

PROTEÔMICA: NOVAS FRONTEIRAS NA PESQUISA CLÍNICA

Alvaro Carlos Galdos-Riveros¹, Ana Rita de Toledo Piza², Lorena Cardoso Resende³, Durvanei Augusto Maria⁴, Maria Angélica Miglino⁵

¹Pós-graduando em Ciências pela Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil (alvarogaldos@usp.br)

²Pós-graduanda em Biotecnologia pelo Instituto Butantan, São Paulo, Brasil

³Pós-graduanda em Ciências pela Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

⁴Professor Pesquisador Científico Nível V do Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan, São Paulo, Brasil.

⁵Professora Doutora da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

RESUMO

As abordagens que utilizam a proteômica como ferramenta no auxílio ao estudo das proteínas expressas em um tipo de tecido ou célula, complementam o genoma e estão cada vez mais sendo usadas para tratar questões biomédicas. As proteínas são o principal alvo de estudo, e com o código genético nem sempre é possível indicar quais proteínas são expressas, que quantidade e forma. As Modificações pós-translacionais das proteínas, tais como fosforilação ou glicosilação, são objetivos muito importantes na determinação da função da proteína. Da mesma forma, os efeitos de fatores ambientais ou processos multigênicos como envelhecimento ou doença, não pode ser avaliado simplesmente pelo genoma. Esta revisão descreve a tecnologia e as áreas da investigação biomédica, que vão desde a patogênese e o uso potencial de drogas e vacinas, como o estudo de biomarcadores de diversas doenças, utilizando a análise proteômica como principal ferramenta.

PALAVRAS-CHAVE: Proteínas, eletroforese bidimensional, espectrometria de massas, pesquisa clínica.

PROTEOMICS: NEW FRONTEIRS IN CLINICAL RESEARCH

ABSTRACT

The approaches that use proteomics as a tool to aid in the study of proteins expressed in a tissue or cell type, complement the genome and are increasingly being used to address biomedical questions. Proteins are the main target of study, and the genetic code is not always indicate which proteins are expressed, that amount and shape. The post-translational modifications of proteins such as phosphorylation or glycosylation, are very important goals in the determination of protein function. Similarly, the effects of environmental factors or multigenic processes such as aging or illness, cannot be measured simply by the genome. This review describes the technology and biomedical research areas, ranging from the pathogenesis and potential use of drugs and vaccines, as the study of disease biomarkers using proteomic analysis as a main tool.

KEYWORDS: proteins, two-dimensional electrophoresis, mass spectrometry, proteome, clinics research.

INTRODUÇÃO

A proteômica é o estudo em larga escala das proteínas, usualmente por métodos bioquímicos. A palavra proteômica tem sido associada tradicionalmente à exibição de um grande número de proteínas de uma linhagem celular ou organismo

em géis bidimensionais (ANDERSON & ANDERSON, 1996; CELIS et al., 1996; WILKINS et al., 1996; WILKINS et al., 1997; GALDOS, 2009). Nesse sentido a proteômica já existe desde o final da década de 1970 quando pesquisadores iniciaram a formação de bancos de dados de proteínas utilizando a então recentemente desenvolvida técnica de eletroforese de gel bidimensional (O'FARRELL, 1975). Isso resultou na catalogação extensiva de manchas nos géis bidimensionais para se criar bancos de dados das proteínas expressas.

A proteômica esta relacionada com o conjunto de tecnologias, que tem por objetivos separar e identificar proteínas em amostras biológicas complexas (ISFOR et al., 2002).

As proteínas controlam a maioria dos processos celulares, os quais ocorrem em grande diversidade, podendo agir como enzimas, anticorpos, hormônios, componentes estruturais e receptores celulares (AEBERSOLD & MANN, 2003; DE SOUZA et al., 2003).

Tais fatos impulsionaram o desenvolvimento de novas tecnologias para o estudo deste conjunto de proteínas expressas. Estas ferramentas passaram então, a ser denominadas instrumentos da "Proteômica (AEBERSOLD et al., 2000).

A proteômica pode ser dividida em três áreas principais: (1) Micro-caracterização protéica para a identificação em larga escala de proteínas e suas modificações pós-traducionais; (2) manifesta diferença para a comparação dos níveis de proteína com aplicação potencial em uma ampla faixa de doenças; e (3) estudos das interações proteína-proteína usando técnicas tais como a Espectrometria de Massas (PANDEY; MANN, 2000).

A separação de proteínas por técnicas bidimensionais como ponto isoelétrico seguido de eletroforese em gel de poli(acrilamida) (mapeamento protéico) é um método que tem apresentado características destacáveis, tais como o alto poder de resolução e boa reprodutibilidade quando são usados para separar soluções complexas de proteína, assim como extratos de plantas ou soro humano (KLOSE, 1975).

A eletroforese bidimensional (2D) é hoje a principal técnica de separação de proteínas utilizada antes da aplicação da amostra no espectrômetro de massas. Sua vantagem em relação a outras tecnologias é a capacidade de separar com alta resolução um grande número de proteínas de uma amostra complexa e a possibilidade de se fazer análise de expressão gênica por meio de comparação dos padrões protéicos (QUALTIERI et al., 2007; SIZOVA et al., 2007).

A preparação apropriada das amostras é essencial para obter bons resultados na proteômica. O melhor método de extração, precipitação e solubilização das proteínas variam de uma amostra para outra e deverá ser estabelecido para cada caso em particular (RABILLAUD, 1996; CORTHALS et al., 2000; STULTS & ARNOTT, 2005; GORG et al., 2010; USAMI et al., 2007; GALDOS, 2009).

A análise das imagens do gel utilizando softwares especializados permite comparações de múltiplos géis e, através da interligação com bases de dados detalhadas do proteoma na internet. Assim, por um processo de subtração, as diferenças (por exemplo, presença, ausência, ou intensidade das proteínas) entre amostras sadias e doentes podem ser reveladas.

As proteínas de interesse podem então ser identificadas na base do conhecimento do ponto isoelétrico e do peso molecular aparente, determinados a partir dos géis bidimensionais (JAMES, 1997). Geralmente aplicam-se cada vez mais métodos como a espectrometria de massas que é altamente sensível e que

requerem quantidades menores de material e têm uma eficiência mais elevada do que os métodos convencionais de seqüenciamento (sensibilidade do femtomole às concentrações do attomole). As proteínas ou peptídeos sofrem ionização por electrospray de estados líquidos (FENN, 1989), ou pela ionização com matriz de desorção de laser (KARAS & HILLENKAMP, 1988) e a massa dos íons são medidos muito exatamente por vários analisadores acoplados (JAMES, 1997). Por exemplo, o analisador do tempo-de vôo mede o tempo de vôo em que os íons atravessam da fonte ao detector (MALDI-TOF). Se o spot excisado da proteína for digerido primeiramente com tripsina, as proteínas clivadas numa seqüência específica de aminoácidos poderão ser quebradas em uma mistura dos peptídeos. As massas dos peptídeos podem então ser medidas por espectrometria de massas para produzir um *fingerprint* da massa do peptídeo.

O objetivo desta revisão é conhecer e compreender a proteômica, seus conceitos e principais ferramentas utilizadas no estudo das proteínas. Além disso a aplicação da proteômica na pesquisa clínica no desenvolvimento de biomarcadores, vacinas e drogas capazes de combater as principais doenças que atingem este século.

