustrando a variação de carga do analito durante a focalização isoelétrica.

As fitas com gradiente de pH imobilizado estão disponíveis comercialmente em diversos tamanhos e intervalos de pH. Assim, aumenta-se a precisão das análises e há a possibilidade de separação em intervalos estreitos de pH. A fabricação das fitas é baseada em reações de copolimerização de monômeros de acrilamida, bis-acrilamida e um gradiente de acrilamida modificada (sendo que esta última contém ácidos ou bases fracas com valores de pKa conhecidos e a combinação entre esses monômeros formam o gradiente de pH da fita IPG) (BERKELMAN; STENSTEDT, 2001, 100p.). A Figura 6 ilustra a estrutura de um gel de poliacrilamida representando um gradiente de pH imobilizado.

Já a segunda dimensão (SDS-PAGE) consiste na separação dos analitos por tamanho da mesma forma que ocorre no SDS-PAGE descrito no item 1.6.1.

Figura 6. Representação de uma estrutura de um gel de poliacrilamida (BERKELMAN; STENSTEDT, 2001, 100p.).

1.6.3 – Técnica de western blotting

A técnica de *western blotting* ou *imunoblotting* também tem sido amplamente empregada em estudos proteômicos. A técnica consiste, basicamente, em uma eletrotransferência das proteínas de um gel (poliacrilamida, por exemplo) para uma membrana (nitrocelulose ou PVDF) devido a um alto potencial elétrico aplicado. Esse processo de transferência possui aplicações tais como: as proteínas transferidas para a membrana podem ser submetidas a uma degradação de Edman para o sequenciamento de aminoácidos N-terminais; a transferência também pode ser útil para localizar proteínas alvo em um gel 2DE através de ciclos de revelação com anticorpos específicos.

Inicialmente, a membrana de transferência é colocada em contato com o gel (no qual as proteínas foram separadas) e colocada (a membrana e o gel) entre papéis de transferência (ou papel de filtro grosso). Em seguida, a membrana, o gel e os filtros são colocados de forma apropriada na cuba de transferência onde é aplicado um alto potencial elétrico. As proteínas migram devido à suas cargas negativas para o eletrodo positivo (onde se encontra a membrana de transferência na qual ficam retidas). Depois de transferidas para a membrana de transferência,

esta passa por ciclos de lavagens e é encubada com um anticorpo primário (que se liga especificamente às proteínas de interesse). Em seguida, um segundo anticorpo (um anti-anticorpo) se liga ao anticorpo primário. Esse segundo anticorpo (chamado de anticorpo secundário) estará conjugado com compostos radioativos, enzimas (peroxidase ou fosfatase alcalina, por exemplo) ou marcadores bioluminescentes que irão emitir luz quando submetidos a uma etapa de revelação com reagentes apropriados. A Figura 7 ilustra a posição da membrana de transferência, do gel e dos papéis de filtro, assim como, as etapas de marcação com o anticorpo primário e anticorpo secundário e a etapa final de revelação.

Figura 7. Posição da membrana de transferência, do gel e dos papéis de filtro (lado esquerdo). No lado direito está ilustrados as etapas de marcação com os anticorpos primário e secundário e a última etapa da revelação (Introduction to antibodies, [200-]).

1.7 – Preparo de amostra

O conhecimento e aplicação das técnicas bioanalíticas apresentadas acima possuem aplicação bastante ampla, especialmente quando o enfoque são estudos

proteômicos. No entanto, a aplicação destas técnicas de análise torna-se pouco eficientes quando o preparo de amostra não é realizado de maneira adequada. O preparo de amostra é uma das etapas cruciais em pesquisa proteômica. Os resultados de um experimento dependem das condições do material de partida para a obtenção de resultados confiáveis, principalmente em uma análise proteômica comparativa ou diferencial, no qual se procura pequenas diferenças comparando-se os experimentos com controles (KULAKOWSKA et al., 2007; JIANG et al., 2004). A escolha do preparo de amostra adequado para cada situação influencia diretamente na focalização isoeletrica, o qual, por sua vez, influencia na separação da segunda dimensão tanto em termos qualitativos como quantitativos e na distribuição das espécies proteicas (SHAW, RIEDERER, 2003; VÂLCU, SCHLINK, 2006).

De forma geral, o objetivo de preparo de amostra em 2DE é converter a amostra de proteínas nativas para um estado físico-químico adequado para realizar a focalização isoeletrica, enquanto a carga e a MM da proteína são preservados (SHAW; BEAT, 2003). Quando se deseja determinar o pI das proteínas, a focalização isoeletrica pode ser realizada submetendo as amostras a um meio não desnaturante e não redutor, que pode ser alcançado com detergentes não iônicos e não desnaturante como o Triton-X e o N-dodecil- β -D-maltose (JACKOWSKI; PIELUCHA, 2001). Na maior parte dos casos, a aplicação de 2DE em estudos proteômicos foca resolver o máximo de proteínas possível. Neste caso, a primeira dimensão (focalização isoeletrica) é realizada sob condições desnaturantes e redutoras.

Uma vez isolada, as proteínas no seu estado nativo tendem a se tornarem insolúveis devido à agregação inespecífica entre proteínas por pontes de dissulfeto, ligações de hidrogênio, forças de van der Waals, interações hidrofóbicas e iônicas

(KULAKOWSKA et al., 2007). Considerando a grande diversidade biológica, a solubilização simultânea de todas as proteínas torna-se bastante desafiador. Numerosos estudos têm sido realizados com o intuito de contornar esses obstáculos, permitindo a identificação de proteínas de membrana (KRZYSIK et al., 2006; GUILLEMIN et al., 2005), proteínas ácidas e básicas (KIMBALL et al., 2005; BAE et al., 2003), proteínas de alta e baixa MM (CULVENOR et al., 2003; FOUNTOULAKI et al., 1998), pouco abundantes (LEIMGRUBER et al., 2002), contribuindo, assim, para um estudo mais amplo em estudos proteômicos. Para evitar modificações indesejadas, agregação, precipitação e perda de proteína utilizam-se agentes caotrópicos (uréia, tiouréia), agentes redutores e alquilantes, detergentes (como o 3-[(3-colamidopropil)-dimetilamônio]-1-propano sulfonato (CHAPS), Triton-X) e inibidores de protease.

A uréia é um conhecido agente caotrópico utilizado na desnaturação de proteínas rompendo as ligações de hidrogênio e interações hidrofílicas. A uréia não migra durante a focalização, ela se mantém ligada ao gel. No entanto, a uréia apresenta um grande inconveniente que é a sua instabilidade. A uréia se decompõe a cianato em temperatura ambiente e reage com os grupos amino das proteínas (carbamilação) retirando a carga positiva dos grupos amino e, dessa forma, interferindo na focalização das proteínas e durante a segunda dimensão. A carbamilação também pode ocorrer nos grupo sulfidril de resíduos de cisteína em condições levemente ácidas (pH 6), mas a carbamilmercaptanas são instáveis em ambientes alcalinos (LIPPINCOTT e APOSTOL, 1999). Já a utilização da tiouréia, que também é um agente caotrópico, tem sido reportada como um melhorador na solubilização de proteínas (MOLLOY et al., 1998; RABILLOUD, 1998). No entanto, sugere-se que a tiouréia deva ser omitida durante a etapa de equilíbrio

(imediatamente antes da segunda dimensão) porque ela se liga ao SDS e, dessa forma, diminui a quantidade de carga negativa que seria destinada para as proteínas o que faz com que as proteínas migrem menos durante a separação por tamanho na segunda dimensão (RABILLOUD et al., 1997).

A redução e alquilação é uma importante etapa do processo de preparo de amostra e evita, de forma eficiente, que ocorra carbamilações. Além disso, a redução, com ditioneitol (DTT), por exemplo, faz com que a distribuição conformacional das proteínas (de forma gaussiana) seja a menor possível, ou seja, a maior parte das proteínas estará desnaturada. A alquilação, geralmente com iodoacetamida (IAA), também previne que ocorram reações entre íons cianetos e a proteína em estudo, além de garantir que as proteínas desnaturadas não retornem à conformação nativa, o que resultaria em um aumento na distribuição gaussiana de conformações das proteínas e, com isso, um aumento na complexidade dos géis 2DE. Os agentes redutores também ajudam na solubilização de amostras protéicas complexas. Entre os mais utilizados estão o DTT, ditioeritritol (DTE) e o β -mercaptoetanol. Na ausência da etapa de alquilação pode ocorrer precipitação de algumas proteínas, principalmente queratina e queratina associada a proteínas de cabelo e lã que são ricas em ligações dissulfeto.

A escolha do detergente para solubilizar as proteínas hidrofóbicas também exige certo rigor. O detergente mais utilizado em 2DE é o zwitteriônico CHAPS que pertence à classe dos surfactantes sulfobetaina linear e é compatível com a etapa de focalização isoelétrica (PERDEW et al., 1983). No entanto, nem todos os detergentes dessa classe são compatíveis como é o caso do sulfobetaina caprilil (SB3-10), que não é compatível com a alta concentração de uréia que normalmente é utilizada.

Um dos grandes obstáculos associados às amostras biológicas é a abundância de certas proteínas presentes nos organismos. Em uma única célula pode haver mais de 1.000.000 de cópias das proteínas mais abundantes (KULAKOWSKA et al., 2007). Para contornar esse problema, as proteínas mais abundantes devem ser removidas ou reduzidas, o que pode ser realizado aplicando diversas técnicas de pré-fracionamento como precipitações (com solventes orgânicos ou sais), centrifugações, técnicas cromatográficas, extração em fase sólida, etc (PATTERSON, 2003). Para isso, a escolha do melhor protocolo deve estar de acordo com a natureza da amostra e as propriedades das proteínas de interesse (hidrofobicidade, tendência de formar agregados, abundância, etc).

O estudo do melhor método de preparo de amostra é de extrema importância uma vez que, usualmente, as proteínas menos abundantes carregam valiosas informações para diagnósticos, além de serem responsáveis por diversos processos celulares (KULAKOWSKA et al., 2007; DREGER et al., 1998; BLONDER et al., 2002).

1.8 - Métodos de enriquecimento de proteínas

1.8.1 - Precipitação

De forma geral, a separação por precipitação de diferentes tipos de proteínas em uma amostra complexa consiste em alterar as propriedades do solvente. Normalmente, através de centrifugação, o sobrenadante é retirado e o precipitado, por sua vez, é ressuspenso em um solvente desejado.

A precipitação é uma das técnicas comuns para enriquecimento e purificação de proteínas. Para isso, é muito empregado acetona, etanol, isopropanol, dietileter, clorofórmio/metanol, ácido trifluoracético, ácido tricloroacético, acetato de amônio,

além de inúmeros kits comerciais para precipitação por afinidade (TANTIPAIBOONWONG et al., 2005). Outra forma de precipitação também pode ocorrer quando as proteínas estão nos seus pontos isoelétricos.

A adição de solventes orgânicos como a acetona ou clorofórmio/metanol, provoca vários efeitos no meio aquoso e leva às precipitações. O principal efeito é a redução da atividade da água, ou seja, uma alteração na constante dielétrica da água. A capacidade de solvatação da água diminui ao passo que a quantidade de solvente orgânico aumenta. As moléculas de água localizadas ao redor da superfície das proteínas (água de solvatação) na região hidrofóbica são deslocadas por moléculas de solvente orgânico apolar, levando a uma menor solubilidade dessas regiões. A precipitação ocorre devido às interações eletrostáticas e às forças de van der Waals do tipo dipolo-dipolo. As atrações hidrofóbicas são menos pronunciadas devido à presença solubilizadora de moléculas do solvente nesta região. A agregação entre as proteínas ocorre devido às interações entre cargas opostas na superfície das proteínas (SCOPES, 1986). A Figura 8 ilustra o processo de precipitação quando é utilizado solvente orgânico.

Figura 8. Agregação de proteínas em meio aquoso-solvente orgânico (SCOPES, 1986).

A utilização de sais para precipitações também é bastante comum. A precipitação com altas concentrações de sais ocorre devido à desestabilização das proteínas (efeito *salting-out*). A explicação do processo de agregação pode ser simplificada devido ao fato de que quando um sal é adicionado haver o efeito de solvatação dos íons do sal pela água, em detrimento das proteínas. Assim, as regiões não solvatadas das proteínas interagem entre si ocasionando o processo de precipitação. As características do sal também devem ser consideradas, como a solubilidade e a eficiência em precipitar. Os sais mais eficientes são os ânions que possuem múltiplas cargas como o sulfato, fosfato e citrato; já os cátions são menos eficientes (SCOPES, 1986).

A imunoprecipitação é outra técnica utilizada para separar de forma eficiente somente as proteínas de interesse. Anticorpos específicos são imobilizados em uma fase estacionária, a amostra é adicionada, a fase com o anticorpo e a proteína imobilizada é submetida a ciclos de lavagem e depois a proteína de interesse é eluída (NEWTON et al., 2006).

O pI também pode ser utilizado para a precipitação de proteínas. Em pH inferior ao pI , as proteínas adquirem cargas positivas, dessa forma, a repulsão é suficientemente grande para provocar repulsão entre elas. No caso de valores de pH maiores do que o pI a repulsão também é grande, mas devido ao grande número de cargas negativas que a proteína adquire. Nas regiões próximas do pI , a soma total das cargas é nula, ou seja, não há excesso de cargas negativas nem positivas, dessa forma, ocorrem interações eletrostáticas entre as proteínas, assim como, entre os agregados. A Figura 9 mostra um gráfico representando a variação da solubilidade de uma proteína em função do pH do meio.

Figura 9. Variação da carga das proteínas de acordo com a variação do pH (SCOPE, 1986).

1.8.2 - Centrifugação

A centrifugação é um método simples de pré-fracionamento. A separação pode ocorrer devido a uma série de centrifugações e diferentes rotações por minuto (rpm), ou a amostra pode ser adicionada em um tubo contendo um gradiente de sacarose e, depois, submetida a uma série de centrifugações, o que permite a separação de acordo com as características de densidade da proteína (DREGER, 2003). Este tipo de concentração é bastante utilizado em estudos com mitocôndrias, membranas, entre outros (LINK et al., 2005).

Dentro deste subitem podem ser incluídas as centrifugações utilizando concentradores com membranas semipermeáveis com faixas definidas de separação de MM, por exemplo, 10 kDa, ou seja, tudo que for menor que 10 kDa passa pelo filtro. Esses sistemas podem ser utilizados para, além de concentrar a amostra através da redução do volume, permitir a troca de solvente, a lavagem de proteínas ou, até mesmo a eliminação de sais e outros interferentes das amostras.

2 – Objetivos

O diagnóstico precoce da DA pode resultar em um tratamento adequado da doença com um conseqüente aumento da qualidade de vida do paciente e menor custo de tratamento para a sociedade e para o indivíduo. O objetivo deste trabalho foi otimizar a extração de APP a partir de plaquetas humanas para posterior separação e análise por 2DE com fins de diagnóstico da DA.

3 – Procedimentos experimentais

3.1 – Instrumentação analítica

3.1.1 – SDS-PAGE

Foi utilizado um sistema de SDS-PAGE, para as análises preliminares de preparo de amostra, da Bio-Rad (Protean II Ready Gel System) (Figura 10) do Grupo de Cristalografia do Instituto de Física de São Carlos (IFSC) da Universidade de São Paulo (USP).

Protean II Ready Gel System
Bio-Rad

Figura 10. Sistema SDS-PAGE utilizado durante os preparos de amostra.