REVISÃO DA LITERATURA

CIÊNCIA DIRIGIDA PARA A DESCOBERTA

Os projetos científicos eram iniciados para testar uma hipótese, ou um modelo que era proposto a partir de dados experimentais prévios. Baseadas nesta hipótese eram feitas previsões e experimentos no intuito de produzir evidências que suportassem ou refutassem a hipótese. Apesar desta forma de ciência ser muito importante, ela pode inibir a descoberta de variações, exceções e mecanismos. Assim, recentemente, impulsionada principalmente pelo projeto Genoma, surgiu uma nova modalidade de ciência baseada na coleta não seletiva de dados sobre uma determinada função ou sistema biológico. Os resultados dos experimentos são analisados na expectativa de que características significativas venham a emergir dos dados, gerando novas descobertas sobre o sistema. Esta forma de trabalho é conhecida como *discovery driven science* (ciência dirigida/ impelida/ impulsionada/ propelida/ acionada pela descoberta) em contraposição a ciência dirigida pela hipótese (*hypothesis driven science*), a forma clássica de fazer ciência. A ciência dirigida pela descoberta baseia-se na análise de alto desempenho de um grande volume de dados, e, portanto se tornou mais expressiva a partir do surgimento da bioinformática e equipamentos de alta eficiência, como seqüenciadores automáticos e espectrômetros de massas. O seqüenciamento do Genoma de um organismo, por exemplo, não tem nenhuma hipótese previa embutida em seu projeto, ou seja, espera-se a análise dos dados para gerar novas descobertas e funções a fim de criar novas hipóteses sobre este sistema (AEBERSOLD et al., 2000).

PROTEÍNAS

O termo proteína foi introduzido na linguagem no ano de 1938 pelo Químico sueco Jöns Jacob Berzelius para descrever um tipo particular de macromoléculas composto por uma cadeia linear de aminoácidos, e que eram abundantes em organismos vivos (TWYMAN, 2004). Proteínas são polímeros de aminoácidos resultantes da tradução das informações genéticas contida no ADN das células. O

termo proteína vem do grego “*proteios*” e significa “a mais importante”. De fato as proteínas compõem um conjunto de moléculas indispensáveis para todos os seres vivos do planeta. Devido a essa diversidade de funções, as proteínas exercem um papel fundamental em quase todos os fenômenos biológicos, como produção de energia, defesa imunológica, contração muscular, atividade neuroquímica e reprodução (DE SOUSA et al., 2003).

As moléculas de proteínas são co-polímeros de condensação de até 20 aminoácidos de ocorrência natural distintos apenas pelas suas cadeias laterais. Existem bilhões de combinações possíveis e milhares de diferentes tipos de proteínas, sendo cada com uma função específica a desempenhar no organismo (ATKINS & JONES, 2001).

Segundo DE SOUSA et al. (2003) as proteínas são as biomoléculas mais abundantes e ocorrem em grande diversidade, podendo agir como enzimas, anticorpos, hormônios, componentes estruturais e receptores celulares.

Catalisam uma extraordinária quantidade de reações químicas, fornecem rigidez estrutural à célula, controlam o fluxo do material através da membrana, regulam as concentrações dos metabolitos, atuam como sensores e chaves, produzem movimentos e controlam a função genética (NELSON & COX, 2002). São essenciais para todos os seres vivos, possuindo imensa gama de variações de atividades que determinam o padrão de transformação química na célula. Dentre suas funções principais estão: a catálise enzimática, o transporte, o armazenamento de moléculas e íons, sustentação mecânica, proteção imunitária, geração e transmissão dos impulsos nervosos e no controle do crescimento da célula (BERG et al., 2004).

Do ponto de vista comercial, bilhões de dólares são gerados anualmente por indústrias que trabalham com proteínas (DE SOUSA et al., 2003).

PROTEÔMICA

A proteômica surgiu no final de 1970 quando pesquisadores começaram a criar as bases de dados de proteínas usando naquela época a moderna técnica de eletroforese bidimensional (O’FARREL, 1975).

O termo proteoma foi proposto por Wilkins e Willians em 1994, como sendo todo o conteúdo de proteínas expressas por um genoma ou, no caso de organismos multicelulares, ao complemento protéico expresso por um tecido ou células diferenciadas (WILKINS et al., 1996). Após a euforia provocada pelo seqüenciamento do genoma de vários organismos, a comunidade científica percebeu que, para se compreender a função gênica em toda sua plenitude, era necessário o estudo em larga escala das proteínas expressas. Constatou-se que, embora importante, a análise das seqüências de nucleotídeos nem sempre reflete uma relação direta com os níveis de proteínas expressas e, conseqüentemente, de atividade biológica (GYGI et al., 1999).

Enquanto o genoma de um organismo permanece relativamente estável ao longo da vida, o proteoma é extremamente dinâmico e variável. A análise proteômica permite saber se um gene esta sendo expresso, a concentração relativa desse produto e, por fim, as modificações que podem ocorrer nessas proteínas após a sua tradução (GALDOS, 2009).

A análise proteômica pode mostrar também como esses processos metabólicos, regulatórios e de sinalização se tornam disfuncionais nos estados

patológicos e como podem ser manipulados, mediante, por exemplo, a administração de medicamentos ou a terapia gênica (GALDOS, 2009).

O objetivo inicial dos estudos proteômicos foi a identificação em larga escala de todas as proteínas presentes em uma célula ou tecido. Atualmente, consistem na análise simultânea de misturas complexas de proteínas como as provenientes de lisados celulares e extratos de tecidos com o intuito de detectar diferenças quantitativas e qualitativas na expressão protéica (WESTERMEIER & NAVEN, 2002).

Seus objetivos se diversificaram para a análise de vários aspectos funcionais das proteínas, como modificações pós-traducionais, interações proteína-proteína, existência de isoformas, atividades e estruturas. O campo de atuação desta ciência estende-se à descoberta de novas drogas, terapias, diagnósticos, microbiologia, bioquímica. A pesquisa proteômica torna possível a identificação e caracterização de marcadores biológicos, ou seja, moléculas endógenas ou exógenas específicas de um determinado estado patológico. A capacidade de identificar essas moléculas é extremamente útil no diagnóstico precoce de doenças e no acompanhamento da evolução do tratamento (CASH, 2002).

A expressão dos padrões de proteína em células e tecidos é característica do seu desenvolvimento, fisiologia ou estado patológico. Assim, é muito importante determinar os perfis de expressão destas proteínas e as alterações de um estágio não patológico para um estágio específico da doença (GALDOS, 2009).

As razões que justificam tal magnitude do proteoma são as variações na clivagem do ARN e as modificações pós-traducionais, que o torna várias vezes maior e complexo que o genoma correspondente. Modificações na abundância (quantidade) das proteínas com o tempo, com o desenvolvimento do organismo e as alterações do meio ambiente, tornam este desenvolvimento dinâmico (WILKINS et al., 1996).

No contexto da proteômica comparativa, onde o objetivo é identificar diferenças quantitativas e qualitativas entre amostras de proteínas, a técnica de eletroforese bidimensional (2-DE) é geralmente o método escolhido, gerando dados em formato que possibilita uma boa avaliação visual e fornece comparações quantitativas (RABILLOUD, 2000; 2002).

A análise de proteomas começa geralmente com os géis bidimensionais (2-DE), que apresentam como resultado uma exposição de “spots” de proteínas, estes géis bidimensionais serão utilizados para criar bases de dados de todas as proteínas expressas. Determinar a identidade das proteínas foi difícil por um atraso da sensibilidade e rapidez dos métodos analíticos para caracterização de proteínas (tais como reação da cadeia polimerase e análise automatizada da sequência do ADN). Em 1990 a espectrometria de massas emergiu como um poderoso método analítico que removeu a maioria das limitações da análise de proteínas (DI CIERO & BELLATO, 2003).

Este desenvolvimento, associado com a disponibilidade e o completo seqüenciamento do código genético humano em bases de dados públicas, marcou o começo de uma nova era. Hoje, o termo proteômica cobre mais do que uma análise funcional dos produtos dos genes ou “genômica funcional”, inclui estudos em larga escala da identificação ou localização de proteínas. O estudo mais profundo da estrutura de proteínas, contudo, é usualmente não incluído e em vez disso designado “genômica estrutural” (BURLEY, 1999).

A razão disso é que o controle da expressão gênica ocorre desde a transcrição do mRNA até as modificações pós-traducionais como glicosilação,

fosforilação, acilação, hidroxilação, carboxilação, ubiquitinação, entre outras, as quais alteram a atividade protéica (Figura 1). Pelos motivos expostos, a análise proteômica é hoje um dos meios mais eficientes para o estudo funcional dos genes e genomas de organismos complexos (ROCHA et al., 2005).

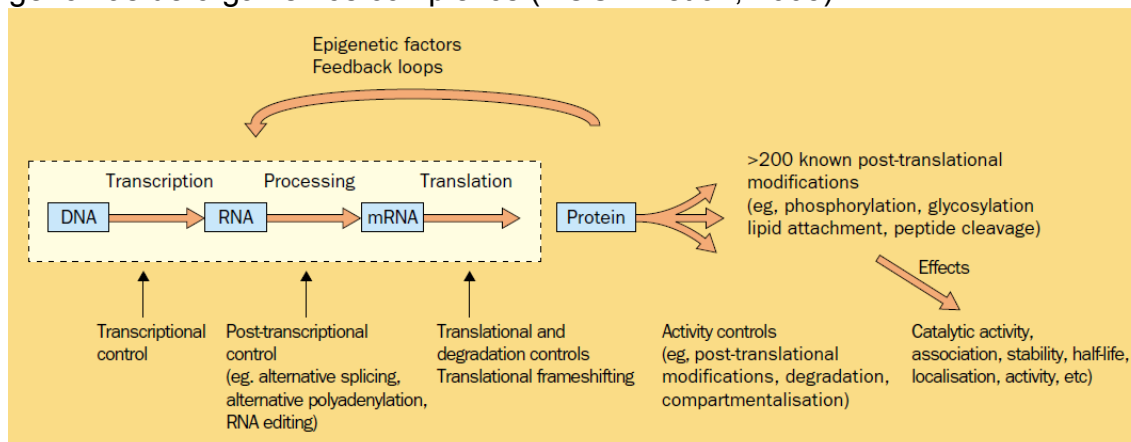


FIGURA 1 Maneiras em que a expressão do gene e da proteína pode ser regulada ou modificada na transcrição ou na pós-tradução.

FONTE: BANKS et al., 2000.

O proteoma indica as proteínas expressas em um genoma ou tecido, enquanto o genoma representa a soma de todos os genes de um indivíduo, o proteoma não é uma característica fixa de um organismo. O proteoma altera com o estado de desenvolvimento, do tecido ou mesmo sob as condições nas quais o indivíduo se encontra (GALDOS, 2009). Portanto, há muito mais proteínas no proteoma do que genes no genoma, especialmente para eucariotos (ROCHA et al., 2005).

Isto porque há várias maneiras do gene expresso, o RNA total, sofrer redução (*splicing*) para construir o RNA “maduro”. Este então irá servir de molde para a tradução de uma proteína a qual sofre modificação pós-tradução (DI CIERO & BELLATO, 2003).

Recentemente, um progresso importante pode ser visto no campo da proteômica, com o desenvolvimento de métodos alternativos para separação e identificação de proteínas, como tecnologias baseadas em chips, nos chamadas “arrays” de proteínas (RAMACHANDRAN et al., 1987), a análise direta de complexos protéicos por espectrometria de massas (LINK et al., 1999; WASHBURN et al., 2003), o uso de “tags” de afinidade (GYGI et al., 1999), sistemas como duplo híbrido em levedura (UETZ et al., 2000).

Entre todas as técnicas de proteoma de uso atual, a mais utilizada é a eletroforese bidimensional (2D-PAGE), acoplada a espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF.

No contexto da proteômica comparativa, onde o objetivo é identificar diferenças quantitativas e qualitativas entre amostras de proteínas, a técnica de 2D PAGE é método de escolha, e gera dados em um formato que possibilita uma boa avaliação visual (para amostras pouco complexas) e fornece comparações quantitativas (RABILLOUD, 2002).

TRATAMENTO DA AMOSTRA

A preparação da amostra é a parte mais crítica de qualquer experimento, este passo pode envolver homogeneização e lise celular (GALDOS, 2009).

Quando os tecidos ou células são lisadas, proteases são liberadas ou ativadas iniciando a degradação de proteínas através da ação de proteases prejudica os resultados dos análises dos géis bidimensionais, então medidas tem que ser tomadas para evitar este problema (GALDOS, 2009; GORG et al., 2010).

A preparação da amostra é contínua, sendo o passo mais importante nos experimentos em proteômica, e o desafio está na capacidade de separação, recuperação do material e rendimento específico. Muitos dos passos da preparação da amostra mencionados aqui são familiares para os cientistas que estudam proteínas, contudo, muitos desses métodos não foram desenvolvidos para fornecer o grau de pureza ou a recuperação eficiente do material que são necessários para estudos proteômicos. Desta forma, melhoramentos ou alternativas são necessárias, um tratamento prévio das amostras para 2D-PAGE envolve a solubilização, desnaturação e a redução para quebrar completamente às interações entre as proteínas (RABILLOUD, 1996; GALDOS, 2009).

Muitas das informações em proteômica vem diretamente dos organismos, seja humano ou não. Em outros casos, os tecidos provem de vários lugares para começar a obter populações homogêneas de célula. Ainda tecidos congelados, embora seja mais fácil de obter, elimina a possibilidade de cultura celular ou técnicas que dependam de células vivas. Os tecidos fixados em formalina e embebidos em parafina não são de uso em experimentos proteômicos. Protocolos de dissociação de tecidos foram bem estabelecidos, embora alguns estudos tais como a análise de proteínas da célula precisa de uma dissociação sem proteases (STULTS & ARNOTT, 2005). Para separação de proteínas ainda pode ser necessário fornecer uma adequada resolução e escala dinâmica (CORTHALS et al., 2000).

O processo de solubilização tem como objetivo quebrar as interações macromoleculares (incluindo todas as interações não covalentes e as pontes de dissulfeto). Para o rompimento de interações não covalentes serão utilizados agentes caotrópicos, como a uréia, que é reagente desnaturante que altera o solvente e exerce profundos efeitos sobre todos os tipos de interações não covalentes, pois rompe os elementos de estruturas secundárias de modo que os grupos ionizáveis fiquem completamente expostos a solução. Por esse motivo quando usado em altas concentrações (comumente 8 mol l^{-1}) esse reagente facilita a solubilização das proteínas (RABILLOUD et al., 1997; RABILLOUD, 1998). Função semelhante à uréia é também exercida pela tiouréia que é um agente caotrópico mais eficiente do que a uréia, mas pouco solúvel em água. A mistura de uréia-tiouréia tem sido muito utilizada, pois é mais eficiente do que a uréia sozinha (RABILLOUD et al., 1997).

O Ditiotretol (DTT), que também é um agente desnaturante e, tem como função principal clivar as pontes de dissulfeto formadas entre resíduos de cisteínas. Por ser mais eficiente e apresentar melhores resultados – embora hajam proteínas com muita cisteína que não são totalmente reduzidas com DTT e para romper as interações hidrofóbicas serão usados detergentes não-iônicos ou zwitteriônicos (com carga líquida neutra), como Triton X-100 e, mais recentemente, CHAPS “[3-Cholamidopropyl) dimethylammido]-1-propanesulfonate” são comumente empregados, pois além de auxiliar a solubilização das proteínas previnem a agregação através de interações hidrofóbicas (DAMERVAL et al., 1986; ROCHA et al., 2005).

Existem evidências consideráveis de que o papel funcional de uma determinada proteína pode ser fortemente dependente do tipo de célula na qual ela é expressa e do estado dessa célula (GODOVAC-ZIMMERMANN & BROWN, 2001).