3.1.2 – Eletroforese bidimensional (2DE)

Para a realização da focalização isoeletrica, foi utilizado o equipamento Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare) e o software IPGphor 3 versão 1.1 para controlar o equipamento. Para a segunda dimensão, o equipamento utilizado foi a *cuba SE 600 Ruby – standard dual cooled gel electrophoresis unit da GE Healthcare*. Para aplicar a alta tensão foi utilizada a fonte da Amershan Pharmacia Biotech modelo *Electrophoresis Power Supply EPS 601*. As imagens dos géis foram obtidas com um scanner específico para géis *Image Scanner da GE Healthcare*. As imagens adquiridas foram tratadas com o programa *Image Master 2D Platinum 6.0 da GE*

Healthcare. Todo o sistema de 2DE, bem como todo o aparato para análise das imagens pertence ao Grupo de Cristalografia do IFSC/USP. A Figura 11 mostra os equipamentos utilizados para a primeira e segunda dimensão.

Figura 11. Equipamentos de primeira e segunda dimensão da técnica 2DE.

3.1.3 – Western blotting

O equipamento de western blotting utilizado foi o *Trans-blot SD Semi-dry transfer cell* da Bio-Rad que também pertence ao Grupo de Cristalografia do IFSC/USP.

3.3 – Coleta e preparo do plasma rico em plaquetas (PRP)

Os indivíduos selecionados para o estudo foram recrutados no Ambulatório de Psicogeriatria do Laboratório de Neurociências (LIM-27) do Instituto de Psiquiatria do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, onde já existe uma coorte de indivíduos idosos em seguimento prospectivo desde 2002. Estes indivíduos são reavaliados, anualmente, por uma equipe multidisciplinar, composta por psiquiatras, neurologistas, geriatras, neuropsicólogos, biólogos, terapeuta ocupacional, fonoaudióloga, além de médicos em formação (residentes em Psiquiatria e alunos

de iniciação científica). A coleta de material foi de acordo com as prerrogativas do Comitê de Ética do Instituto de Psiquiatria do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP.

O preparo das plaquetas foi realizado a partir de um protocolo adaptado dos estudos de Di Luca et al. (1998) e Rosenberg et al. (1997). Foram coletados 15 mL de sangue em tubos à vácuo do tipo *monovet* contendo anticoagulante citrato de sódio e adicionado 200 μL de EDTA 0,1 mol L^{-1} para cada 10 mL de sangue. A amostra foi homogenizada delicadamente por inversão e centrifugado por 10 min a 1300 rpm e 20 °C. O sobrenadante PRP (Plasma Rico em Plaquetas) foi transferido para tubo com capacidade de 15 mL (tipo falcon) e centrifugado por 15 min a 2400 rpm e 20 °C. O sobrenadante foi removido por inversão e o precipitado de plaquetas lavado com 5 mL de tampão Tris 10 mmol L^{-1} , pH 7,4. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* ressuspendido em 1 mL de tampão de lise contendo inibidor de proteases. Finalmente, as plaquetas foram dispensadas em alíquotas em criotubos e armazenadas em freezer a – 80 °C.

3.4 – Preparo de amostra

Antes de aplicar as técnicas de precipitação e concentração com concentradores, foi determinado o valor da concentração de proteína total do PRP preparado no item 3.3 pela técnica de Lowry, para ter o controle da quantidade de proteína total que foi aplicada no gel 2DE.

Outra variável avaliada foi a lise das plaquetas com o auxílio de um ultra-som. Após a solubilização do PRP com solução de uréia, tiouréia e CHAPS a amostra foi submetida a 6 ciclos de lise por ultra-som sendo 15 s ligado e 45 s de descanso

(totalizando 6 min de processo). Durante todo o procedimento, a amostra ficou em um recipiente com gelo para evitar degradação da uréia por aquecimento.

As etapas de preparo de amostra a seguir foram realizadas tanto para as amostras PRP apenas solubilizada em solução de lise quanto para as amostras submetidas aos ciclos de ultra-som (esta etapa foi realizada depois de adicionada a solução de lise). A mesma concentração de amostra foi utilizada para ambos os casos (25 µg de proteína total).

A amostra de plasma rico em plaqueta (PRP) previamente preparado no Instituto de Psiquiatria do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, congelada e armazenada a – 80 °C, foi descongelada a temperatura ambiente e dividida em duas porções iguais para a etapa de preparo de amostra.

Depois de descongelada, em 400 µL de amostra foi adicionado 400 µL de solução de lise composto por 4 % de CHAPS, 2 mol L⁻¹ de tiouréia, 7 mol L⁻¹ de uréia e 20 mmol L⁻¹ DTT. A solução foi retirada com o auxílio de uma pipeta automática e dividida em 2 tubos para a realização das precipitações e concentrações.

Em todas as amostras foram utilizadas a mesma solução de reidratação (preparação para primeira dimensão), ou seja, todos os *pellets* formados foram ressuspensos em 7 mol L⁻¹ de uréia, 2 mol L⁻¹ de tiouréia, 2 % de CHAPS, 0,002 % de bromofenol e 0,5% de IPG *buffer* (de acordo com o intervalo de pH da *strip* utilizada).

3.4.1 – Precipitações com solventes orgânicos

Os solventes orgânicos utilizados neste item foram:

- acetona (concentração final de 90 %)
- solução de clorofórmio/metanol (70:30, v/v)

Precipitação com acetona 90 %

Para 400 μL de amostra (amostra mais a solução de lise) foi adicionado 3600 μL de acetona gelada e a mistura deixada *overnight* a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. A solução com o precipitado foi centrifugada a 13000 rpm por 30 min a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensionado em 250 μL de solução de reidratação (utilizada no preparo das *strips* para a focalização isoeletrica).

Precipitação com clorofórmio/metanol (70:30, v/v)

Para 400 μL de amostra foi adicionado 1 mL de solução clorofórmio/metanol (70:30, v/v). Em seguida a amostra foi deixada *overnight* a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após o descanso no freezer, ocorreu a formação de um precipitado na interface entre as fases aquosa e orgânica. A fase orgânica foi separada e descartada e, em seguida, centrifugada a 13000 rpm por 15 min a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ (processo realizado duas vezes). A amostra foi centrifugada novamente a 13000 rpm por 15 min a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ e o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensionado em 250 μL de solução de reidratação.

As amostras precipitadas com os solventes orgânicos também foram avaliadas quando foi aplicada uma etapa adicional de lise por ultrassom (como descrito no item 3.6) antes da precipitação. Neste caso, o sobrenadante também foi descartado e o *pellet* ressuspensionado em 250 μL de solução de reidratação (utilizada no preparo das *strips* para a focalização isoeletrica).

3.4.2 – Precipitações com ácidos

Para a precipitação com ácidos, foram utilizados:

- ácido tricloroacético 10 % (TCA)
- ácido trifluoroacético 10 % (TFA)

Precipitação com TCA 10 %

Em 400 µL de amostra (amostra mais solução de lise) foi adicionado 44 µL de TCA 100 %, para uma concentração final de aproximadamente 10 %, e deixado *overnight* a – 20 °C. A amostra foi centrifugada a 13000 rpm por 30 min e – 10 °C. O *pellet* formado foi submetido a 3 ciclos de lavagem com etanol gelado. A lavagem consistiu na adição de 1 mL de etanol e agitado com um pipetador automático, em seguida, a amostra foi centrifugada a 13000 rpm por 10 min e – 10 °C. Após a lavagem, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspendido em 250 µL de solução de reidratação. A solução teve que ser basificada com hidróxido de amônio devido ao baixo pH do TCA.

Precipitação com TFA 10 %

Para a precipitação com TFA foi utilizado 400 µL de amostra (amostra mais solução de lise) e adicionado 100 µL de uma solução 50 % TFA/H₂O para uma concentração final de 10 % de TFA. A mistura foi deixada *overnight* a – 20°C. Antes do descarte do sobrenadante, a amostra foi centrifugada a 13000 rpm por 30 min e – 10 °C. O *pellet* foi lavado 3 vezes com etanol gelado e submetido a centrifugação a 13000 rpm por 10 min e -10 °C. Após a terceira lavagem o sobrenadante foi novamente descartado e o *pellet* ressuspendido em 250 µL de solução de reidratação para a realização da focalização isoeletrica.

As amostras precipitadas com TFA e TCA 10 % também foram analisadas depois que uma etapa adicional de lise por ultrasom foi realizada antes da precipitação com os ácidos.

3.4.3 – Precipitação com sais

As precipitações com sais foram realizadas com:

- acetato de amônio
- sulfato de amônio

Precipitação com acetato de amônio

Em 400 μL de amostra foi adicionado 1 mL de solução 0,1 mol L^{-1} de acetato de amônio em metanol. A solução foi deixada *overnight* a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após esse período, a amostra foi centrifugada a 13000 rpm (30 min, -10°C), em seguida o sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado com etanol gelado para retirar o excesso de sal que interfere na primeira dimensão da 2DE. A lavagem foi realizada 3 vezes e seguida por centrifugação a 13000 rpm por 10 min e a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspendido em 250 μL de solução de reidratação.

Precipitação com sulfato de amônio

Foi adicionado 132,4 mg de sulfato de amônio (para obter uma solução saturada com corpo de fundo) em 400 μL de amostra. A amostra foi deixada *overnight* a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Em seguida, a amostra foi centrifugada por 30 min a 13000 rpm e -10°C . Após a centrifugação, foi lavada 3 vezes com acetona gelada e centrifugada a 13000 rpm por 10 min na câmara fria. Após o terceiro ciclo de lavagem, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspendido em 250 μL de solução de reidratação.

3.4.4 – Concentradores

Os concentradores utilizados para reduzir o volume da amostra, assim como eliminar o máximo possível de interferentes, foram:

- amicon com corte de MM de 10 kDa (Millipore)
- centricon com corte de MM de 10 kDa (Millipore)
- microcon com corte de MM de 10 kDa (Millipore)

A amostra foi adicionada (400 μL) no concentrador após a adição da solução de lise. O volume da amostra foi reduzido para aproximadamente 20 μL . Em seguida, foi adicionado 230 μL de solução de reidratação para a realização da primeira dimensão da 2DE.

Para as condições de amostra lisadas por ultrassom, o processo ocorreu antes de adicionar a amostra (amostra mais a solução de lise) nos concentradores.

3.4.5 – Preparo de amostra para análises por SDS-PAGE

Preparo de amostra bruta de PRP:

Em 20 μL da amostra bruta PRP (concentração de proteína total de 1,85 mg mL^{-1}) foi adicionado 10 μL de tampão de amostra para gel 1D (β -mercaptoetanol 15 %, glicerol 30 %, SDS 6 %, tris-HCl 0,188 mol L^{-1}) e fervido por 5 min.

Um volume de 10 μL da mistura (amostra mais tampão de amostra) foi adicionada na canaleta de um mini gel 1D (poliacrilamida 10 %), cerca de 20 μg de proteína total. Foram realizados 2 géis, 10 μL para cada gel. Não foi possível aplicar uma quantidade maior de amostra para atingir 25 μg de proteína total devido ao volume necessário e a canaleta do gel não suportaria um volume maior que 20 μL .

Preparo de amostra como descrito nos itens 3.4.1 a 3.4.4:

Em 400 μL de amostra foi adicionado 400 μL de solução de lise (Uréia 7 mol L^{-1} , tiouréia 2 mol L^{-1} , CHAPS 4 %).

Em seguida, os 800 μL total foram submetidos a seis ciclos de ultrason (15 s ligado, 45 s desligado) e depois centrifugado por 10 min a 11000 rpm e 10 °C. A partir desta amostra, foram realizados os demais preparos de amostra, utilizando 55 μL o que resultou em 50 μg de proteína total (dividido para 2 géis, resultou em aproximadamente 25 μg de proteína em cada canaleta).

- Precipitação com acetona

54 μL amostra + 500 μL acetona gelada → overnight no freezer

- Precipitação com clorofórmio/metanol

54 μL amostra + 135 μL acetona gelada → overnight no freezer

- Precipitação com TCA 10 %

54 μL amostra + 5,4 μL TCA 100 % → overnight no freezer

- Precipitação com TFA 10 %

54 μL amostra + 10 μL TFA 50 % → overnight no freezer

- Concentrador centricon, amicon e microcon

As amostras foram concentradas até um volume de aproximadamente 10 μL .

Depois de concentradas, as amostras foram ressuspensas em tampão de amostra SDS-PAGE (β -mercaptoetanol 15 %, glicerol 30 %, SDS 6 %, tris-HCl 0,188 mol L^{-1}) e fervidas por 5 min.

3.5 – Metodologia de separação

Toda a metodologia, soluções, reagentes e procedimento experimental utilizado para a realização dos experimentos 2DE estão detalhadamente descritos nos apêndices 1 e 2. Todas as tabelas e concentrações de soluções foram obtidas a partir do manual da GE Healthcare (BERKELMAN; STENSTEDT, 2001, 100p.).

SDS-PAGE

Após o preparo da amostra conforme item 3.4, foi dosado o conteúdo de proteínas totais da suspensão de plaquetas pelo método Lowry. Com o resultado da quantidade de proteína, as amostras foram diluídas com tampão de amostra (*Laemmli buffer* contendo 12 % β -mercaptoetanol, 10 % glicerol, 10 % SDS, 0,2 % de azul de bromofenol e Tris 0,8 mol L⁻¹) para concentrações de proteína entre 0,65 e 1 mg mL⁻¹. No gel de poliacrilamida 10 % foram aplicados 25 μ g de proteína total. Antes da aplicação no gel, as amostras foram fervidas por 5 minutos. A eletroforese para a separação das proteínas se desenvolveu em tampão de corrida por 90 minutos a 120 V.

3.5.1 – Focalização isoeletrica (primeira dimensão)

Para a focalização isoeletrica, a amostra, depois de passar pelos preparos adequados, foi solubilizada em solução de reidratação e colocada em um dispositivo de acrílico com várias canaletas. Então, a fita IPG (com o gradiente de pH desejado) foi aplicada na canaleta com a amostra solubilizada com solução de reidratação, de forma que a solução ficasse espalhada por toda a superfície da fita IPG, tomando o cuidado de manter sempre o gel imobilizado voltado para baixo e, dessa forma, aumentando o contato do gel imobilizado na fita com a solução de reidratação. Em

seguida, a canaleta foi coberta com um óleo mineral (*cover fluid*) para evitar que a fita pudesse ressecar, a amostra precipitar ou, até mesmo, que a uréia cristalizasse. A fita, juntamente com a solução de reidratação, foi deixada em repouso por no mínimo 12 h a temperatura ambiente.

Após esta etapa de reidratação da fita IPG, a fita reidratada com amostra foi colocada em uma cerâmica (pequena bandeja para várias fitas) e esta colocada no sistema de focalização. Em seguida, a bandeja com a fita foi coberta com *cover fluid*. Neste caso, o *cover fluid* serviu como isolante elétrico, além de bom condutor de calor, o que evita aquecimento e possíveis ressecamentos das fitas IPG.

Nas extremidades das fitas, foi adicionado um pedaço de papel de filtro úmido para fazer o contato entre a fita IPG e os eletrodos. Depois disso, os eletrodos foram posicionados em cima dos papéis de filtro molhados e foi aplicada uma seqüência de alta voltagem para a focalização isoeletrica das proteínas (Tabela 2).

Tabela 2. Seqüência de voltagem utilizada na focalização isoeletrica.

Modo de aplicação	Voltagem (V)	Carga acumulada (Vh)
Constante	500	500
Gradiente	1000	800
Gradiente	8000	11300
Constante	8000	5400
TOTAL		18000

3.5.2 – SDS-PAGE (segunda dimensão)

Após a etapa de focalização, as fitas foram equilibradas com solução de equilíbrio com DTT por 20 min e, em seguida, equilibradas novamente com solução de equilíbrio com IAA por mais 20 min. Esta etapa foi aplicada para a redução

(equilíbrio com DTT) e alquilação (equilíbrio com IAA) das proteínas. Dessa forma, as proteínas foram desnaturadas e não poderiam re-enovelar.

O sistema para a separação por tamanho (SDS-PAGE) foi montado e a solução de acrilamida foi aplicada entre as placas de vidro, que formam uma espécie de sanduíche. Após a polimerização da solução, as fitas equilibradas foram aplicadas no topo do gel juntamente com um padrão de MM (este foi aplicado em um pequeno papel de filtro) em uma das extremidades do topo do gel. O topo do gel foi selado com agarose (contendo coomassie para auxiliar na visualização do término da corrida).

O sistema de placas de vidro com o gel polimerizado e a fita IPG focalizada e selada com agarose, foi montado em uma cuba com capacidade para 4 L de solução de corrida. Os eletrodos da cuba foram conectados em uma fonte de alta tensão e aplicado 15 mA por gel durante 15 min. Após essa primeira etapa, a corrente foi aumentada para 50 mA por gel até o fim da corrida.

É importante ressaltar que a corrente elétrica (i) deve ser mantida constante e não a voltagem (U). Isso se deve porque com a passagem da corrente elétrica ocorre geração de calor (efeito Joule) o que aumenta a resistência (R) do gel para a migração das proteínas e, dessa forma, elas começam a migrar com velocidade progressivamente menor com o passar da corrida. Assim, se a voltagem for constante, com o passar do tempo a resistência aumentará e a corrente cairá já que:

$$U = Ri \quad (\text{Equação 1})$$

Por outro lado, se a corrente for constante, com o passar do tempo a resistência começa a aumentar, mas a voltagem também aumenta para compensar esse aumento e manter a Equação 1 uma igualdade. Com isso, a migração das proteínas será constante durante toda a análise.

Após o término da corrida, o gel foi retirado do sistema de SDS-PAGE e submetido a diversas etapas de fixação, coloração e descoloração. A Tabela 3 mostra as etapas utilizadas para este último procedimento.

Tabela 3. Etapas utilizadas para fixar, corar e descorar o gel 2DE.

Tratamento do gel após a segunda dimensão		
Etapa	Tipo de solução	Tempo de contato (min)
1	Solução fixadora	30
2	Descorante	3
3	Coomassie 0,025 %	90
4	Solução descorante	15
5	Solução descorante	45
6	Solução descorante	120
7	Solução descorante	120
8	Solução preservante	30

3.5.3 – Western blotting dos géis 2DE

Para a eletrotransferência das proteínas separadas no gel 2DE, o gel não foi corado com coomassie. Depois da separação por tamanho (segunda dimensão), dois papéis de filtro, membrana de nitrocelulose (todos do mesmo tamanho do gel) e o gel de poliacrilamida com as proteínas separadas foram colocados para equilibrar com solução de transferência por 15 min. Depois do equilíbrio com solução de transferência, os filtros, a membrana e o gel foram colocados na cuba de eletrotransferência na seguinte ordem: filtro de papel, membrana de nitrocelulose, gel de poliacrilamida e, por último, o outro papel de filtro. Foi aplicado 40 mA constante por 1 h e, depois disso, a membrana de nitrocelulose foi corada com ponceau para a verificação da eficiência da eletrotransferência das proteínas do gel para a membrana. A etapa seguinte consistiu em bloquear a membrana com leite desnatado a 5 % TBS por 1 h sob agitação e temperatura ambiente. O bloqueio com

leite desnatado tem como objetivo evitar interações inespecíficas dos anticorpos com a membrana de nitrocelulose. Após o bloqueio, a membrana foi lavada 3 vezes por 5 min com solução TBS e, depois disso, incubada por 2 h com o anticorpo primário (22C11) diluído 1:5000, que reconhece os aminoácidos 66-81 da porção N-terminal da APP. Depois da incubação com o anticorpo primário, a membrana foi novamente lavada 3 vezes por 5 min com TBS para retirar o excesso de anticorpo primário que não se ligou à APP. Então, a membrana foi submetida a mais uma incubação de 2 h, mas agora com o anticorpo secundário diluído 1:10000 (anti mouse IgG conjugado com alcalino fosfatase) sob agitação e temperatura ambiente. Antes da etapa de revelação, a membrana foi lavada novamente 3 vezes por 5 min com TBS para retirar o excesso de anticorpo secundário. Por último, foi utilizado um kit de revelação da Bio-Rad específico para fosfatase alcalina que, no final do processo, deixou uma mancha escura na região das bandas das isoformas da APP.

Para as medidas de densitometria de bandas, foi utilizado como anticorpo secundário um anticorpo conjugado com peroxidase. A revelação ocorreu dentro do equipamento de imagem *ChemiiimagerTM 4000* da Alpha Innotech, *MultilImage Light Cabinet*. Sobre a membrana foi adicionado o reagente ECL (GE) que após reagir com a peroxidase conjugada ao anticorpo emitiu luz, que foi captada pelo equipamento de imagem e arquivada no computador através de software específico. A emissão de luz foi continuamente captada por 15 minutos, sendo então realizada a densitometria das bandas. A razão da APP foi obtida dividindo-se os resultados da densitometria das bandas de 130 kDa pelos resultados da densitometria das bandas de 110 kDa.

4 – Resultados e discussão

4.1 – Teste inicial 2DE para avaliar a viabilidade dos preparos de amostra

Inicialmente, este trabalho tinha como objetivo a separação das isoformas da APP por 2DE e a sua identificação por MS. As proteínas seriam localizadas no gel 2DE através da técnica de *western blotting* e revelação com anticorpos específicos para APP. Em seguida, seria realizada uma digestão trípica dos *spots* correspondentes às isoformas da APP e identificadas por MS. No entanto, a etapa de preparo de amostra se confirmou como sendo bastante desafiadora e extremamente importante para o bom andamento das análises futuras. Dessa forma, o desenvolvimento da etapa de preparo de amostra tornou-se o principal enfoque deste trabalho.

Considerando o objetivo de padronizar um teste diagnóstico prematuro para DA por 2DE, a preparação da amostra deve ter as seguintes características: 1) rápida; 2) reprodutível; 3) confiável; e 4) baixo custo. Portanto, a seleção e padronização de todo o procedimento deve ser criteriosa de forma a combinar as características apresentadas acima.

Os primeiros testes foram realizados diretamente em 2DE para verificar se os preparos de amostras seriam adequados e se não haveria nenhum tipo de problema durante a focalização isoeletrica ou durante a segunda dimensão. A Figura 12 mostra os resultados das análises por 2DE realizadas com diferentes tipos de preparo de amostra. De acordo com a Tabela 1, os pontos isoeletricos dos fragmentos solúveis da APP apresentam *pI* teórico de aproximadamente 4,7. Observou-se na Figura 12, na região de *pI* 4,5 e 5,5 e *MM* próxima de 116 kDa, a

existência de diversas proteínas que podem corresponder às proteínas de interesse. Em uma primeira análise, a Figura 12D apresenta visualmente o melhor resultado com proteínas com MM próxima a 116 kDa e pI de aproximadamente 5.0. No entanto, apenas com esses resultados não se pôde definir nada sobre a perda ou não das proteínas alvo (APPs), principalmente com um objetivo de quantificar a relação entre as diferentes isoformas da APP. Por isso, houve a necessidade da realização de outras análises, como o SDS-PAGE discutido a seguir, a fim de determinar o melhor método de preparo de amostra para as isoformas da APP minimizando sua perda.

A Figura 12A representa a precipitação da amostra com acetato de amônio. As precipitações realizadas com os sais (aumento da força iônica do meio) formaram *pellets* grandes e de forma rápida. No entanto, o maior problema foi a remoção do sal que não ocorreu de forma eficiente e que exigiria uma etapa de diálise para um melhor resultado. O excesso de sal acarretou em interferência durante a focalização isoeletrica, gerando uma corrente muito alta (maior que 90 μ A) o que ocasionou em geração de calor (convecções térmicas), possível degradação da amostra e focalização não eficiente. Como o sistema é automatizado, quando foi detectada corrente muito alta o equipamento de análise interrompeu o processo para evitar danos ao sistema. A adição de uma etapa de diálise faria da análise um processo muito moroso já que tal procedimento leva mais de 24 h para ser realizado. Além disso, pela simples análise visual foi possível verificar que a precipitação com acetato de amônio não apresentou bom resultado devido, possivelmente, às interferências decorrentes da presença de sais na amostra. Já a análise por 2DE da amostra precipitada com sulfato de amônio não foi realizada devido à alta corrente durante a focalização isoeletrica.

Figura 12. Análises iniciais de 2DE (10 % acrilamida) utilizando uma fita com uma faixa de pI 3-10 linear. A) Precipitação com acetato de amônio. B) Precipitação com

TFA 10 %. C) Precipitação com TCA 10 %. D) Precipitação com acetona 90 %. E) Precipitação com clorofórmio/metanol (70:30, v/v). F) Concentrador centricon com corte de massa de 50 kDa. G) Concentrador amicon com corte de massa de 30 kDa.

As precipitações com TCA 10% (Figura 12B) e TFA 10% (Figura 12C) apresentaram resultados mais promissores do que as precipitações com os sais. Mas apesar disto, os resultados das precipitações com acetona 90% (Figura 12D) e clorofórmio/metanol (70:30, v/v) (Figura 12E) se mostraram mais adequados. Isso se deve, provavelmente, aos ciclos de lavagem que são necessários para a eliminação dos ácidos. Nesses ciclos ocorrem perdas de proteína o que foi difícil de controlar e levaria muito tempo se uma remoção dos ácidos tivesse que ser feita com ciclos mais longos de centrifugação e troca da solução de lavagem (no caso etanol gelado).

As precipitações com acetona 90 % gelada e clorofórmio/metanol (70:30, v/v) mostraram-se mais práticas, sem necessidade de ciclos de lavagens (para remoção de sais ou ácidos), o que diminuiu a perda quantitativa de amostra inerente à manipulação, menor introdução de interferentes e contaminantes. Inicialmente, a precipitação com acetona 80 % não foi efetiva (dados não mostrados), por isso, a porcentagem de solvente orgânico foi aumentada para 90 %, o que resultou em melhores resultados. Por outro lado, os ensaios realizados com a mistura clorofórmio/metanol apresentaram-se bastante efetivos, sendo que a precipitação das proteínas ocorreu quase que de imediato. Apesar da aparente rápida precipitação, as amostras precipitadas com a mistura clorofórmio/metanol foram deixadas overnight a – 20 °C para garantir a máxima precipitação.

Já com a utilização de concentradores os resultados não foram satisfatórios. Com o concentrador do tipo centricon (Figura 12F) houve visivelmente perda de

proteína, a membrana do concentrador reteve grande parte da amostra ou simplesmente o filtro não foi eficiente o bastante para segurar as proteínas. No entanto, o concentrador do tipo amicon (Figura 12G) apresentou melhores resultados. Esses métodos de preparo de amostra teoricamente seriam os mais indicados, já que não necessitam da introdução de reagentes para precipitar as proteínas, é necessário apenas adicionar a amostra e concentrar até o volume desejado, no entanto, o grande inconveniente foi a perda de proteínas. O microcon também apresentou perda de amostra, possivelmente na membrana do concentrador (dados não mostrados).

Em resumo, nesta etapa preliminar, o melhor método de preparo de amostra (o que apresentou maior número de *spots*) foi a precipitação com acetona. Classificando os métodos na ordem de melhor para o pior método de precipitação obtem-se: acetona 90 % > clorofórmio/ metanol (70:30, v/v) > concentrador amicon (corte 10 kDa) > concentrador centricon (corte 10 kDa) > acetato de amônio > TFA 10 % e TCA 10 %.

4.2 – Substituição de DTT por reagente comercial *Destreak*

Mais dois testes foram realizados substituindo o DTT na etapa de reidratação da *strip* por outro reagente (*Destreak*) que também possui a função de solubilizar, estabilizar a proteína durante a corrida e evitar oxidações não específicas. Foram preparadas mais duas amostras precipitadas com acetona 90 % e clorofórmio/metanol (70:30 v/v) da mesma forma como descrito anteriormente. Após a precipitação o *pellet* foi ressuspensionado em solução de reidratação contendo 12 µL de *destreak*/mL de solução de reidratação no lugar do DTT. Na Figura 13 é possível

observar que o uso deste reagente não resultou em aumento da resolução dos *spots* possivelmente por este reagente atuar mais efetivamente em faixas de pH básico.

Figura 13. Géis 2DE (10 % acrilamida) utilizando reagente Destreak no lugar de DTT. A) Precipitação com clorofórmio/metanol (70:30, v:v). B) Precipitação com acetona 90 %.

Com esses resultados iniciais (itens 4.1 e 4.2), foi possível eliminar a precipitação com o sulfato de amônio devido à dificuldade em remover o sal (que deve ser removido com vários ciclos de lavagem e centrifugação) e devido à alta corrente gerada durante a focalização isoeletrica, o que levou ao desligamento automático do sistema.

Mesmo que pela análise visual dos resultados iniciais a precipitação com acetona aparente ser o melhor método de preparo de amostra para a APP como já citado (Figura 12D), a análise apenas visual dos géis 2DE dos diferentes preparos de amostra não foi suficiente para a escolha da melhor condição de preparo de amostra. O trabalho não tem como objetivo o estudo proteômico diferencial de proteínas de plaquetas, ou seja, a obtenção da maior quantidade de proteínas possível, mas sim a escolha do melhor método para a obtenção da APP. O método

que fornece a maior quantidade de proteínas no gel 2DE pode não ser o melhor para a APP e não possibilita avaliar especificamente a perda ou concentração das isoformas da APP por não ser um método seletivo para essas isoformas.

Assim, para avaliar o melhor preparo de amostra para a APP foram aplicadas análises por SDS-PAGE (por ser rápida, mais prática e de menor custo), seguido por *western blotting* e medidas da densitometria de bandas com anticorpos específicos para APP. Desta forma, seria possível determinar qual(ais) método(s) de precipitação resultaria em maior ou menor quantidade de APP. Assim, depois da determinação por SDS-PAGE e *western blotting*, o melhor método poderia ser escolhido para a etapa de separação das isoformas por 2DE, seguido da digestão trípica das isoformas recortadas do gel.

4.3 – Avaliação das soluções de preparo de amostra de 2DE e SDS-PAGE

O primeiro teste foi realizado na tentativa de utilizar a mesma solução de preparo de amostra para SDS-PAGE (12 % β -mercaptoetanol, 10 % glicerol, 10 % SDS, 0,2 % de azul de bromofenol e tris 0,8 mol L⁻¹) no preparo da primeira dimensão do 2DE, e vice-versa. Esses testes foram realizados para que houvesse a menor diferença possível entre os testes no SDS-PAGE e 2DE.

A primeira tentativa (de aplicar tampão de amostra do SDS-PAGE no 2DE) não foi bem sucedida e não foi possível realizar a primeira dimensão do 2DE devido à alta corrente gerada pelo SDS presente no tampão de amostra para SDS-PAGE. Assim, uma segunda tentativa foi realizada preparando um novo tampão de amostra de SDS-PAGE, no entanto sem SDS. Mais uma vez, o resultado não foi bom e não foi possível realizar a primeira dimensão do 2DE utilizando um tampão de amostra do SDS-PAGE.