As proteínas controlam a maioria dos processos celulares, os quais ocorrem em grande diversidade, podendo agir como enzimas, anticorpos, fatores de crescimento, hormônios, componentes estruturais e receptores celulares (DE SOUSA et al. 2003; AEBERSOLD & MANN, 2003).

Nesse sentido, a identificação das diferenças na expressão protéica é uma área de estudo relevante na pesquisa proteômica. Nos últimos anos, grandes esforços têm sido realizados no desenvolvimento de novas metodologias para o estudo e entendimento da estrutura e função de proteínas em diferentes amostras biológicas.

Em linhas gerais, o estudo da proteômica pode ser realizado por meio de técnicas como a eletroforese bidimensional (2DE) seguida da espectrometria de massas (MS), ou ainda, mais recentemente, a associação de métodos de ionização e cromatografia, entre outros, que aumentam ainda mais a sensibilidade de detecção (KATZ-JAFFE et al., 2009). No entanto, o ponto de partida ainda tem sido a exposição de um grande número de proteínas de uma linhagem celular ou organismo em géis de poliacrilamida bidimensional (WILKINS et al., 1996; ANDERSON & ANDERSON; 1996; WILKINS et al., 1997).

O monitoramento do nível das proteínas permite apreciar o efeito da regulação da expressão gênica que ocorre pós-transcrição e pós-tradução e fornece numerosas pistas quanto à sua função biológica e envolvimento nos processos biológicos examinados (HOOGLAND et al., 2000). Ao contrário do que ocorre com o genoma relativamente estático e idêntico nas células somáticas de um organismo, a expressão protéica (proteoma) encontra-se em estado dinâmico, respondendo a estímulos externos e internos. Por tanto, o proteoma permite maior aproximação dos processos metabólicos intracelulares (FEY & LARSEN, 2001).

FERRAMENTAS PROTEÔMICAS

ELETROFORESE

O termo eletroforese foi criado por Michaelis em 1909, para descrever a migração em colóides sob a influência de um campo elétrico (ALFENAS, 1998).

Em 1937 Tiselius mostrou a separação de proteínas, albumina e α , β e γ -globulinas do soro que foram estudados de um ponto de vista de homogeneidade química e também separados dentro de seus principais constituintes, por eletroforese (TISELIUS, 1937).

Alfenas (1998) descreve ainda que a eletroforese visa à separação de moléculas em função de suas cargas elétricas, de seus pesos moleculares e de suas conformações, em suportes porosos e tampões apropriados sob a influência de um campo elétrico contínuo. Moléculas com preponderância de cargas negativas migram, no campo elétrico, para o pólo positivo (ânodo), e moléculas com excesso de cargas positivas migram para o pólo negativo (cátodo). A carga preponderante de uma molécula protéica é função dos seus aminoácidos.

Segundo Shaw (1969) a eletroforese implica a moção de dissolver ou suspender material baixo à influência de um campo elétrico aplicado. É um de quatro de todos os fenômenos eletro-cinéticos, da qual implica movimento entre as partes rígidas e móveis de uma dupla camada elétrica.

A escolha do meio de suporte depende de preferências individuais e dos objetivos, mas de modo geral, para proteínas, os géis de poliacrilamida têm sido preferido por apresentar um maior poder de resolução graças a ampla variação

controlável no diâmetro de seus poros. Além disso, géis de poliacrilamida são muito translúcidos, o que possibilita quantificar a atividade enzimática por densitometria (ALFENAS, 1998).

Os métodos eletroforéticos baseiam-se no princípio de que uma molécula com carga elétrica movimenta-se em um campo elétrico. A velocidade de migração de uma proteína depende da intensidade do campo, da carga líquida da proteína e do coeficiente de atrito. As separações eletroforéticas são quase sempre feitas em gel, onde os de poliacrilamida são os escolhidos por ser quimicamente inertes e porque o tamanho dos seus poros pode ser controlado (STRYER, 2004).

ELETROFORESE BIDIMENSIONAL

A eletroforese em gel de poliacrilamida tem sido extremamente proveitosa como uma ferramenta analítica para a separação e quantificação de espécies de proteínas de complexas misturas.

Os fundamentos desta abordagem foram apresentados pela primeira vez em 1975 (KLOSE, 1975; O'FARRELL, 1975). Em géis bidimensionais, os polipeptídeos aparecem formando manchas (*spots*) após serem corados. Diferentes manchas podem conter isoformas da mesma proteína com coordenadas específicas de ponto isoelétrico (*pI*) e peso molecular (PM).

Em 1988, Angelika Görg introduziu o uso de gradientes imobilizados de pH (IPG) (BJELLQVIST et al., 1982; GÖRG et al., 1988), nos quais tampões são copolimerizados com acrilamida e bisacrilamida, acarretando uma melhor reprodutibilidade dos perfis bidimensionais. A eletroforese bidimensional (2D-PAGE) é uma técnica que pode ser usada para a obtenção de perfis bidimensionais completos de uma amostra como também para estudos comparativos entre amostras. O aparecimento ou desaparecimento de manchas ou *spots* pode fornecer informações acerca de proteínas específicas de um estágio determinado, enquanto a intensidade das manchas fornece informações quantitativas a respeito da expressão diferencial dos polipeptídeos (GRAVES & HAYSTEAD, 2002).

Em comparação com a eletroforese unidimensional em géis desnaturantes de poliacrilamida, conhecida como SDS-PAGE (Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio), a eletroforese 2D-PAGE apresenta uma maior capacidade para separar misturas complexas enquanto que na SDS-PAGE as bandas protéicas tendem a se sobrepor, os métodos unidimensionais de separação, podem separar um número relativamente pequeno de proteínas (geralmente menos de 50) (GALDOS, 2009).

A eletroforese bidimensional, ao combinar dois processos distintos de separação, pode ser usada para separar mais de 1000 proteínas num único gel (ANDERSON & ANDERSON, 1996).

De acordo com Chromy et al. (2004) e Qualtieri et al. (2007) em eletroforese 2D-PAGE, as proteínas são separadas com base em duas das suas propriedades: numa primeira dimensão, de acordo com o seu ponto isoelétrico (*pI*) e numa segunda dimensão, em gel de SDS – PAGE de acordo com o seu peso molecular (MW). Ou seja, a eletroforese 2D resulta da combinação de duas técnicas: a focagem isoelétrica (IEF), seguida por uma separação de SDS – PAGE (Figura 2). Quando bem sucedida obtém-se um gel de poliacrilamida contendo numerosos *spots*, bem separados, cada um correspondendo a uma proteína (ou a uma forma protéica) (SANTOS et al., 2004).