Como não foi possível utilizar o tampão de amostra do SDS-PAGE no 2DE, foram realizados testes com a solução de reidratação (uréia 7 mol L⁻¹, tiouréia 2 mol L⁻¹, CHAPS 2 %, azul de bromofenol 0,002 %, IPG buffer 1 % e DTT 7 mg/ 2,5 mL) do 2DE aplicada no SDS-PAGE. Foram realizados todos os preparos de amostras (precipitação com acetona 90 %, clorofórmio/metanol 70:30, TCA 10 %, TFA 10 %, acetato de amônio, centricon, microcon e amicon) com a solução de reidratação de 2DE e aplicados em um mini gel SDS-PAGE 10 % de poliacrilamida. O resultado mostrou o que já era esperado, as proteínas não migraram devido à ausência de SDS que transfere carga negativa para as proteínas, possibilitando, assim, a migração no gel de poliacrilamida. Dessa forma, foi adicionado SDS na solução de reidratação de 2DE para ver se as proteínas iriam adquirir carga negativa suficiente para migrar. Foi adicionado um volume de SDS 30 % suficiente para obter uma concentração final de 5 % de SDS na solução de reidratação. A Figura 14 mostra o mini gel SDS-PAGE de poliacrilamida 10 % utilizando um preparo de amostra de 2DE com a adição de SDS.

A primeira conclusão que se pode verificar foi que não houve, aparentemente, nenhum tipo de degradação entre os diferentes preparos de amostra (quadrado vermelho e azul). Se tivesse ocorrido, seria possível visualizar padrões diferentes de bandas entre as amostras.

Outra observação diz respeito à baixa intensidade das bandas. Apesar de estar com uma quantidade de proteína bem maior (amostras preparadas para 2DE, canaletas 3 a 10) do que a amostra preparada com tampão de amostra para SDS-PAGE (canaleta 2), pode-se supor que a quantidade de SDS adicionadas (aproximadamente 5 %) não foi suficiente para transferir carga para as proteínas

migrarem de forma significativa, ou que as condições da solução de reidratação realmente não foi adequada para um sistema SDS-PAGE.

Figura 14. Gel SDS-PAGE (10 % acrilamida) com diferentes preparos de amostra utilizando solução de reidratação de 2DE. 1) Padrão de massa molecular (97, 66, 45, 30, 20 e 14 kDa). 2) Amostra bruta, sem nenhum tipo de precipitação, só adicionado tampão de amostra de SDS-PAGE. 3) Precipitação com acetona 90 %. 4) Precipitação com clorofórmio/metanol (70:30, v/v). 5) Precipitação com TFA 10 %. 6) Precipitação com TCA 10 %. 7) Precipitação com acetato de amônio. 8) Concentrador centricon com corte de MM de 10 kDa. 9) Concentrador amicon com corte de MM de 10 kDa. 10) Concentrador microcon com corte de MM de 10 kDa.

Outra possibilidade de perda de proteína poderia ter ocorrido durante o processo de preparo de amostra das diversas metodologias, mas isso não deve ser muito significativo já que foram realizados géis 2DE com esses preparos (mostrados na Figura 13) e o número e intensidades dos spots foram mais significativos quando comparado com as bandas da Figura 14.

Assim, pode-se concluir que a solução utilizada para o preparo de amostra para a primeira dimensão de gel 2DE não foi adequado para a realização de SDS-PAGE.

Dessa forma, essa tentativa de comparação não foi adequada, apesar de ter dado um norte e evidências de que a solução de reidratação não interferiu na amostra, ou seja, aparentemente a amostra não sofreu nenhum tipo de degradação devido à utilização da solução de reidratação de 2DE. Assim, os seguintes testes de SDS-PAGE foram realizados com tampão de amostra de SDS-PAGE e os testes com 2DE com solução de reidratação, já que os resultados anteriores mostraram que não foi possível realizar as duas análises com a mesma solução de preparo de amostra.

4.4 – Avaliação de preparos de amostra por SDS-PAGE e *Western Blotting*

A etapa seguinte foi avaliar os diferentes modos de preparo de amostra (utilizados comumente em 2DE), mas utilizando tampão de amostra de SDS-PAGE e aplicados em um mini gel SDS-PAGE de poliacrilamida 10% (procedimento descrito no item 3.6.6). Também foi realizado o preparo de amostra que foi utilizado em SDS-PAGE com amostra bruta, sem nenhum tipo de concentração. Assim, esperava-se que as amostras corressem normalmente num mini gel 1D. O intuito destes testes foi o de determinar o melhor preparo de amostra para dar prosseguimento ao trabalho de análise das isoformas da APP. A idéia foi realizar os diferentes métodos de preparo de amostra, utilizando 1D, em seguida realizar uma eletrotransferência e revelar com os anticorpos específicos. A escolha da melhor metodologia seria determinada com base na densitometria das bandas localizadas, já que não importava se um método apresenta um maior valor de proteína total, o importante seria o método de preparo de amostra apresentasse a maior quantidade da proteína de interesse, o que poderia ser avaliado pela densitometria de bandas.

Depois de precipitadas e concentradas (utilizando os métodos de 2DE) as amostras foram ressuspensas em tampão de amostra da SDS-PAGE, o que garantiu que as amostras corressem. Se houvesse alguma degradação da amostra decorrente dos métodos de preparo de amostra por 2DE, o gel iria denunciar.

Foram realizados dois géis 1D. Um deles foi corado com azul de coomassie e o outro foi submetido a uma eletrotransferência e revelado com os anticorpos específicos (22C11) para APP. A Figura 15 mostra o gel obtido com os diferentes preparos de amostra.

Figura 15. Gel 1D (10 % acrilamida) com os diferentes preparos de amostra. 1) Padrão. 2) Amostra bruta sem sonicar e sem centrifugar. 3) Amostra bruta sonicada e centrifugada. 4) Precipitação com acetona 90%. 5) Precipitação com clorofórmio/metanol (70:30, v/v). 6) Concentrador centricon (corte de MM 10 kDa). 7) Concentrador amicon (corte de MM de 10 kDa). 8) Concentrador microcon (corte de MM de 10 kDa). 9) Precipitação com TCA 10 %. 10) Precipitação com TFA 10 %.

Pode ser verificado que os diferentes métodos de preparo de amostra não foram suficientes para provocar degradações da proteína (ou pode ter ocorrido em todas), o que era de se esperar já que a metodologia aplicada foi branda.

Outro ponto que chamou a atenção foi a perda de proteína entre os diferentes métodos. A canaleta 1 (amostra bruta) apresentava 20 μg de proteína, enquanto que os outros apresentavam 25 μg de proteína, e foi possível visualizar que a canaleta 1 estava mais intensa que os outros métodos, o que também era de se esperar já que quanto maior a manipulação da amostra maior a perda, por mais cuidadosa que seja o preparo. No entanto, o que iria mostrar a melhor condição para a APP (independente se há mais ou menos proteína total) seria o resultado da densitometria de bandas, ela seria capaz de mostrar qual o melhor preparo de amostra especificamente para a APP.

Assim, foi realizada a eletrotransferência das proteínas do segundo gel (que foi corrido simultaneamente com o primeiro), a membrana foi submetida às incubações com os anticorpos primário e secundário (este conjugado com fosfatase alcalina) e revelada com um kit específico para alcalino fosfatase. A Figura 16 mostra o resultado obtido.

Figura 16. Membrana de nitrocelulose revelada com os diferentes preparos de amostra (ver legenda da Figura 15).

O resultado da revelação com anticorpos apresentou um resultado muito diferente do que seria esperado. Os anticorpos revelaram bandas com MM inferior do que o esperado (destacado na Figura 16), que seriam duas bandas de aproximadamente 110 - 130 kDa. Depois do preparo das amostras de pacientes no Hospital das Clínicas em SP, as amostras foram armazenadas à – 80 °C por quatro meses. A primeira suspeita foi de que as amostras haviam degradado e que a quantidade de inibidor de protease adicionada não teria sido suficiente. Sendo assim, novas amostras foram preparadas e um volume maior de inibidor recém adquirido foi adicionado. Outra questão levantada foi de que o anticorpo secundário pudesse reagir com a membrana de nitrocelulose mesmo sem o anticorpo primário, mas essa possibilidade foi descartada devido ao resultado negativo obtido com uma membrana submetida a uma eletrotransferência de proteínas de um gel 1D e revelada somente com o anticorpo secundário. Nova amostra foi preparada com precipitação com acetona e realizado o gel 1D, a eletrotransferência e as diversas incubações com os anticorpos específicos. Novamente, o resultado da membrana mostrou bandas de massa baixa menores que 110 e 130 kDa (Figura 17).

Figura 17. Amostra precipitada com acetona em duplicata (1 e 2) e submetida à eletrotransferência e revelada com anticorpos específicos.

Na Figura 17 as bandas da canaleta 1 foram obtidas de uma amostra preparada com tampão de amostra utilizada no Laboratório de Cristalografia do IFSC (β -mercaptoetanol 15 %, glicerol 30 %, SDS 6 %, azul de bromofenol 0,5 % e tris 2 mol L⁻¹) e as bandas da canaleta 2 foram obtidas utilizando o mesmo tampão de amostra utilizado no LIM 27 do Instituto de Psiquiatria do Hospital das Clínicas (β -mercaptoetanol 12 %, glicerol 10 %, SDS 10 %, azul de bromofenol 0,2 % e tris 0,8 mol L⁻¹).

Outro ponto questionado foi de que essas proteínas de baixa MM seriam pequenos fragmentos resultantes da manipulação da proteína e que possuem o epítopo para o anti APP. Além disso, a malha do gel poderia estar dificultando a migração das frações maiores e elas nem mesmo estariam entrando no gel, assim, apenas os fragmentos menores estariam sendo detectados. Assim, foi preparado novo gel, mas com malha maior (8% acrilamida). Foram preparados dois géis, um gel foi submetido à coração com coomassie e o segundo gel foi submetido ao western blotting e as diversas etapas de incubação com os anticorpos primário e secundário. A Figura 18 mostra o resultado do gel e da membrana já revelada.

Na Figura 18 pode-se verificar que as massas de 110 e 130 kDa entraram no gel e, mais uma vez, as bandas de baixa MM foram localizadas pelos anticorpos na membrana de nitrocelulose (Figura 18C).

Figura 18. Gel 8 % acrilamida corado com coomassie (A e B) e a membrana revelada com os anticorpos específicos para APP após eletrotransferência (C). A amostra PRP foi desnaturada em tampão de amostra de SDS-PAGE, fervida por 5 min e aplicada em duplicatas no mesmo gel.

4.5 – Estudo da influência da temperatura nos preparos de amostra

A temperatura também foi uma das variáveis estudadas neste trabalho. O processo de preparo de amostra para SDS-PAGE consistiu, após a adição do tampão de amostra, em aquecer a amostra por 5 min à aproximadamente 100 °C. O melhor preparo de amostra escolhido inicialmente pela técnica de SDS-PAGE ainda deveria passar por algumas adaptações antes de serem realizados os ensaios por 2DE, tais como: a mudança do tampão de amostras para a solução de reidratação (que não deve conter SDS) e a etapa de fervura deveria ser eliminada já que a solução de reidratação contém uréia que degrada em temperaturas elevadas gerando cianatos e, estes por sua vez, introduzem modificações pós traducionais nas proteínas em estudo. Assim, a verificação da influência da temperatura no comportamento das proteínas seria um fator bastante pertinente. Apesar da etapa

de fervura ser um procedimento corriqueiro em análises por SDS-PAGE, cada proteína se comporta de uma maneira diferente e como em 2DE a amostra não deve ser fervida com uréia, novos testes foram realizados com a etapa de fervura (adição do tampão de amostra e em seguida fervido por 5 min) e sem a etapa de fervura (apenas adição do tampão de amostra).

Foi realizado um SDS-PAGE (10% acrilamida) com amostra de indivíduos com DA e sadios. Foram realizados dois géis com as mesmas amostras e mesmas condições, sendo que 1 gel foi corado com coomassie e o outro submetido à uma eletrotransferência. A amostra do paciente com DA apresentou um valor de 2,38 mg mL⁻¹ e a amostra do indivíduo sadio um valor de 2,16 mg mL⁻¹ de proteína total. Foi aplicado no gel um volume de amostra correspondente a aproximadamente 23 µg de proteína total.

A Figura 19 mostra o gel corado com coomassie. Aparentemente, as bandas que aparecem em todos os preparos de amostra são iguais, exceto por uma banda que aparece nas amostras fervidas e localizada entre 45 e 66 kDa. Na Figura 19B é possível observar o surgimento de uma banda quando a amostra foi submetida à etapa de fervura (quadrado vermelho). As bandas do segundo gel foram submetidas à eletrotransferência como mostra o resultado da revelação na Figura 19C e pode ser comparado com o segundo gel obtido sob as mesmas condições.

Na membrana de nitrocelulose (Figura 19C) foi possível verificar que surgiu uma banda imunorreativa entre 45 e 66 kDa (como destacado na Figura 19B pelo quadrado vermelho) para as amostra fervidas tanto do paciente quanto para a do indivíduo sadio. Se o anticorpo localizou essa banda, então isso só pode ser decorrente do processo de degradação da amostra devido ao aquecimento, já que a mesma não apareceu na amostra não fervida. Pode-se notar também que as bandas

marcadas com um quadrado azul na Figura 19B foram transferidas e localizadas pelo anticorpo primário, no entanto, elas estão mais intensas nas amostras fervidas. O padrão obtido na Figura 19C para as amostras 2 e 4, são os mesmos que foram obtidos nas análises anteriores.

Figura 19. Gel de SDS-PAGE (10 % acrilamida) mostrando o efeito do aquecimento sobre a APP. As canaletas 2 e 4 correspondem às amostras fervidas; as canaletas 3 e 5 correspondem às amostras NÃO fervidas. A figura B é o mesmo gel da figura A, mas destacando algumas bandas. A figura C representa a membrana de nitrocelulose mostrando o resultado da eletrotransferência. 1) Padrão de MM (45, 66, 97 e 116 kDa). 2) Amostra do indivíduo sadio fervida por 5 min com tampão de amostra contendo β -mercaptoetanol. 3) Amostra do indivíduo sadio NÃO fervida, apenas adicionado tampão de amostra contendo β -mercaptoetanol. 4) Amostra do paciente 2 fervida por 5 min com tampão de amostra contendo β -mercaptoetanol. 5) Amostra do paciente 2 NÃO fervida, apenas adicionado tampão de amostra contendo β -mercaptoetanol.

As bandas marcadas com um quadrado amarelo na Figura 19B, mostra as bandas correspondentes às bandas reveladas na Figura 19C (entre 97 e 116 kDa) para as amostras 3 e 5 que correspondem às amostras não fervidas revelaram as bandas correspondentes às isoformas da APP.

Na Figura 19B também foram selecionadas umas bandas acima de 116 kDa (quadrado verde) que inicialmente seriam as bandas de interesse, no entanto, as bandas reveladas pelo anticorpo estiveram mais próximas de 116 kDa, o que elimina a hipótese de as bandas superiores serem as bandas de interesse.

4.6 – Amostra de PRP preparada e de outro voluntário utilizando metodologia diferente de preparo de amostra

Para verificar se o preparo de amostra de PRP, ou até mesmo as amostras, estava influenciando no preparo de amostra, foram utilizadas amostras de PRP provenientes de outro indivíduo sadio e preparadas por outra aluna de pós-graduação (Msc Sheila Barreto Guterres) utilizando um método de preparo de PRP para estudos de PLA2. A Msc Sheila tem como objetivo estudar a atividade de um grupo de proteínas transmembrana (PLA2) de plaquetas. Portanto, o preparo de amostra utilizado para esse estudo (detalhadamente descrito no apêndice 3) difere do método utilizado para o estudo de APP, no entanto, ambos os métodos são voltados para a obtenção de PRP. A amostra preparada para o estudo de PLA2 estava em meio Tris-sacarose, com o intuito de manter a integridade das plaquetas, dessa forma, esperava-se que a amostra não estivesse degradada.

A dosagem de proteína total na amostra do paciente foi de $2,38 \text{ mg mL}^{-1}$ e na do indivíduo sadio foi de $1,4 \text{ mg mL}^{-1}$. Assim, foi adicionado um volume de amostra correspondente a $15 \text{ } \mu\text{g}$ de proteína total tanto do paciente como do indivíduo sadio.

Essa quantidade de proteína total foi considerada devido à limitação do volume de amostra que é possível colocar na canaleta do gel SDS-PAGE.

As amostras foram descongeladas e em seguida, adicionadas o tampão de amostra com β -mercaptoetanol em um volume necessário de amostra para obter 15 μ g de proteína total. O tampão de amostra foi adicionado de forma a obter uma diluição final de três vezes. A Figura 20 mostra o gel obtido com as amostras fervidas e não fervidas.

Figura 20. Gel de poliacrilamida 10 % com amostra fervida e não fervida (A) e a eletrotransferência (B). 1) Padrão de massa molecular (45, 66, 97, 116 kDa). 2) Amostra de paciente fervida por 5 min após adição de tampão de amostra com β -mercaptoetanol. 3) Amostra de paciente não fervida após adição de tampão de amostra com β -mercaptoetanol. 4) Amostra do indivíduo sadio fervida por 5 min após adição de tampão de amostra com β -mercaptoetanol. 5) Amostra do indivíduo sadio não fervida após adição de tampão de amostra com β -mercaptoetanol.

Na Figura 20A é possível verificar o surgimento de uma banda (quadrado vermelho) quando a amostra é fervida (canaleta 2), enquanto que na amostra não fervida, nesta mesma posição há uma banda com intensidade muito baixa. As

demais bandas, aparentemente não mudaram quando comparadas com as amostras submetidas à etapa de fervura e não fervura.

A Figura 20B mostra o resultado da eletrotransferência de um segundo gel que foi realizado simultaneamente ao gel mostrado na Figura 20A. É possível verificar que as bandas de baixa MM (< 40 kDa) surgiram nas quatro canaletas. Sendo que para as amostras do indivíduo sadio (canaletas 4 e 5) a intensidade foi baixa.

Outro ponto importante foi a banda indicada com o quadrado vermelho nas Figuras 20A e 20B. Na Figura 20A pode-se verificar que para a amostra fervida (canaleta 2) surge uma banda que não aparece quando a amostra não é fervida (canaleta 3) e essa banda adicional foi transferida e localizada pelo anticorpo monoclonal 22C11, como pode ser verificado na Figura 20B. Esse padrão de duas bandas com MM menores que 110 e 130 kDa coincide com os resultados que foram obtidos antes das comparações entre amostras fervidas e não fervidas. As Figuras 17 e 18C mostram uma membrana de nitrocelulose na qual foram transferidas as proteínas de plaquetas separadas por SDS-PAGE. A comparação entre as Figuras 19C e 20B indica que as bandas marcadas com um quadrado amarelo e vermelho para as amostras fervidas (canaleta 2) coincidem. Em ambas as figuras (19C e 20B) as amostras foram fervidas por 5 min com tampão de amostra contendo β -mercaptoetanol. A banda indicada por um quadrado azul que aparece nas amostras não fervidas (canaletas 3 e 5) estão próximas de 97 e 116 kDa e, correspondem às MM das isoformas de interesse.

Na Figura 20 também estão destacadas as bandas maiores que 116 kDa (quadrado verde), que talvez poderiam ser as bandas de interesse, mas não foram localizadas pelo anticorpo e estão presentes nas amostras fervidas e não fervidas.

O protocolo que a MSc. Sheila utilizou para preparo de PRP não foi adequado para análise da APP, já que este protocolo foi otimizado para a determinação de proteínas relacionadas ao metabolismo de fosfolipídios (atividade da PLA2) e difere do protocolo utilizado para a obtenção da APP a partir de PRP. No entanto, foi possível verificar que quando sua amostra foi fervida, as bandas na região de 116 kDa não foram localizadas através da revelação pelo anticorpo monoclonal 22C11, mas uma leve mancha foi visível nessa região quando a amostra não foi fervida (devido ao fato de o preparo de PRP utilizado não ter sido o mais adequado para o estudo de APP).

4.7 – Preparo de amostras PRP sem a etapa de fervura

Baseando-se nestes resultados, foram realizados os diversos preparos de amostra utilizados em análises por eletroforese bidimensional (2DE) novamente, mas retirando a etapa de fervura que precede a aplicação no gel. Novamente, foram testados os métodos de precipitações (acetona 90 %, clorofórmio/metanol 70:30 v/v, ácido trifluoracético 10 % e ácido tricloroacético 10%) e concentradores (amicon, centricon e microcon todos com corte de 10 kDa), como descrito no item 3.6 do procedimento experimental.

Para todos os preparos de amostra foi utilizado uma amostra com valor de proteína total $2,16 \text{ mg mL}^{-1}$. Para todas as precipitações e concentradores, foi utilizado um volume de amostra correspondente a 50 μg de amostra, exceto a amostra bruta (PRP sem nenhum tratamento prévio) que por razões de capacidade de introdução de volume de amostra na canaleta do gel SDS-PAGE apresentou 37 μg de proteína total.

As amostras foram ressuspensas em 20 μ L de tampão de amostra para SDS-PAGE. Então, a amostra foi dividida e 10 μ L foi aplicado num gel SDS-PAGE, que foi corado com coomassie, e os outros 10 μ L da amostra foi aplicado num segundo gel que, posteriormente, foi submetido a uma eletrotransferência para uma membrana de nitro celulose.

No caso dos concentradores, em cada concentrador foi adicionado 40 μ L de amostra bruta (plasma rico em plaquetas) e os volumes foram reduzidos até 10 μ L. Neste volume foi adicionado 5 μ L de tampão de amostra para SDS-PAGE, resultando num volume total de 15 μ L. Esse volume resultante foi dividido, sendo que 7,5 μ L foi aplicado em um gel que posteriormente foi submetido à coração com coomassie; os outros 7,5 μ L foram aplicados em um segundo gel e, este foi submetido à uma eletrotransferência.

A Figura 21 mostra o gel corado com coomassie. Nesta figura, é possível verificar que na região de 116 e 97 kDa, os preparos de amostra de 5 a 9 não foram adequados. Visualmente, é possível notar que há uma perda significativa de proteínas nesta região para esses preparos de amostra.

Figura 21. Gel SDS-PAGE (10 % acrilamida) com vários preparos de amostra, sem a etapa de fervura. 1) Padrão de MM. 2) Amostra bruta (plasma rico em plaquetas).

3) Amostra precipitada com acetona 90 %. 4) Amostra precipitada com uma solução clorofórmio/metanol (70:30, v/v). 5) Amostra precipitada com TFA 10%. 6) Amostra precipitada com TCA 10%. 7) Amostra concentrada com concentrador do tipo microcon (corte de MM de 10 kDa). 8) Amostra concentrada com concentrador do tipo amicon (corte de MM de 10 kDa). 9) Amostra concentrada com concentrador do tipo centricon (corte de MM de 10 kDa).

Em um primeiro momento os preparos de amostra de 5 a 9 já poderiam ser descartados. No entanto, para uma maior segurança para escolher o melhor método, foi realizado um *western blotting*. Este teste confirmou a perda significativa das proteínas alvo para os preparos de amostra de 5 a 9, quando avaliados os valores de densitometria de bandas. A figura da membrana revelada não pôde ser apresentada porque a revelação com peroxidase conjugada com o anticorpo secundário não mostra manchas escuras como quando é utilizado alcalino fosfatase conjugado ao anticorpo secundário. De todos os modos de preparo de amostra, somente foi possível medir a densitometria de bandas da amostra PRP e da precipitação com acetona 90 % (Tabela 4).

Tabela 4. Valores de densitometria obtidos da membrana com vários preparos de amostra.

Banda do gel (kDa)	Valor de densitometria	
	Amostra PRP	Amostra precipitada com acetona 90 %
130	4212	5616
110	4212	2808

Assim, os melhores preparos de amostra encontrados são para a amostra sem nenhum tipo de tratamento prévio (amostra rica em plaquetas), para a amostra precipitada com acetona 90% e, apesar de não ter sido possível detectar as bandas

das proteínas desejadas na precipitação com clorofórmio/metanol (70:30, v/v), o gel SDS-PAGE mostrou um bom resultado (comparado com as amostras precipitadas com acetona e amostra bruta), assim, a precipitação com clorofórmio/metanol (70:30, v/v) também foi submetida aos testes subseqüentes.

As bandas de baixa MM observadas devido à etapa de fervura foram submetidas a uma eletrotransferência e posterior análise de aminoácidos N-terminais por química degradativa de Edman. No entanto, o resultado não foi satisfatório e nenhum aminoácido pôde ser identificado, mesmo depois de algumas tentativas de concentração de proteínas. As bandas de baixa MM deveriam passar por processos de purificação e concentração para a obtenção de um resultado que poderia indicar se as bandas de baixa MM eram provenientes de degradação das isoformas da APP. Apenas uma simples separação por SDS-PAGE não foi suficiente para a obtenção de um resultado confiável. Como essa etapa iria exigir um trabalho mais bem planejado, esta investigação ficará para as etapas futuras de um possível projeto de doutorado que dará continuidade a este trabalho e, certamente, retomará esta questão mais detalhadamente.

Uma segunda metodologia comumente aplicada no preparo de amostras de proteínas é a lise por ultra-som. Assim, as três melhores condições de preparo de amostra para APP foram submetidas a uma lise por ultra-som. Inicialmente, foi realizado um ensaio de proteína total pelo método de Bradford para verificar se a etapa de sonicação realizada antes de cada condição de preparo de amostra aumentaria a quantidade de proteína total. Assim, foi adicionado solução de lise (uréia 7 mol L⁻¹, tiouréia 2 mol L⁻¹ e CHAPS 4 %) e a mistura foi submetida à seis ciclos de sonicação (15 s ligado, 45 s desligado) antes das precipitações. Os pellets foram ressuspensos em solução de reidratação para a focalização isoeletrica

(primeira dimensão) do 2DE e a quantidade de proteína quantificada pelo método de Bradford. A Tabela 5 sumariza os resultados alcançados mostrando que a sonicação aumentou a quantidade de proteínas extraída do PRP.

Tabela 5. Valores de absorbância obtidos e os valores das concentrações calculadas de proteína total.

Amostra	Amostra sonicada		Amostra não sonicada	
	Absorbância (595 nm)	Concentração (mg mL ⁻¹)	Absorbância (595 nm)	Concentração (mg mL ⁻¹)
Bruta	0,194	0,650	0,189	0,631
Precipitada com acetona 90 %	0,164	0,544	0,119	0,390
Precipitada com clorofórmio/metanol	0,128	0,420	0,090	0,290

Com as condições de amostras sonicadas e não sonicadas foram realizados géis 2DE. A Figura 22 mostra os géis 2DE obtidos para cada condição de precipitação, exceto para a amostra bruta devido à diluição ocasionada pela solução de lise.

Os géis confirmaram o resultado obtido pelas medidas de proteína total por Bradford (Tabela 5), no qual a quantidade de proteína total para as amostras submetidas a uma etapa de ultra-som é maior. Visivelmente, a amostra precipitada com acetona sofre grande influência por essa etapa, o que pode ser verificado comparando os géis com amostra não lisada com ultra-som e, em seguida precipitada com acetona 90% (Figura 22B), com a amostra submetida a uma etapa de lise com ultra-som seguida de precipitação com acetona 90% (Figura 22D).

Figura 22. Géis 2DE (10 % acrilamida) de amostra diferentes. Amostras não lisadas: A) Amostra bruta, B) Amostra precipitadas com acetona, C) Amostra precipitada com

clorofórmio/metanol. Amostras lisadas com ultra-som: D) Amostra precipitada com acetona, E) Amostra precipitada com clorofórmio/metanol.

Como as condições de amostra lisada com ultra-som e precipitada com acetona e a amostra bruta não lisada apresentaram os melhores resultados nas análises por blotting e 2DE, essas duas condições serão submetidas a um segundo estudo por blotting para saber a localização das isoformas da APP no gel 2DE e, subsequentemente, serem submetidas à uma digestão triptica e identificação por MS.

5 – Conclusões

O desenvolvimento de metodologias bioanalíticas voltadas para o diagnóstico precoce da DA apresentou-se, no decorrer deste trabalho, ser uma tarefa bastante desafiadora. Devido às dificuldades que surgiram durante a etapa de preparo de amostra. O trabalho original que consistia em separar as isoformas e posterior sequenciamento por MS/MS tornou-se inviável para um projeto de mestrado. Assim, o foco do trabalho voltou-se em desenvolver uma sistemática analítica que abrangesse todas as possibilidades de interferentes durante essa importante etapa do estudo.

A primeira linha de desenvolvimento da etapa de preparo de amostra consistiu em selecionar as metodologias mais empregadas em estudos proteômicos (precipitações com solventes orgânicos, sais e ácidos, assim como a utilização de concentradores) e realizar géis 2DE. Nesta primeira etapa, foi possível descartar os preparos de precipitações com sais devido à alta corrente gerada durante a focalização isoeletrica (mesmo depois de ciclos de lavagem). Além disso, a introdução de vários ciclos de lavagem torna-se pouco atrativo quando se trabalha com analitos de baixa concentração.

A etapa seguinte consistiu em utilizar uma técnica mais prática que é o SDS-PAGE. Com o SDS-PAGE foi possível realizar inúmeros testes de preparo de amostra e, através da densitometria de bandas foi possível avaliar a perda da proteína alvo depois de uma eletrotransferência e revelação com os anticorpos monoclonais. Nestes testes foi possível concluir que o preparo de amostras do SDS-PAGE e 2DE não podem ser trocados, já que o tampão do SDS-PAGE possui SDS que é um detergente que apresenta carga negativa (que interfere na focalização

isoelétrica do 2DE). Por outro lado, o tampão utilizado no preparo de amostra do 2DE não apresenta SDS, o que impossibilitou a migração das proteínas no SDS-PAGE. Assim, a tentativa de não alterar significativamente as condições entre 2DE e SDS-PAGE não foi viável.