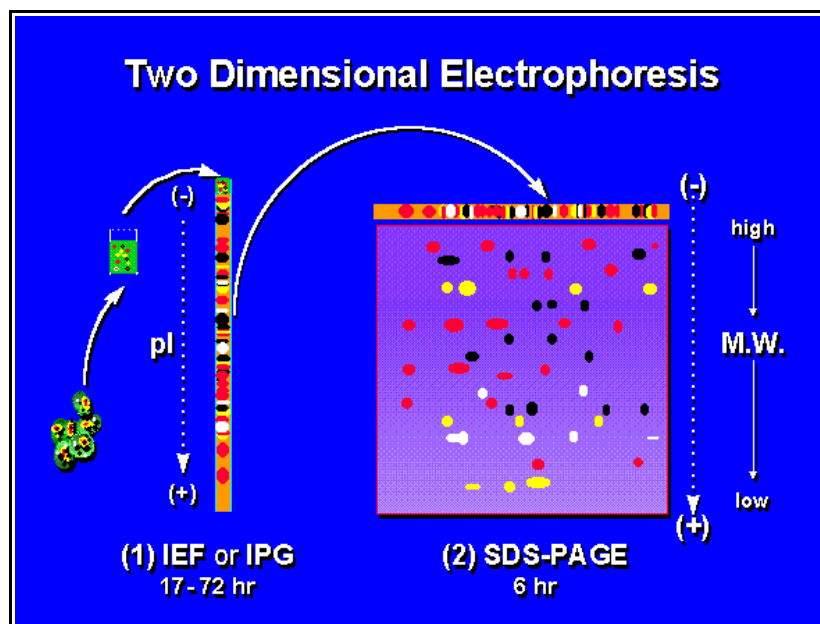


Figura 2 – Eletroforese Bidimensional 2D-PAGE utilizado na análise de proteomas

FONTE: GALDOS, 2009

Primeira dimensão: Focalização Isoelétrica

A Focalização Isoelétrica envolve a separação de solutos anfotéricos em um gradiente de pH. Sob a influência do campo elétrico um soluto experimenta regiões de pH progressivamente menor. Assim, uma fração cada vez maior torna-se protonado, e desta forma, a carga efetiva é alterada durante a migração. Eventualmente, a carga total do soluto torna-se zero, e sua migração é interrompida, cada componente da amostra migra para uma região onde a carga líquida é igual a zero, que é chamado de ponto isoelétrico, e permanecerá nesta posição enquanto o campo elétrico for operante (TAVARES, 1996).

Segunda dimensão: Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)

A eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecilsulfato de sódio (SDS) é um método muito utilizado para a análise de massas moleculares de proteínas oligoméricas. O gel é uma matriz constituída de um polímero de acrilamida com ligações cruzadas de N,N – metil-bis-acrilamida, cuja porosidade da malha pode ser escolhida. Quanto maior a concentração de acrilamida menores serão os poros da malha formada. A solução de acrilamida é estável por até um mês. Quando estocada por períodos prolongados, transforma-se em ácido acrílico, que pode causar distorções no gel. É importante frisar que a acrilamida é fotossensível e neurotóxica, devendo, portanto, ser estocada em frasco escuro e manuseada com o maior cuidado possível (ROCHA et al., 2005; DI CIERO & BELLATO, 2003).

Antes de iniciar a eletroforese, as variáveis como são a forma e carga nativa das proteínas devem ser eliminadas para que a separação dependa apenas de sua massa molecular. Para isso, as proteínas são homogenizadas com Dodecil sulfato de sódio (SDS), um detergente anfipático cuja função é desnaturização, ou seja, convertê-las numa estrutura linear – a forma nativa é geralmente globular – e

conferir-lhes densidade de carga uniforme (DI CIERO & BELLATO, 2003). O SDS tem alta carga negativa e uma carga hidrofóbica que interage com as cadeias polipeptídicas numa proporção aproximada de 1,4g de SDS para cada grama de proteína, tornando-as negativamente carregadas. Na ausência do SDS, as proteínas com massas iguais podem migrar diferentemente na malha do gel devido ao diferencial de cargas de suas estruturas tridimensionais. Além da adição do SDS, as proteínas podem ser opcionalmente fervidas na presença de um agente redutor, como ditioneína (DTT) ou 2-mercaptoetanol, que desfazem as pontes de dissulfetos, ajudando a eliminar a estrutura tridimensional dos polipeptídeos (ROCHA et al., 2005).

Após esse tratamento as proteínas são aplicadas no topo de um gel de poli(acrilamida) e submetidas a uma corrente elétrica, fazendo com que elas migrem através da malha de acrilamida em direção ao pólo positivo. Dependendo do seu tamanho, cada proteína se moverá diferentemente: as proteínas menores migrarão mais rapidamente, enquanto que as maiores terão mais dificuldade em atravessar a malha do gel e, assim, se moverão mais lentamente. Quando se representa a mobilidade eletroforética frente ao logaritmo dos pesos moleculares conhecidos de diversas cadeias polipeptídicas (proteínas marcadoras), obtém-se uma reta que pode ser utilizada como padrão para o cálculo do peso molecular das subunidades da proteína de interesse (ROCHA et al., 2005).

CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Desde seu surgimento, no início do século XX, a espectrometria de massas (MS) tem sido largamente empregada para a análise de compostos orgânicos de baixa massa molecular. No entanto, nas últimas décadas tornou-se valiosa, devido aos grandes avanços que foram obtidos na identificação das proteínas (HAGER, 2004).

A espectrometria de massas (MS) é uma técnica que mede a relação entre a massa e a carga (m/z) de moléculas ionizadas em fase gasosa (GROSS, 2004). De uma maneira geral, um espectrômetro de massas é constituído por uma fonte de ionização, um analisador de massas, um detector e um sistema de aquisição de dados. Na fonte de ionização as moléculas são ionizadas e transferidas para a fase gasosa. No analisador de massas os íons formados são separados de acordo com suas relações m/z e posteriormente detectados (usualmente por elétron multiplicador) (FENN et al., 1989; GROSS, 2004).

Até a década de 80, a necessidade de ionizar as moléculas para obter um espectro de massas era um grande obstáculo enfrentando no caso de moléculas biológicas de alta massa molecular. Nos métodos de ionização disponíveis na época, as moléculas a serem ionizadas deveriam estar em fase gasosa, sob alto vácuo e a altas temperaturas, condições incompatíveis com biomoléculas. Esse problema foi resolvido com o surgimento de duas técnicas brandas para ionizar moléculas biológicas grandes, são: a espectrometria de massas com base na desorção e ionização das proteínas de laser, auxiliado por uma matriz (MALDI – Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization), que analisa a massa através do tempo de voo dos íons no tubo de análise (ToF – Time of Flying); e a espectrometria de massas baseada na ionização por pulsos elétricos em meio líquido (ESI – ElectroSpray Ionization); (FENN et al., 1989; ROCHA et al., 2005).

A espectrometria de massas é uma metodologia que permite a determinação da massa molecular de compostos com altíssima precisão. Apenas no início da

década de 80, a espectrometria de massas começou a ser mais aplicada em determinações de massas moleculares de proteínas (PANDEY & MANN, 2000). Com o desenvolvimento de equipamentos cada vez mais especializados para proteínas, a espectrometria de massas tornou-se ferramenta revolucionária na química de proteínas moderna. A espectrometria de massas vem permitindo a identificação de proteínas por uma metodologia denominada *peptide mass fingerprinting*. Rocha et al. (2003) descreveram que esta metodologia é baseada na digestão da proteína a ser identificada por uma enzima proteolítica (por exemplo, a tripsina) produzindo fragmentos denominados peptídeos. As massas desses peptídeos são então determinadas com grande acuidade (0,1 a 0,5 Da) por espectrometria de massas. As massas obtidas formam uma espécie de impressão digital (*fingerprinting*.) da proteína. *Softwares* especiais permitem comparar o *peptide mass fingerprinting* da proteína que queremos identificar com os gerados teoricamente para todas as seqüências de proteínas presentes nos bancos de dados. Se a seqüência da proteína problema estiver no banco de dados ela será imediatamente identificada (DE SOUSA *et al.*, 2003).

Técnicas de Ionização

Ionização por Electrospray (ESI)

Em ESI todo o processo de ionização ocorre à pressão e temperatura atmosférica. Uma solução levemente ácida (ou básica) contendo a amostra é bombeada a uma vazão de alguns microlitros por minuto através de um tubo capilar metálico submetido a uma alta diferença de potencial (3-5 kV) em relação ao eletrodo cilíndrico que circunda a saída do capilar (ARDREY, 2003). Assim, forma-se um *spray* com gotículas carregadas que passam a través de um gás secante, ocorrendo à evaporação do solvente as gotículas carregadas tornam-se cada vez menores de modo que a densidade de carga torna-se tão alta que as moléculas carregadas aprisionadas nas gotículas são ejetadas para a fase gasosa seguindo para o analisador de íons (ARDREY, 2003; DE SOUSA *et al.*, 2003).

Ionização/desorção a laser assistida por matriz (MALDI)

Na ionização do tipo MALDI, a solução contendo a amostra é misturada a uma solução supersaturada de matriz orgânica, a qual absorve fortemente radiação eletromagnética em um determinado comprimento de onda. A solução resultante dessa mistura é então aplicada a uma placa metálica de MALDI (volumes da ordem em poucos microlitros). Após alguns minutos o solvente terá evaporado e ocorrerá a cristalização da amostra juntamente com o excesso de matriz. A placa é então transferida para dentro do espectrômetro e o cristal formado bombardeado por um feixe de laser de alta potência com comprimento de onda correspondente ao máximo de absorção de matriz. Essa energia é adsorvida em grande parte pela matriz, a qual está em excesso, e transferida de maneira branda para a amostra, de modo que ocorre a sublimação e da matriz, resultando em íons em fase gasosa que seguirão para o analisador de massas (ZENOBÍ & KNOCHENMUSS; 1998).

Analísadores de massas

Átomos e moléculas neutras devem ser ionizados para que possam ser analisados por espectrometria de massas. Os analisadores dependem em geral da aceleração dos íons, por isso os separam de acordo com a relação massa-carga (m/z), e não apenas em função das suas massas (DE HOFFMANN *et al.*, 1996; WATSON, 1997). As três principais características de um analisador são: o limite de

massa, a transmissão iônica e o poder de resolução em massa. O limite de massa significa o valor mais alto de massa que pode ser medido; é geralmente expresso em daltons (Da) para um íon de carga unitária, i.e, $z=1$. A transmissão é a razão entre o número de íons que chegam ao detector e os íons produzidos na fonte. O poder de resolução é a capacidade de produzir dois sinais distintos para dois íons com uma diferença de massa pequena (DE HOFFMANN et al., 1996; WATSON, 1997); pode ser quantificado por $R=m/\Delta m$ onde Δm é a menor diferença de massa capaz de ser resolvida, ou ainda, Δm é a largura de um pico a media altura (FWHM-Full Width at Half Maximum) (DE HOFFMANN et al., 1996; WATSON, 1997). Em relação aos analisadores de massas, existem diversos tipos com diferentes princípios, vantagens e desvantagens de acordo com a aplicação pretendida.

O analisador deve permitir a passagem de um número de íons suficiente para fornecer uma corrente de íons facilmente mensurável. Neste trabalho será considerado apenas o analisador de massa do tipo tempo-de-vôo (time-of-flight, TOF) (PURETZKY & GEIHEGAN, 1998).

Tempo de vôo (TOF)

Os analisadores do tipo TOF (*Time-of-Flight*) são os mais empregados em associação com MALDI e, por princípio, os mais simples. Eles baseiam-se na separação dos íons de diferentes m/z porem, com a mesma quantidade de energia cinética. Após dessorvidos da matriz, os íons são acelerados em direção ao detector a traves de um tubo de vôo, mantido sob alto vácuo, por médio da aplicação de uma alta diferencial de potencial (entre 15-30 kV). Assim, o tempo necessário para atingir o detector é proporcional a tensão aplicada e a relação aplicada m/z dos íons (Figura 3) (JAMES, 1997).

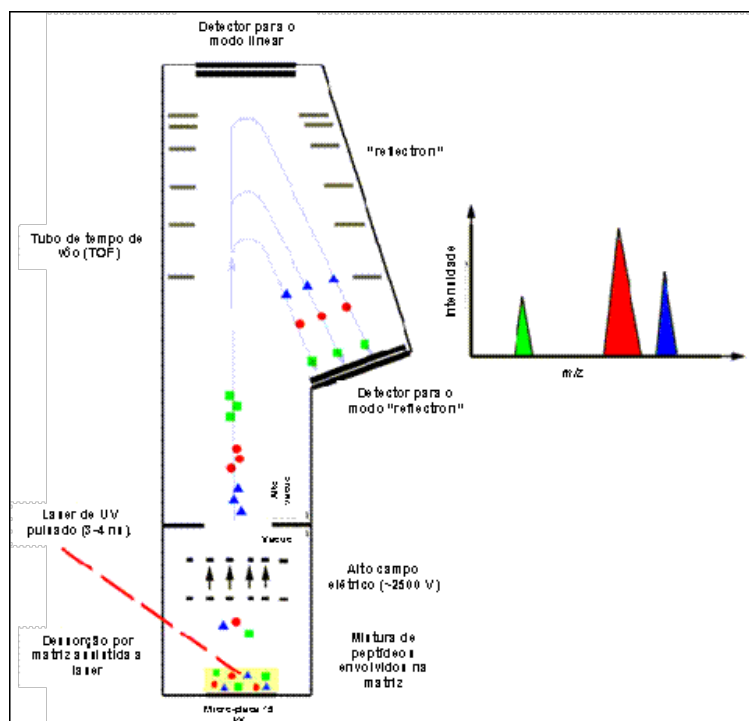


Figura 3. Espectrômetro de massas MALDI-TOF-MS. Um feixe de laser causa dessorção e ionização de moléculas (tanto da matriz quanto da amostra) depositadas em uma placa de metal. Uma vez transferidas para a fase gasosa, as moléculas

carregadas são direcionadas eletrostaticamente da fonte de ionização para o analisador de massas. Analisadores “time-of-flight” (TOF) separam íons de acordo com sua relação massa/carga (m/z).
FONTE: (KARAS; HILLENKAMP, 1988).

BIOINFORMÁTICA APLICADA AO ESTUDO DAS PROTEÍNAS

Os experimentos desenvolvidos no laboratório necessitam ser complementadas pelas análises virtuais feitas com o auxílio de um computador (HOCHSTRASSER, 1998). Além de softwares para analisar a separação eletroforetica, ferramentas bioinformáticas foram desenvolvidas. Algumas destas estão disponíveis através da Internet ao usuário: ExPASy (www.expasy.ch/www/tools.html) (HOCHSTRASSER et al., 1995).

Estas bases de dados incluem mapas de proteína do plasma humano, da urina, do líquido cérebro-espinhal, e dos tecidos da mama, do coração, e da bexiga e dos carcinomas, assim como de vários microorganismos. Finalmente, dado a natureza dinâmica do proteoma, os detalhes experimentais e os resultados relacionados devem ser indicados como importantes chaves bioquímicas ou implicações de relevância nas doenças (BAIROCH & APWEILER, 1998).

Estes softwares permitem não somente a identificação das proteínas, mas também de uma caracterização adicional que varia do cálculo das propriedades físico-químicas básicas até a predição de potenciais modificações pós-traducionais e de estruturas tridimensionais 3D. A proteína encontrada e as bases de dados dos géis bidimensionais são o núcleo da bioinformática na pesquisa de proteomas. SWISS-PROT é um exemplo típico de uma base de dados (BAIROCH & APWEILER, 1998).

APLICAÇÕES BIOMÉDICAS

A perspectiva oferecida pela proteômica tem-se utilizado na pesquisa de diferentes áreas da medicina, incluindo a biomedicina. Estas pesquisas poderiam ser classificadas de distintas formas: em função do tipo de amostra empregada, da doença ou do tipo de doenças que abordam, da técnica ou das técnicas utilizadas, do uso ou da aplicação, etc.

As pesquisas clínicas com proteômica se baseiam em torno ao tipo de amostra utilizada. Nesta base de pesquisas destaca-se as pesquisas com linhagens celulares, com tecidos e proteômica de fluidos.

As linhagens celulares são variantes derivadas das células cancerosas ou de células normais fixadas pela inibição dos mecanismos celulares que causam a interrupção do crescimento. Diferente da maioria de células isoladas diretamente dos organismos, estas células são capazes de dividirem-se indefinidamente quando se mantêm em cultura no laboratório (HERNÁNDEZ et al., 2010).