Foram realizados diversos tipos de preparo de amostra em SDS-PAGE e revelados com anticorpo. Essas amostras foram preparadas seguindo o protocolo comumente utilizado para SDS-PAGE, incluindo uma etapa de fervura. Os géis mostraram visualmente as mesmas bandas para todos os tipos de preparos (exceto por algumas distorções do gel para as precipitações com ácidos). A revelação com anticorpo mostrou para todos os preparos de amostra duas bandas de MM inferior ao que o esperado. Na tentativa de encontrar a fonte da possível degradação da APP, que poderia ser no preparo do PRP, foram analisadas amostras de PRP provenientes de outra fonte e preparadas por outro químico analítico (Msc Sheila). Além disso, o preparo de PRP utilizado foi diferente (desenvolvido para PLA2). De alguma forma, todas as amostras estavam passando por alguma etapa que resultava nas bandas de MM inferior. Por isso, outra variável testada foi a retirada da etapa de fervura. Assim, foi possível comparar outra forma de preparo de PRP e o comportamento da APP quando as amostras são fervidas e não fervidas. Neste teste foi possível verificar o comportamento anômalo da APP (bandas de MM inferior) quando as amostras foram fervidas e para as amostras não fervidas foi identificado as bandas em torno de 110 kDa para ambos os tipos de preparo de amostra. Com isso, pode-se concluir que a degradação não estava relacionada ao tipo de preparo de amostra utilizado já que as bandas de MM inferior surgiram em ambos os tipos de preparo de amostra, mas sim à etapa de fervura. Esta etapa foi realizada inúmeras vezes para confirmar tal fato e a foi possível verificar as bandas

de MM inferior para as amostras fervidas e as bandas em torno de 110 e 130 kDa (como esperado inicialmente) quando foi realizada a revelação com o anticorpo monoclonal. Nos géis de SDS-PAGE foi possível verificar visualmente o surgimento de bandas entre 45 e 66 kDa quando a amostra foi submetida à uma etapa de fervura e, que correspondem às bandas de MM inferior reveladas com o anticorpo. Quando as amostras não foram fervidas essas bandas de MM baixa (entre 45 e 66 kDa) não surgiram e quando foi realizada a eletrotransferência a revelação com anticorpos mostra as bandas de MM perto de 116 kDa.

Depois de encontrada a fonte de interferência, foi novamente realizada uma SDS-PAGE com os diversos preparos de amostra, mas sem a última etapa de fervura. A revelação com o anticorpo e os valores da densitometria de bandas mostrou que o melhor preparo de amostra é quando a amostra é aplicada bruta e quando a amostra é lisada por sonicação e precipitada com acetona 90 %. A precipitação da amostra com acetona não lisada se mostrou pouco robusta como mostra a Figura 22B.

A quantificação de proteína total por Bradford, apesar de não dar nenhum indicativo da abundância da APP, mas sim de proteína total, confirmou que a lise por ultrassom resulta em um aumento de proteína total, o que diretamente afeta o resultado do 2DE. Notou-se também o aumento de proteínas na região de pI 4,5 – 5,5 e MM de aproximadamente 110 kDa que corresponde à região das isoformas de interesse nos géis 2DE. Como esperado, a quantificação de proteína total por Bradford não seria uma alternativa adequada para a escolha do melhor preparo de amostra. Pelos valores mostrados na Tabela 5, a precipitação com clorofórmio/metanol (70:30, v/v) também seria um bom método de concentração de proteína, no entanto, a medida de densitometria de bandas mostrou que para este

tipo de precipitação a perda das isoformas da APP é muito significativa, apesar de o resultado de proteína total ser relativamente bom. As melhores condições de preparo de amostra não foram testadas no 2DE e reveladas com o anticorpo devido ao atraso na aquisição do anticorpo e à necessidade de finalizar o curso.

Com o surgimento de diversos imprevistos durante o decorrer deste trabalho, o objetivo inicial tornou-se inviável para dois anos de mestrado. Sendo assim, a continuidade deste trabalho poderá ocorrer em um possível projeto de doutorado no qual poderá ser realizada a identificação das isoformas solúveis da APP. Desta forma, será possível investigar a relação entre as amostras oriundas de PRP de pacientes e indivíduos sadios (controles), buscando por biomarcadores que possam ser utilizados em metodologias analíticas de diagnóstico, inclusive com a seleção de um padrão interno para o PRP.

6 - Referências bibliográficas

AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature**, v. 422, n. 6928, p. 198–207, 2003.

ALMEIDA, O. P. Biologia molecular da doença de Alzheimer: uma luz no fim do túnel? **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n.1, p. 77-81, 1997.

ANDREASEN, N.; BLENNOW, K. β – amyloid ($A\beta$) protein in cerebrospinal fluid as a biomarker for Alzheimer's disease. **Peptides**, v. 23, p.1205–1214, 2002.

ATKINSON, A. J.; COLBURN, W. A.; DEGRUTTOLA, V. G.; DEMETS, D. L.; DOWNING, G. J.; HOTH, D. F.; OATES, J. A.; PECK, C. C.; SCHOOLEY, R. T.; SPILKER, B. A.; WOODCOCK, J.; ZEGER, S. L. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 69, n. 3, p. 89-95, 2001.

BAE, S. H.; HARRIS, A. G.; HAINS, P. G.; CHEN, H.; GARFIN, D. E.; HAZELL, S. L.; PAIK, Y. K.; WALSH, B. J.; CORDWELL, S. Strategies for the enrichment and identification of basic protein in proteome projects. **Journal of Proteomics**, v. 3, n. 5, p. 569, 2003.

BECKER, M.; SCHINDLER, J.; NOTHWANG, H. G. Neuroproteomics – the tasks lying ahead. **Electrophoresis**, v. 27, n. 13, p. 2819-2829, 2006.

BERKELMAN, T.; STENSTEDT, T. **2-D electrophoresis: principles and methods**. Uppsala: Amersham Biosciences, 2001. 100 p.

BLONDER, J.; GOSHE, M. B.; MOORE, R. J.; PASA-TOLIC, L. MASSELON, C. D.; LIPTON, M. S.; SMITH, R. D. Enrichment of integral membrane proteins for proteomic analysis using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Proteome Research**, v. 1, p. 351-360, 2002.

BUSH, A. I.; TANZI, R. E. Alzheimer disease-related abnormalities of amyloid β precursor protein isoforms in the platelet. **Archives of Neurology**, v. 55, n. 9, p. 1179–1180, 1998.

BUXBAUM, J. D.; LIU, K. N.; LIO, Y.; SLACK, J. L.; STOCKING, K. L.; PESCHON, J. J.; JOHNSON, R. S.; CASTERN, B. J.; CERRETTI, D. P.; BLACK, R. A. Evidence that tumor necrosis factor α converting enzyme is involved in regulated α -secretase cleavage of the Alzheimer amyloid precursor protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 43, p. 27765–27767, 1998.

CAPELL, A.; BEHER, D.; PROKOP, S.; STEINER, H.; KAETHER, C.; SHEARMAN, M. S.; HAASS, C. γ -secretase complex assembly within the early secretory pathway. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 8, p. 6471–6478, 2005.

CARAMELLI, P.; NITRINI, R. Conduta diagnstica em demncia. In: FORLENZA, O. V., ALMEIDA, O. P., (Ed.). **Depresso e demncia no idoso**. So Paulo: Lemos, 1997. v. 1, p. 107–119.

CATTEBENI, F.; COLCIAGHI, F.; DI LUCA, M. Platelets provide tissue to unravel pathogenic mechanisms of Alzheimer disease. **Progress in Neuro - Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 28, n. 5, p. 763–770, 2004.

CHAMRAD, D. C.; KORTING, G.; STUHLER, K.; MEYER, H. E.; KLOSE, J.; BLUGGEL, M. Evaluation of algorithms for protein identification from sequence databases using mass spectrometry data. **Proteomics**, v. 4, n. 3, p. 619-628, 2004.

CLARK, R. F.; GOAT, A. M. Molecular genetics of Alzheimer's disease. **Archives of Neurology**, v. 50, n. 11, p. 1164-1172, 1993.

COLCIAGHI, F.; MARCELLO, E.; BORRONI, B.; ZIMMERMANN, M.; CALTAGIRONE, C.; CATTABENI, F.; PADOVANI, A. Di LUCA, M. Platelet APP, ADAM 10 and BACE alterations in the early stages of Alzheimer's disease. **Neurology**, v. 62, p. 498-501, 2004.

CULVENOR, J.; ILAYA, N. T.; RAYAN, M. T.; CANTERFORD, L.; HOKE, D. E.; WILLIAMSON, N. A.; MASTERS, C. L.; Evin, G. Characterization of presenilin complexes from mouse and human brain using Blue Native gel electrophoresis reveals high expression in embryonic brain and minimal change in complex mobility with pathogenic presenilin mutations. **European Journal of Biochemistry**, v. 271, n. 2, p. 375-385, 2003.

DALY, I. V. J.; LAHIRI, D. K.; JUSTUS, D. E.; KOTWAL, G. J. Detection of the membrane-retained carboxy-terminal tail containing polypeptides of the amyloid precursor protein in tissue from Alzheimer's disease brain. **Life Science**, v. 63, p. 2121-2131, 1998.

Di LUCA M, COLCIAGHI F, PASTORINO L, BORRONI B, PADOVANI A, CATTABENI F. Platelets as a peripheral district were to study pathogenetic mechanisms of Alzheimer disease: the case of amyloid precursor protein. **European Journal of Pharmacology**, v. 405, n. 1–3, p. 277–283, 2000.

Di LUCA M, GROSSI E, BORRONI B, ZIMMERMANN M, MARCELLO E, COLCIAGHI F, GARDONI F, INTRALIGI M, PADOVANI A, BUSCEMA M. Artificial neural networks allow the use of simultaneous measurements of Alzheimer Disease markers for early detection of the disease. **Journal of Translational Medicine**, v. 3, n. 30, p. 1–7, 2005.

Di LUCA M, PASTORINO L, BIANCHETTI A, PEREZ J, VIAGNOLO LA, LENZI GL, TRABUCCHI M, CATTEBENI F, PADOVANI A. Differential Level of Platelet Amyloid β Precursor Protein Isoforms: An Early Marker for Alzheimer Disease. **Archives of Neurology**, v. 55, n. 9, p. 1195–1200, 1998.

DOMON, B.; AEBERSOLD, R. Mass spectrometry and protein analysis. **Science**, v. 312, n. 5771, p. 212-217, 2006.

DREGER, M. Proteome analysis at the level of subcellular structures. **European Journal of Biochemistry**, v. 270, n. 4, p. 589-599, 2003.

DREGER, M.; BENGTSSON, L.; SCHONEBERG, T.; OTTO, H.; HUCHO, F. Nuclear envelope proteomics: novel integral membrane proteins of the inner nuclear membrane. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 21, p. 11943–11948, 1998.

ELIAS, J. E.; HAAS, W.; FAHERTY, B. H.; GYGI, S. P. Comparative evaluation of mass spectrometry platforms used in large scale proteomics investigations. **Nature Methods**, v. 2, n. 9, p. 667-675, 2005.

ENG, J. K.; MCCORMACK, A. L.; YATES, J. R. An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acids sequences in a protein database. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 5, n. 11, p. 976-989, 1994.

FELICE, F. G.; FERREIRA, S. T. Beta-amyloid production, aggregation and clearance as targets for therapy in Alzheimer's. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 24, n. 5-6, p. 545–563, 2002.

FOLSTEIN, M. F.; FOLSTEIN, S. E.; MCHUGH, P. R. "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. **Journal of Psychiatric Research**, v. 12, n. 3, p. 189–198, 1975.

FOUNTOULAKIS, M.; JURANVILLE, J. F.; RODER, D.; EVERS, S.; BERNDT, P.; LANGEN, H. Proteomics and two dimensional electrophoresis reference map of the low molecular mass protein of Haemophilus influenzae. **Electrophoresis**, v. 19, n. 10, p. 1819-1827, 1998.

FRANCIS, P.; PALMER, A. M.; SNAPE, M.; WILCOCK, G. K. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. **Journal of Neurology and Neurosurgery Psychiatry**, v. 66, p. 137–147, 1999.

GARCIA, A.; PRABHAKAR, S.; BROCK, C. J.; PEARCE, A. C.; DWEK, R. A.; WATSON, S. P.; HEBESTREIT, H. F.; ZITZMANN, N. Extensive analysis of the human platelet proteome by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. **Proteomics**, v. 4, n. 3, p. 656-668, 2004.

GUILLEMIN, I.; BECKER, M.; OCIEPKA, K.; FRIAUF, E.; NOTHWANG, H.G. A subcellular prefractionation protocol for minute amounts of mammalian cell cultures and tissue. **Proteomics**, v. 5, n. 1, p. 35–45, 2005.

GYGI, S. P.; CORTHALS, G. L.; ZHANG, Y.; ROCHON, Y.; AEBERSOLD, R. Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis based proteome analysis technology. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 17, p. 9390-9395, 2000.

HAASS, C. Take five-Bace and the γ -secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid β -peptide generation. **The EMBO Journal**, v. 23, n. 3, p. 483–488, 2004.

HAMPEL, H.; TEIPEL, S. J.; FUCHSBERGER, T.; ANDREASEN, N.; WILTFANG, J.; OTTO, M.; SHEN, Y.; DODEL, R.; DU, Y.; FARLOW, M.; MÖLLER, H. J.; BLENNOW, K.; BUERGER, K. Value of CSF beta-amyloid1-42 and tau as predictors of Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment. **Molecular Psychiatry**, v. 9, n. 7, p. 705–710, 2004.

HANCOCK, W. S. What is new in proteomics? Biomarkers. **Journal of Proteome Research**, v. 2, n. 5, p. 457, 2003.

HELLING S.; SCHMITT, E.; JOPPICH, C.; SCHULENBORG, T.; MÜLLNER, S.; FELSKÉ-MÜLLER, S.; WIEBRINGHAUS, T.; BECKER, G.; LINSSENMAN, G.; SITEK, B.; LUTTER, P.; MEYER, H. E.; MARCUS, K. 2-D differential membrane proteome analysis of scarce protein samples. **Proteomics**, v. 6, n. 16, p. 4506-4513, 2006.

HOEHN, G. T.; SUFFERDINI, A. F. Proteomics. **Critical Care Medicine**, v. 33, p. s444-s448, 2005.

INTRODUCTION to antibodies. 2 ed. Temecula: Chemicon International, [200-]. p. 10. (Código 1230-0504).

IRIZARRY, M. C. Biomarkers of Alzheimer Disease in plasma. **The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics**, v. 1, n. 2, p. 226–234, 2004.

JACKOWSKI, G.; PIELUCHA, K. Heterogeneity of the main light-harvesting chlorophyll a/b–protein complex of photosystem II (LHCII) at the level of trimeric. Subunits. **Journal of Photochemistry and Photobiology B**, v. 64, n. 1, p. 45-54, 2001.

JIANG, L.; HE, L.; FOUNTOULAKIS, M. Comparison of protein precipitation methods for sample preparation prior to proteomics analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1023, n. 2, p. 317-320, 2004.

KIMBALL, D. B.; CASTEGNA, A.; SULTANA, R.; POON, H. F.; PETROZE, R.; LYN, B. C.; BUTTERFIELD, D. A. Proteomic identification of proteins oxidized by A β (1-42) in synaptosomes: Implications for Alzheimer's disease. **Brain Research**, v. 1044, n. 2, p. 206-215, 2005.

KOO, E. H. The β -amyloid precursor protein (APP) and Alzheimer's disease: Does the tail wag the dog? **Traffic**, v. 3, p. 763–770, 2002.

KRZYSIK, A. B.; KANG, S. U.; SILBERRING, J.; LUBEC, G. Mass spectrometrical identification of brain proteins including highly insoluble and transmembrane proteins **Neurochemistry International**, v. 49, n. 3, p. 245-255, 2006.

KULAKOWSKA, A. B.; KRZYNSKA, A. B.; DYLAG, T.; DRABIK, A.; SUDER, P.; NOGA, M.; JARZEBINSKA, J.; SILBERRING, J. Methods for sample preparation in proteomic research. **Journal of Chromatography B**, v. 849, n. 1, p. 1-31, 2007.

LAMMICH S, KOJRO E, POSTINA R, GILBERT S, PFEIFFER R, JASIONOWSKI M, HAASS C, FAHRENHOLZ F. Constitutive and regulated α -secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease.

Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 96, n. 7, p. 3922–3927, 1999.