Na pesquisa com linhagens celulares, a proteômica tem caracterizado os perfis de expressão de proteínas em diferentes tipos destas linhagens como base para futuros experimentos comparativos (ISSAQ et al., 2003; CHAURAND et al., 2004). Estudos têm demonstrado que o número de proteínas identificadas em cada proteoma varia de forma importante, o que provavelmente seja o reflexo da existência de diferenças no nível de expressão das distintas proteínas em cada linhagem celular (MOORE; MINOWADA, 1992).

As linhagens celulares tumorais humanas podem constituir um modelo importante para o estudo do câncer. Deste modo, as pesquisas que comparam os

proteomas das diversas linhagens tumorais humanas (ou células obtidas diretamente de um tumor) com suas correspondentes linhagens celulares normais começam a ser habituais para identificar marcadores da doença ou biomarcadores que permitam a detecção precoce, classificação e escolha do prognóstico dos tumores assim como para propor novas formas terapêuticas de tratamento. Sendo assim, a proteômica pode realizar pesquisas para avaliar o potencial maligno de um tumor (potencial metastático segundo seja a expressão de uma proteína específica), a quimiosensibilidade ou quimiorressistência deste (LE NAUR, 2001). O uso da proteômica para o desenho, indicação e predição da resposta de um fármaco ou a fármacos seria também extrapolável a outras doenças, é o que se conhece como farmacoproteômica (JAIN, 2004; LAGE, 2004).

Além das pesquisas em linhagens celulares humanas, a proteômica tem-se aplicado atualmente na análise de tecidos e fluidos para o estudo de situações fisiológicas (durante o desenvolvimento, em diferentes estágios metabólicos, frente a diversas respostas ambientais) ou patológicas (câncer, auto-imunidade, infecções) (GONZÁLEZ-BUITRAGO, 2006; GONZÁLEZ-BUITRAGO et al., 2007). Os objetivos destas pesquisas utilizando tecidos e fluidos são similares às pesquisas com linhagens celulares (identificação de biomarcadores, farmacoproteômica).

A falta de acesso de amostras teciduais é um problema nas pesquisas proteômicas clínicas, mas a informação obtida pode ser determinante e, as vezes, é a melhor escolha (BHATTACHARYA et al., 2003).

Na proteômica de fluidos apresenta uma maior facilidade de obtenção e processamento das amostras. A aplicação da proteômica tem-se utilizado para o estudo das diversas doenças (neoplásicas, reumáticas, endocrinológicas, toxicológicas) (GONZÁLEZ-BUITRAGO, 2006; GONZÁLEZ-BUITRAGO et al., 2007; PETRICOIN et al., 2004; GONZÁLEZ-BUITRAGO, 2007). Outro tipo de amostra de mais difícil acesso é o análise proteômica do líquido cefalorraquidiano. Este se tem utilizado recentemente no estudo das bases etiopatogênicas e na identificação de biomarcadores de doenças neurológicas, como transtornos neuropsiquiátricos, tumores cerebrais e síndromes dolorosas lombares (ROMEO et al., 2005; ZHENG et al., 2003).

O efeito máximo das abordagens proteômicas na pesquisa biomédica não foi conseguido ainda, em parte por causa da falta de recursos e informação entre os pesquisadores sobre os avanços tecnológicos. Entretanto, um grande progresso está sendo feito, e importantes revisões, informações de diversas áreas biomédicas são dadas para ilustrar o potencial desta abordagem. As abordagens proteômicas oferecem um grande potencial para decifrar problemas biológicos complexos tais como a natureza de complexos moleculares particulares ou dos caminhos na patogênese da doença (NEUBAUER et al., 1998), e de complexos nucleares de leveduras (ROUT et al., 2000). A descoberta de biomarcadores biológicos de doenças como câncer (CHO, 2007; MA et al., 2009;), mal de chagas (PABA et al., 2004) e para a comparação dos padrões de proteína da catarata humana (BENNETT et al., 2010). No campo da nefrologia (THONGBOONKERD, 2004).

DESENVOLVIMENTO DE DROGAS

O desenvolvimento de drogas é baseado geralmente no *up-regulate* ou *down-regulate* que uma atividade específica implicou na patogênese da doença ou no efeito colateral dos tratamentos associados. As maiorias de drogas exercem seus efeitos em proteínas (SCHLAEPI & WOOD, 2000). A estratégia de trabalhar com o gene usado foi: uma lesão genética específica é identificada e as mudanças

resultantes na estrutura, na função, ou na expressão da proteína elucidada, de modo que uma droga para neutralizar ou corrigir tais mudanças para que possa ser projetada. Um exemplo é o desenvolvimento de um inibidor de tirosina quinase da de BCR-ABL produzidas por pacientes com leucemia mieloide crônica (DRUKER & LYDON, 2000). Similarmente, a identificação da bio-atividade de uma proteína que seja receptiva em um processo biológico conduz ao projeto das drogas para manipular estas propriedades, pelo uso de neutralizar anticorpos ou inibidores de tirosina quinase do receptor para inibir a angiogênese induzida pelo fator endotelial vascular do crescimento em tumores (SCHLAEPPI & WOOD, 2000).

O desafio dos estudos utilizando a proteômica encontra-se ainda em identificar as moléculas alvo. Uma análise detalhada de 51 drogas mostrou que agrupar mecanismos está refletido nos efeitos na proteína, (ANDERSON & ANDERSON, 1998) e os investimentos substanciais foram feitos em tecnologia proteômica por companhias farmacêuticas e de biotecnologia. Somente alguns mil genes humanos são prováveis candidatos a ser alvos apropriados, (DREWS, 1996).

BLACKSTOCK & WEIR (1999) propuseram que a proteômica aplicada na área farmacêutica (embora igualmente válido para outras áreas biomédicas) sendo dividida em proteômica de expressão e mapeamento celular ou proteômica de interação, tendo um papel distinto no processo geral da descoberta de uma droga.

A proteômica de mapeamento celular tem o objetivo de estudar interações de proteína-proteína (Interatoma) caracterizando sistematicamente os componentes de complexos proteínicos e construindo um mapa de chaves e das interações celulares que podem ser importantes no processo da doença ou no mecanismo da ação de uma droga (LAMOND & MANN, 1997). Pelo uso de anticorpos específicos ou de marcadores introduzidos artificialmente, as proteínas específicas podem ser isoladas e todas as proteínas associadas podem ser identificadas rapidamente por espectrometria de massas. A escolha do objetivo da análise dos complexos de multi-proteínas pode revelar funções prováveis de proteínas específicas mais rapidamente e indicar estudos biológicos apropriados (LAMOND & MANN, 1997).

A proteômica perfila a expressão da proteína em uma célula sobre vários estímulos, na busca de marcadores responsáveis da droga e da toxicologia. Esta aproximação tem formado parte do programa de Desenvolvimento Terapêutico no Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos, onde 3989 compostos foram selecionados de encontro a um painel de 60 linhagens celulares, e sua farmacologia molecular foi caracterizada por eletroforese bidimensional (MYERS et al., 1997). Entretanto, a proteômica da expressão deve competir com os análogos genômicos da expressão diferencial do gene e de tecnologias de hibridização baseadas em chips. Por exemplo, com um microchip do ADN (IYER et al., 1999) as mudanças na expressão de 8613 genes em fibroblastos humanos que respondem ao soro foram examinados. Tais tecnologias fornecem resultados rápidos e são menos laboriosos do que as abordagens proteômicas correspondentes, mas, devido a baixa correlação entre o mRNA e o produto da proteína, por tanto o importante é o valor elevado na informação da proteína, um investimento substancial está sendo feito para automatizar operações em grande escala da proteômica. Claramente, as abordagens genômicas e proteômicas complementam-se nos termos da informação produzida e suas vantagens e desvantagens relativas.