LEFKOVITS, I. Functional and structural proteomics: a critical appraisal. **Journal of Chromatography B**, v. 787, n. 1, p. 1-10, 2003.

LEIMGRUBER, R.; MALONE, J. P.; RADABAUGH, M. R.; LAPORT, M. L.; VIOLAND, B. N.; MONAHAN, J. B. Development of improved cell lysis, solubilization and imaging approaches for proteomic analyses. **Proteomics**, v. 2, n. 2, p. 135-144, 2002.

LIEBOLD, B. W.; GRAACK, H. R.; POHL, T. Two-dimensional gel electrophoresis as tool for proteomics studies in combination with protein identification by mass spectrometry. **Proteomics**, v. 6, n. 17, p. 4688 - 4703, 2006.

LINK, A. J.; FLEISCHER, T. C.; WEAVER, C. M.; GERBASI, V. R.; JENNINGS, J. L. Purifying protein complexes for mass spectrometry: applications to protein translation. **Methods**, v. 35, n. 3, p. 274-290, 2005.

LIPPINCOTT, J.; APOSTOL, I. Carbamylation of Cysteine: A Potential Artifact in Peptide Mapping of Hemoglobins in the Presence of Urea. **Analytical Biochemistry**, v. 267, n. 1, p. 57-64, 1999.

LOVEMAN, E; GREEN, C; KIRBY, J; TAKEDA, A; PICOT, J; PAYNE, E; CLEGG, A. The clinical and cost-effectiveness of donepezil, rivastigmine, galantamine and memantine for Alzheimer's disease. **Health Technology Assessment**, v. 10, n. 1, p. 1–160, 2006.

MARVIN, L. F.; ROBERTS, M. A.; FAY, L. B. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in clinical chemistry. **Clinica Chimica Acta**, v. 337, n. 1–2, p. 11-21, 2003.

MOHS, R. C.; HAROUTUNIAN, V. Alzheimer disease: from earliest symptoms to end stage. In: Davis KL, Charney D, Coyle JT, Nemeroff C, editors. *Neuropsychopharmacology: The fifth generation of progress*. **American College of Neuropsychopharmacology**, p. 1189–1197, 2002.

MOLLOY, M. P.; HERBERT, B. R.; WALSH, B. J.; TYLER, M. I. Extraction of membrane proteins by differential solubilization for separation using two dimensional gel electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 18, p. 2573-2581, 1998.

NEVE, L. R.; MCPHIE, L. D.; CHEN, Y. Alzheimer's disease: a dysfunction of the amyloid precursor protein. **Brain Research**, v. 886, n. 1–2, p. 54-66, 2000.

NEWTON, J. R. A.; PARKINSON, D.; CLENCH, M. R. Strategies for examination of Alzheimer's disease amyloid precursor protein isoforms. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 385, n. 4, p. 692-699, 2006.

O'FARRELL, P. H. High resolution two dimensional electrophoresis of proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 250, n. 10, p. 4007-4021, 1975.

ONG, S. E.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative. **Nature Chemical Biology**, v. 1, n. 5, p. 252-262, 2005.

PADOVANI A, BORRONI B, COLCIAGHI F, PASTORINO L, ARCHETTI S, COTTINI E, CAIMI L, CATTABENI F, Di LUCA M. Platelet amyloid precursor protein in AD: a peripheral diagnostic tool and a pharmacological target. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 122, n. 16, p. 1997–2004, 2001.

PADOVANI, A.; BORRONI, B.; COLCIAGHI, F.; PETTENATI, C.; COTTINI, E.; AGOSTI, C.; LENZI, G. L.; CALTAGIRONE, C.; TRABUCCHI, M.; CATTABENI, F. LUCA, M. Abnormalities in the Pattern of Platelet Amyloid Precursor Protein Forms in Patients With Mild Cognitive Impairment and Alzheimer Disease. **Archives of Neurology**, v. 59, n. 1, p. 71–75, 2002.

PALMERT, M. R.; PODLISNY, M. B.; WITKER, D. S.; OLTERSDORF, T.; YOUNKIN, L. H.; SELKOE, D. J. Defining molecular targets to prevent Alzheimer disease. **Archives of Neurology**, v. 62, n. 2, p. 192–195, 2005.

PATTERSON, S. D. Proteomics: evolution of the technology. **Biotechniques**, v. 35, n. 3, p. 440-444, 2003.

PERDEW, G. H.; SCHAUP, H. W.; SELIVONCHICK, D. P. The use of a zwitterionic detergent in two-dimensional gel electrophoresis of trout liver microsomes. **Analytical Biochemistry**, v. 135, n. 2, p. 453-455, 1983.

PERKINS, D. N.; PAPPIN, D. J.; CREASY, D. M.; COTTRELL, J. S. Probability based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. **Electrophoresis**, v. 20, n. 18, p. 3551-3567, 1999.

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.

RABILLOUD, T.; ADESSI, C.; GIRAUDEL, A.; LUNARDI. Improvement of the solubilization of proteins in two dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. **Electrophoresis**, v. 18, n. 3-4, p. 307-316, 1997.

RACCHI M, GOVONI S. The pharmacology of amyloid precursor protein processing. **Experimental Gerontology**, v. 38, n. 1-2, p. 145-157, 2003.

RAFFAI RF, WEISGRABER KH. Cholesterol: from heart attacks to Alzheimer's disease. **Journal of Lipid Research**, v. 44, n. 8, p. 1423-1430, 2003.

ROCHA, T. L.; COSTA, P. H. A.; MAGALHÃES, J. C. C.; EVARISTO, R. G. S.; VASCONCELOS, E. A. R.; COUTINHO, M. V.; PAES, N. S.; SILVA, M. C. M.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. **Eletroforese bidimensional e análise de proteomas**. Brasília: Embrapa, 2005. p. 1-12 (Comunicado técnico 136).

ROSENBERG, R. N.; BASKIN, F.; FOSMIRE, J. A.; RISSER, R.; ADAMS, P.; SVETLIK, D.; HONIG, L. S.; CULLUM, C. M.; WEINER, M. F. Altered amyloid protein processing in platelets of patients with Alzheimer disease. **Archives of Neurology**, v. 54, p. 139-144, 1997.

SCOPES, R. **Protein purification: principles and practice**. 4 ed. New York: Springer-Verlag, 1986. 282 p.

SELKOE, D. J. Deciphering the genesis and fate of amyloid β -protein yields novel therapies for Alzheimer disease. **Journal of Clinical Investigation**, v. 110, n. 10, p. 1375-1381, 2002.

SELKOE, D. J.; YOUNKIN, S. G. The beta-amyloid protein precursor of Alzheimer disease has soluble derivatives found in human brain and cerebrospinal fluid. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 86, n. 16, p. 6338-6342, 1989.

SHAW, M. M.; RIEDERER, B. M. Sample preparation for tow-dimensional gel electrophoresis. **Proteomics**, v. 3, n. 8, p. 1408-1417, 2003.

SMITH, M. A. C. Doença de Alzheimer. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 21, supl 2, p. 3-7, 1999.

STERN, Y.; GURLAND, B.; TATEMACHI, T. K.; TANG, M. X.; WILDER, D.; MAYEUX, R. Influence of education and occupation on the incidence of Alzheimer's disease [abstract]. **Journal of the American Medical Association**, v. 271, n. 13, p. 1004–1010, 1994.

TANG, K.; HYNAN, L.; BASKIN, F.; ROSENBERG, R. N. Platelet amyloid precursor protein processing: A bio-marker for Alzheimer's disease. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 240, n. 1–2, p. 53–58, 2006.

TANTIPAIBOONWONG, P.; SINCHAIKUL, S.; SRIYAM, S.; PHUTRAKUL, S.; CHEN, S. T. Different techniques for urinary protein analysis of normal and lung cancer patients. **Proteomics**, v. 5, n. 4, p. 1140-1149, 2005.

TYERS, M.; MANN, M. From genomics to proteomics. **Nature**, v. 422, n. 6928, p. 193-207, 2003.

VÂLCU, C. M.; SCHLINK, K. Efficient extraction of protein from woody plant samples for two-dimensional electrophoresis. **Proteomics**, v. 6, n. 14, p. 4166-4175, 2006.

WALSH, D.; SELKOE, D. J. Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease. **Neuron**, v. 44, n. 1, p. 181–193, 2004.

WITTMANN-LIEBOLD, B.; GRAACK, H. R.; POHL, T. Two dimensional gel electrophoresis as tool for proteomics studies in combination with protein identification by mass spectrometry. **Proteomics**, v. 6, n. 17, p. 4688-4703, 2006.

YATES, J. R. III. Mass spectrometry and the age of the proteome. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 33, n. 1, p. 1-19, 1998.

ZAINAGHI, Isis Amaral. **Fosfolipase A2, fluidez de membrana e proteína precursora do amilóide em plaquetas na Doença de Alzheimer e comprometimento cognitivo leve**. 2007. 119 f. Tese (Doutorado em Psiquiatria)– Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

ZAINAGHI, I. A.; FORLENZA, O. V.; GATTAZ, W. F. Abnormal APP processing in platelets of patients with Alzheimer's disease: correlation with membrane fluidity and cognitive decline. **Psychopharmacology**, v. 192, n. 4, p. 547–553, 2007.

APÊNDICES

Apêndice 1 – Procedimento para preparo das soluções utilizadas em 2DE

A metodologia a seguir foi detalhadamente descrita para servir como um guia prático e ponto de partida para quem deseja iniciar análises utilizando 2DE. Todas as soluções e tabelas foram retirados do manual da handbook GE Healthcare.

Soluções estoque para eletroforese 2DE

1) PREPARO DA AMOSTRA

- 1.1) Solução de preparo de amostra com uréia
- 1.2) Solução de preparo de amostra com uréia e tiouréia

2) REHIDRATAÇÃO

- 2.1) Solução de reidratação com uréia
- 2.2) Solução de reidratação com uréia e tiouréia
- IPG buffer (comercial)
- Cover fluid (comercial)

3) 1ª DIMENSÃO

- 3.1) Água purificada (para molhar os papéis de contato com os eletrodos)
- Cover fluid (comercial)

4) 2ª DIMENSÃO (POLIMERIZAÇÃO DO GEL DE ACRILAMIDA)

- 4.1) Acrilamida
- 4.2) TrisHCl 1,5 mol L⁻¹ pH 8,8
- 4.3) SDS 10 %
- 4.4) Persulfato de amônio 10 % (preparado na hora do uso)
- TEMED (comercial)
- 4.5) n-butanol saturado com água
- 4.6) Solução estoque azul de bromofenol 1 %
- 4.7) Solução estoque de agarose (sealing solution)
- 4.8) Preparo do gel em diferentes porcentagens para o Gel Ruby.
- 4.9) Padrão de massa molecular
- 4.10) Tampão de corrida concentrado (10 x Laemmli SDS electrophoresis buffer)
- Água purificada (para molhar a fita antes de colocar no gel)

5) REDUÇÃO E ALQUILAÇÃO DAS PROTEÍNAS DA FITA

5.1) Solução de equilíbrio

5.2) Solução de DTT (preparada na hora do uso)

5.3) Solução de IAA (preparada na hora do uso)

6) TRATAMENTO DO GEL APÓS A 2ª DIMENSÃO

6.1) Solução fixadora (fixing)

6.2) Solução corante de coomassie BlueG coloidal

6.2.1) Solução corante de coomassie Phastgel Blue R

6.3) Solução descorante (destain)

6.4) Solução preservante (preseerving)

Obs: Evitar aquecer a uréia a temperaturas muito altas, acima de 30 °C. Sempre trabalhar no gelo quando a solução estiver com uréia, pois em temperaturas elevadas aumenta a concentração de isocianato, que produz a carbamilação das proteínas gerando spots artefactuais.

1) PREPARO DA AMOSTRA

1.1) Solução de preparo de amostra com uréia (8 mol L⁻¹ de uréia, 4 % CHAPS, 2 % IPG buffer, 40 mmol L⁻¹ de DTT, 5 mL água)

	Concentração	Quantidade
Uréia	8 mol L ⁻¹ *	2,4 g
CHAPS #	4 %	0,2 g
IPG buffer (mesmo intervalo de pH das strips)	2 % (v/v)	100 µL
DTT	40 m mol L ⁻¹	30,8 mg
Água deionizada	-	5 mL

* Se necessário a concentração de uréia pode ser aumentada 9 ou 10 mol L⁻¹.

Outros detergentes neutros ou zwitterionicos podem ser usados em concentrações até 2 % (m/v)

1.2) Solução de preparo de amostra com uréia e tiouréia (7 mol L⁻¹ uréia, 2 M tiouréia, 4 % CHAPS, 2 % IPG buffer, 40 m mol L⁻¹ DTT, 5 mL água).

	Concentração	Quantidade
Uréia	7 mol L ⁻¹ *	2,1 g
Tiouréia	2 mol L ⁻¹	0,76 g
CHAPS #	4 %	0,2 g
IPG buffer (mesmo intervalo de pH das strips)	2 % (v/v)	100 µL
DTT	40 m mol L ⁻¹	30,8 mg

Água deionizada	-	5 mL
------------------------	---	------

2) REHIDRATAÇÃO

2.1) Solução de reidratação com uréia (8 mol L⁻¹ uréia, 2 % CHAPS, de 0,5 – 2 % IPG buffer, 0,002 % azul de bromofenol, 5 mL água)

	Concentração	Quantidade
Uréia	8 mol L ⁻¹ *	2,4 g
CHAPS[#]	2 %	0,1 g
IPG buffer (mesmo intervalo de pH das strips)	de 0,5 até 2 % (v/v)	25 - 100 µL
Azul de bromofenol 1 %	0,002 % 40 m mol L ⁻¹	10 µL
Água deionizada	-	5 mL

DTT é adicionado somente antes do uso (7 mg de DTT/ 2,5 mL de solução de reidratação).

2.2) Solução de reidratação com uréia e tiouréia (7 mol L⁻¹ uréia, 2 mol L⁻¹ tiouréia, 2 % CHAPS, de 0,5–2 % IPG buffer, 0,002 % azul de bromofenol, 5 mL água)

	Concentração	Quantidade
Uréia	7 mol L ⁻¹ *	2,1 g
Tiouréia	2 mol L ⁻¹	0,76 g
CHAPS[#]	2 %	0,1 g
IPG buffer (mesmo intervalo de pH das strips)	de 0,5 até 2 % (v/v)	25 - 100 µL
Azul de bromofenol 1 %	0,002 % 40 m mol L ⁻¹	10 µL
Água deionizada	-	5 mL

3) 1ª DIMENSÃO

3.1) Água ultrapurificada

Cover fluid (comercial)

4) 2ª DIMENSÃO (POLIMERIZAÇÃO DO GEL DE ACRILAMIDA)

4.1) Solução estoque de acrilamida 30 % (monomer stock solution)

	Concentração final	Quantidade
Acrilamida	30 %	60 g
N,N'-metilenobisacrilamida	0,8 %	1,6 g
Água deionizada		Completar para 200 mL

Deve ser guardada a 4 °C.

4.2) Trisbase 1,5 mol L⁻¹ pH 8,8 (4x resolving gel buffer solution)

	Concentração final	Quantidade
Tris base	1,5 mol L ⁻¹	36,3 g
Água		170 mL
HCl		200 µL
Água deionizada		Completar para 200 mL

4.3) SDS 10 %

	Concentração final	Quantidade
SDS	10 % (m/v)	5 g
Água deionizada		50 mL

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

	Concentração final	Quantidade
APS	10 % (m/v)	0,05 g
Água deionizada		500 µL

4.5) n-butanol saturado com água

n-butanol	50 mL
Água deionizada	10 mL

4.6) Solução estoque de azul de bromofenol 1 %

	Concentração final	Quantidade
Azul de bromofenol	1 %	10 mg
Tris base	50 m mol L ⁻¹	6 mg
Água deionizada		1 mL

4.7) Solução estoque de agarose 0,5 % (25 mmol L⁻¹ tris base, 192 mmol L⁻¹ glicina, 0,1 % SDS, 0,5 % agarose, 0,002 % azul de bromofenol, volume total 100 mL)

	Concentração final	Quantidade
Tampão SDS		50 mL
Agarose	0,5 %	0,25 g
Azul de bromofenol	0,002 % (m/v)	100 µL
Aquecer para dissolver		

4.8) Preparo do gel em diferentes porcentagens para o Gel Ruby.

Concentração final do gel	5 %	7,5 %	10 %	12,5 %	15 %
Solução do monômero	16,7 mL	25 mL	33,3 mL	41,7 mL	50 mL
Tris 1,5 m mol L ⁻¹	25 mL	25 mL	25 mL	25 mL	25 mL
SDS 10 %	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL
Água deionizada	56,8 mL	48,5 mL	40,2 mL	31,8 mL	23,5 mL
APS 10 %	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL
TEMED	33 µL	33 µL	33 µL	33 µL	33 µL
Volume total	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL

Sistema SE 600 Ruby (18x16 cm)	Volume (mL)
2 cm largura x 1 mm espaçador	30
2 cm largura x 1,5 mm espaçador	40
1 cm largura x 1 mm espaçador	30
1 cm largura x 1,5 mm espaçador	45

4.9) Padrão de massa molecular

	Quantidade	Tampão
Padrão massa molecular	o frasco todo	100 μ L
Ferver a mistura em um becker por 3 min e utilizar 7 μ L		

OBS: as soluções dos padrões de massa molecular podem ser preparadas com diversos protocolos. O melhor método deve ser escolhido de acordo com a análise.

4.10) Tampão de corrida concentrado (10 x Laemmli SDS electrophoresis buffer)

	Concentração final	Quantidade
Tris base	250 mmol L ⁻¹	30,3 g
Glicina	1,92 mmol L ⁻¹	144,1 g
SDS	1 % (m/v)	10 g
Água deionizada		1 L

5) REDUÇÃO E ALQUILAÇÃO DAS PROTEÍNAS DA FITA

5.1) Solução de equilíbrio (tris 75 mmol L⁻¹ pH 8,8, uréia 6 mol L⁻¹, glicerol 30 %, SDS 2 %, azul de bromofenol 0,002 %)

	Concentração final	Quantidade
Tris base 1,5 mol L ⁻¹ pH 8,8	75 mmol L ⁻¹	5 mL
Uréia 6 mol L ⁻¹	6 mol L ⁻¹	36 g
Glicerol	29,3 % (v/v)	34,5 mL
SDS	2 % (m/v)	2 g
Azul de bromofenol	0,002 % (m/v)	200 μ L
Água deionizada		Completar 100 mL

5.2) Solução de DTT (preparada na hora do uso)

	Concentração final	Quantidade
DTT	10 mg mL ⁻¹	50 mg
Solução de equilíbrio		5 mL

5.3) Solução de IAA (preparada na hora do uso)

	Concentração final	Quantidade
--	--------------------	------------

IAA	25 mg mL ⁻¹	12550 mg
Solução de equilíbrio		5 mL

6) TRATAMENTO DO GEL APÓS A 2ª DIMENSÃO

6.1) Solução fixadora

	Concentração final	Quantidade
Etanol	40 %	80 mL
Ácido acético	10 %	20 mL
Água deionizada		100 mL

6.2) Solução corante de coomassie blue G (coloidal)

Solução 1	Quantidade	Solução 2	Quantidade
Coomassie blue G	4 g	Sulfato de amônio	400 g
Água deionizada	2 L	Ácido fosfórico	46,8 mL
Agitar por 3 h		Água deionizada	1 L

6.2.1) Solução corante de coomassie Phastgel Blue R

- - Phastgel Blue R 0,2 %

Dissolver 1 tablete em 80 mL de água ultrapura e agitar de 5 a 10 minutos.

Adicionar 120 mL de metanol e agitar até dissolver o corante.

Filtrar a solução.

Na coração do gel usar a solução 0,02 %:

misturar 1 parte da solução 0,2 % filtrada com 9 partes da solução mista: (3 metanol, 1 ácido acético, 6 água)

6.3) Solução descorante (destain)

	Concentração final	Quantidade
Ácido acético	5 %	100 mL
Etanol	20 %	400 mL
Água deionizada	70 %	1500 mL

6.4) Solução preservante

Preservante 1	Concentração final	Quantidade	Preservante 2	Concentração final	Quantidade
Sulfato amônio	20 %	40 g	Ácido acético	5 %	20 mL
água		200 mL	água		380 mL

Apêndice 2 - Procedimento utilizado em 2DE

- **PASSO 1: REHIDRATAÇÃO DA FITA**

Amostra:

Antes do preparo da amostra é necessário saber qual é o tamanho da fita utilizada no experimento e o tamanho do gel para se estimar o volume total a ser aplicado. A quantidade de proteína irá depender do método de detecção utilizado. Quanto mais sensível o método, menos proteína será necessário aplicar.

O recipiente no qual as fitas são reidratadas deve ser nivelado na bancada em que ficará em repouso. O alinhamento é feito ajustando os botões nas suas extremidades.

Concentrar a amostra até um volume aproximado de 25 μL (caso uma fita de 13 cm seja utilizada), e completar com 225 μL de solução de reidratação (7 mol L^{-1} , uréia, 2 mol L^{-1} tiouréia (opcional), 2 % CHAPS, de 0,5 % até 2 % de IPG buffer, 0,002 % azul de bromofenol).

O DTT é adicionado nessa solução, na concentração de 7 mg/2,5 mL (20 mol L^{-1}), na hora do uso. Alternativamente, pode-se adicionar a amostra, mais o Destreeak (solução de reidratação comercial) e o IPG buffer (adicionar por último, em geral 0,5 % do volume final).

Esperar 10 min antes de aplicar a amostra na canaleta.

A fita vem protegida por um filme plástico na superfície do gel. Esse filme deve ser removido com o auxílio de uma pinça, puxando-o a partir da extremidade “positiva”. Essa é a recomendação que vem no manual. Empiricamente, percebe-se que tirando o selo pela extremidade “negativa”, o gel fica menos danificado no lado básico, onde o selo é mais aderido.

Com uma pipeta colocar a amostra em uma das canaletas e colocar a fita, com a parte do gel virada para baixo (prestar atenção no lado onde o selo é retirado) de modo que ela absorva toda a amostra.

Espalhar o fluido de cobertura (cover fluid) por toda a extensão da canaleta.

Deixar a fita reidratando, em repouso, por 12 a 15 h.

- PASSO 2: POLIMERIZAÇÃO DO GEL DE POLIACRILAMIDA

A polimerização pode ser realizada enquanto a focalização ocorre ou antes, durante a reidratação.

Concentrações de acrilamida recomendadas para a separação de proteínas.

	Porcentagem de acrilamida	Intervalo de MM
Gel uniforme	5	36 – 200
	7,5	24 – 200
	10	14 – 200
	12,5	14 – 100
	15	14 – 60
Gradiente	5 - 15	14 – 200
	5 - 20	10 – 200
	10 - 20	10 - 150

Procedimento anterior à polimerização

Limpar as placas de vidro com etanol, montar o “sanduíche” colocando uma placa sobre a mesa, os espaçadores e a outra placa em cima. Tomar cuidado para deixar as partes lascadas da placa para o lado de fora, para evitar vazamentos.

Montar o “sanduíche” de placas onde o gel será polimerizado. O alinhamento correto do “sanduíche” evita vazamentos. O alinhamento deve ser feito no caster.

Sempre verificar se existe algum vazamento no sistema de placas. Isso pode ser feito preenchendo o sistema com etanol, se não tiver vazamento remover o etanol e secar com papel filtro as placas ou deixar secar livremente, se tiver tempo.

Para fazer um gel pequeno (mini GE) não é necessário remover o ar dissolvido na acrilamida.

Para fazer um gel grande (GE ruby) é necessário remover o ar antes de polimerizar. Deaeração via vácuo das soluções de acrilamida, o tris e a água. Após, adicionar o SDS 10 %, o catalisador (persulfato de amônio) e o iniciador (TEMED).

Preencher as placas, limpas e secas, com a solução que irá polimerizar, com o auxílio de uma micropipeta ou vertendo o líquido aos poucos, nos cantos das placas até a altura desejada. Colocar até um nível maior do que se deseja pois o gel compacta depois de polimerizado. Encher quase que completamente o “sanduíche”.

Colocar uma camada de n-butanol saturado com água por cima do gel, com uma micropipeta, vertendo o líquido aos poucos em um dos cantos do “sanduíche”, para que ocorra um alinhamento perfeito da superfície. Todos os procedimentos devem ser realizados com cuidado para não formar bolhas no gel.

Esperar polimerizar (1 h mini gel, 1 h e 40 min o GE ruby).

Depois de polimerizado, retirar o n-butanol e lavar com água, para remover o resíduo de n-butanol. Essa lavagem é importante, pois com resíduos de n-butanol fica mais difícil de colocar a fita.

- PASSO 3: 1ª DIMENSÃO FOCALIZAÇÃO

Colocar o manifold no IPGphor encaixando a saliência deste na reentrância do equipamento.

Retirar a fita do suporte, escorrer o excesso de cover fluid (sem encostar os lados da fita no papel), colocá-la no manifold, tomando o cuidado de deixar o gel voltado para cima e a fita na posição correspondente ao seu tamanho.

Molhar dois pedaços de papel filtro retangulares (levemente molhados com água deionizada) e colocá-los nas extremidades da fita (colocar de forma a pegar um pedacinho da pontinha azul do gel imobilizado e reidratado da fita IPG). Os eletrodos são posicionados em cima dos papéis.

Espalhar o cover fluid por toda a extensão do manifold (110 mL).

Colocar o arranjo de eletrodos nas extremidades positiva e negativa, cuidando para que os pinos dos eletrodos encostem na camada de ouro. Fechar a tampa.

Programar o software especificando a quantidade, o intervalo de pH e o tamanho das fitas. Iniciar a corrida.

OBS: Todas as fitas numa mesma corrida devem ser do mesmo tamanho quando estiver usando o manifold.

Após, diluir o tampão de corrida da segunda dimensão e colocá-lo na geladeira (em 3600 mL de água destilada adicionar 400 mL de tampão de corrida concentrado gelado).

As fitas podem ser congeladas à – 20 °C por até uma semana ou realizada a segunda dimensão imediatamente.

- **PASSO 4: REDUÇÃO E ALQUILAÇÃO DAS PROTEÍNAS DA FITA.**

O DTT e a IAA (iodoacetamida) devem ser pesados na hora do uso.

A solução de equilíbrio pode ser congelada à – 20 °C em alíquotas de 10 mL.

	Concentração	Fita 13 cm	Tempo de exposição
DTT	100 mg/10 mL de solução de equilíbrio	10 mL/ 2 fitas	20 min
IAA	250 mg/10 mL de solução de equilíbrio	10 mL/ 2 fitas	20 min

Primeiro: reduzir as proteínas com DTT. Colocar a solução de DTT, cuidadosamente dentro de um tubo contendo a fita com o gel voltado para cima e agitar por 20 min.

Segundo: alquilar as proteínas com IAA. Retirar a fita do tubo, escorrer o excesso de solução de DTT e adicionar a solução de IAA e a fita com o gel voltado para cima e agitar por 20 min .

Enquanto isso, derreter a agarose e pipetar o padrão de massa molecular em um pedacinho de papel filtro que deve ser colocado em uma das extremidades da fita.

Retirar a fita da solução de IAA, escorrer o excesso de solução, molhar a fita na água (ou tampão de corrida) para que ela escorregue melhor entre as placas e não grude no vidro.

Coloque-as no gel (deitado) empurrando-a com uma espátula.

OBS: evitar a formação de bolhas ou irregularidades entre o gel e a fita.

Colocar o papel contendo o padrão de MM na extremidade da fita.

Adicionar a agarose corada com azul de bromofenol para selar e colocar para correr.

Colocar o tampão de corrida gelado na cuba, cuidando para que os fios internos dos eletrodos estejam completamente cobertos com o tampão para que não ocorram problemas de fuga de corrente.

Condições de corrida: programar a fonte para que a corrente seja correspondente a 50 mA/por gel. Assim o gel corre em torno de 2,5 h.

Depois do término da corrida (a linha do azul de bromofenol chegar até o final do gel), desligar a fonte de tensão, retirar os géis com bastante água para evitar rasgá-los, marcá-los cortando um dos cantos (ou como o analista achar mais adequado) para saber qual a parte de baixo (ou de cima) e poder diferenciar a parte ácida da básica.

Para a fixação das proteínas no gel, a coloração e a descoloração do gel, seguir o protocolo abaixo:

Tratamento do gel após a segunda dimensão		
Etapa	Tipo de solução	Tempo de contato (min)
1	Solução fixadora	30
2	Solução descorante	3
3	Coomassie 0,025 %	90
4	Solução descorante	15
5	Solução descorante	45
6	Solução descorante	120
7	Solução descorante	120
8	Solução preservante	30

Apêndice 3 - Preparo de PRP para medida de atividade de PLA₂

O método consiste na separação de plaquetas de sangue fresco para armazenagem e posterior determinação do metabolismo de fosfolípides (atividade da PLA₂ e fosfolípides na membrana).

REAGENTES

- ACD-NH-Formol-A (glicose, ácido cítrico, citrato de sódio, H₂O)
- Citrato de sódio 0,1 mol L⁻¹ pH 6,5
- Cloreto de potássio 0,155 mol L⁻¹;
- Cloreto de Magnésio 0,1 mol L⁻¹
- Glicose 0,33 mol L⁻¹:
- Apyrase
- Albumina
- Cloreto de Cálcio 0,1 mol L⁻¹
- Cloreto de Sódio a 0,9 %.
- Tris-Sacarose pH 7,4

PROCEDIMENTO

Coletar 40 ml de sangue em 4 tubos com capacidade para 10 ml contendo anticoagulante citrato de sódio a 0,106 mol L⁻¹.

Em cada tubo, adicionar 1 ml de ACD-NH-Formol-A. Homogeneizar delicadamente por inversão e centrifugar durante 15 min a 1600 RPM a 20 °C; transferir o sobrenadante PRP (Plasma Rico em Plaquetas) para outro tubo com capacidade de 50 ml (Falcon) e ajustar o pH para 6.5 com ACD-NH Formol A; transferir o PRP para 4 (quatro) tubos de poliestireno (4 a 5ml/tubo); centrifugar durante 10 min a 2400 RPM a 20°C; remover cuidadosamente o sobrenadante por inversão; adicionar 2,5 ml de solução de lavagem e deixar descansar durante 10 min; homogeneizar as plaquetas em vórtex até total diluição e adicionar 2,5 ml de solução de lavagem; centrifugar por 8 min a 2400 RPM; remover cuidadosamente o sobrenadante; ressuspender delicadamente o "pellet" em 0,5 µl de tris-sacarose, homogeneizando com a pipeta. Determinar o número de plaquetas em Contador

Hematológico (diluir 50 µl de plaquetas em 950 µl de solução de NaCl a 0,9 % ou solução de lavagem). As plaquetas diluídas em tris-sacarose (500 µl/tubo) são colocadas em criotubos e mantidas em freezer – 70 °C.