Além disso, para alcançar a seleção, que são importantes no processo clínico os estudos de validação e de toxicidade do alvo. Um exemplo clássico de validação é o estudo que mostra as ações de redução dos índices de colesterol pela

lovastatina que afeta as proteínas envolvidas com o metabolismo do colesterol (ANDERSON et al., 1991).

AICHER et al., (1998) demonstraram nas avaliações dos mecanismos de toxicidade da ciclosporina, a diminuição da expressão renal da proteína ligadora de cálcio em receptores humano transplante renal e com nefrotoxicidade, que pode ser implicado nos efeitos colaterais tubulares da calcificação desta droga.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A proteômica na pesquisa clínica além de fornecer um conjunto potente de ferramentas para o estudo em larga escala da função genética diretamente ao nível protéico, tem como objetivo a comparação, a nível molecular, o nível protéico celular em situações normais e patológicas. O estudo da espectrometria de massas das proteínas separadas por gel bidimensional está conduzindo a um renascimento nas abordagens bioquímicas sobre a função protéica. A caracterização protéica irá a continuar em rendimento, sensibilidade e alcance.

Importantes avanços na pesquisa clínica vêm-se desenvolvendo usando estas ferramentas proteômicas, que serão a chave para novas descobertas de drogas e tratamentos de doenças que atingem este século.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq e à FAPESP pelo auxílio financeiro e concessão de bolsas.

REFERÊNCIAS

AEBERSOLD, R.; HOOD, L. E.; WATTS, J. D. [Equipping scientists for the new biology](#). **Nature Biotechnology**, v. 18, p. 359, 2000.

AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature**, v. 402, p. 198-207, 2003.

AICHER, L.; WAHL, D.; ARCE, A.; GRENET, O.; STEINER, S. New insights into cyclosporine A nephrotoxicity by proteome analysis. **Electrophoresis** v. 19, p. 1998–2003, 1998.

ALFENAS, A. C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins**. Viçosa: UFV, 1998, p 574.

ANDERSON, N. G.; ANDERSON, N. L. Twenty years of Two-dimensional electrophoresis: past, present and future. **Electrophoresis**, v. 17, p. 443-453, 1996.

ANDERSON, N. L.; ANDERSON, N. G. Proteome and proteomics: New technologies, new concepts, and new words. **Electrophoresis**., v.19, p. 1853–61, 1998

ANDERSON, N. L.; ESQUER-BLASCO, R.; HOFMANN, J. P.; ANDERSON, N. G. A twodimensional gel database of rat liver proteins useful in gene regulation and drug effects studies. **Electrophoresis** ., v. 12, p. 907–30, 1991.

ARDREY, R. E. **Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: An Introduction**, Wiley: Huddersfield, 296p, 2003,

ATKINS, P.; JONES, L. **Princípios de química**: questionando a vida moderna e o médio ambiente. Porto Alegre: Bookman, 914 p, 2001.

BAIROCH, A., APWEILER, R. The SWISS-PROT protein sequence data bank and its supplement TrEMBL in 1998. **Nucleic Acids Research.**, v. 26, p. 38–42, 1998.

BANKS, R. E.; DUNN, M. J.; HOCHSTRASSER, D. F.; SANCHEZ, J.; BLACKSTOCK, W.; PAPPIN, D. J.; SELBY, P. J. Proteomics: new perspectives, new biomedical opportunities. **LANCET.**, v. 356, p. 1749-1756.

BENNETT, K. L.; FUNK, M.; TSCHERNUTTER, M.; BREITWEISER, F. P.; PLANAYAVSKY, M.; MOHIEN, C. U.; MULLER, A.; TRAJANOSKY, Z.; COLINGE, J.; SUPERTI-FURGA, G.; SCHMIDT-ERFURTH, U. Proteomic analysis of human cataract aqueous humour: comparison of the one-dimensional gel LCMS with two-dimensional LCMS of unlabelled and iTRAQ®-labelled specimens. **J. Proteomics.**, 2010.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Bioquímica**. 5ed: Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 2004. p.1059.

BHATTACHARYA, S. H.; GAL, A. A.; MURRAY, K. K. Laser capture microdissection MALDI for direct analysis of archival tissue, **J Proteome Res.**, v. 2, p. 95–98, 2003.

BJELLQVIST, B., EK, K.; RIGHETTI, P. G.; GIANAZZA, E.; GÖRG, A.; WESTERMEIER, R.; POSTEL, W. Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: Principle, methodology and some applications. **J Biochemycal Biophysical Methods.** v. 6, p. 317-339, 1982.

BLACKSTOCK, W. P.; WEIR, M,P. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. **Trends of Biotechnology.**, v.17, p. 121–27, 1999.

BURLEY, S. K.; ALMO, S. C.; BONANNO, J. B.; CAPEL, M.; CHANCE, M. R.; GAASTERLAND, T.; LIN, D.; SALI, A.; STUDIER, F. W.; SWAMINATHAN, S. Structural genomics: beyond the human genome project. **Nature Genetics**, v. 23, p. 151-157, 1999.

CASH, P. Proteomics: the protein revolution. **Biologist.** v. 2, p. 49, 2002.

CELIS, J. E.; GROMOV, P.; ØSTERGAARD, M.; MADSEN, P.; HONORÉ, B. DEJGAARD, K.; OLSEN, E.; VORUM, H.; KRISTENSEN, D. B.; GROMOVA, I.; HAUNSØ, A.; VAN DAMME, J.; PUYPE, M.; VANDEKERCKHOVE, J.; HOLM RASMUSSEN, H. Human 2-D PAGE databases for proteome analysis in health and disease: <http://biobase.dk/cgi-bin/celis>. **FEBS Letters.**, v. 398, p. 129-134, 1996.

CHAURAND, P.; SANDERS, M. E.; JENSEN, R. A.; CAPRIOLI, R. M. Proteomics in diagnostic pathology: Profiling and imaging proteins directly in tissue sections, **Am. J. Pathol.**, v. 165, p. 1057–1068, 2004).

CHO, W. C. Contribution of oncoproteomics to cancer biomarker discovery. **Mol. Cancer.**, v. 6, p. 25, 2007.

CHROMY, B. A.; PERKINS, J.; HEIKBRINK, J. L.; GONZALES, A. D.; MURPHY, G. A.; FITCH, J. P.; MCCUTCHEM-MALONEY, S. L. Proteomic characterization of host response to *Yersinia pestis* and near neighbours. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 320, p. 474-479, 2004

CORTHALS, G. L.; WASINGER, V. C.; HOCHSTRASSE, D. F.; SANCHEZ, J. C. The dynamic range of protein expression: A challenge for proteomic research. **Electrophoresis**, v. 21, p. 1104-1115, 2000.

DAMERVAL, C.; DE VIENNE, D.; ZIVY, M.; THIELLEMENT, H. Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. **Electrophoresis**, v. 7, p. 52-54, 1986.

DE HOFFMANN, E.; CHARETTE, J.; STROOBANT, V. **Mass spectrometry: principles and applications**. Paris: Masson éditeur, 1996, p. 340.

DE SOUSA, M. V.; FONTES, W.; RICART, C. A. Análise de Proteomas: O despertar da era pós-genômica. Revista on line-**Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. p. 12-14. 2003.

DI CIERO, L.; BELLATO, C. M. PROTEOMA: Avanços Recentes em Técnicas de Eletroforese Bidimensional e Espectrometria de Massas. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. n. 29, p. 158-164. 2003.

DREWS, J. Genomic sciences and the medicine of tomorrow. **Nature Biotechnology.**, v. 14: 1516–18. 1996

DRUKER, B. J.; LYDON, N. B. Lessons learned from the development of an Abl tyrosine kinase inhibitor for chronic myelogenous leukemia. **Journal of Clinical Investigation.**,v. 105, p. 3–7, 2000.

FENN, J. B.; MANN, M.; MENG, C.K., WONG, S. F., WHITEHOUSE, C. M. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. **Science.**, v. 246, p. 64–71, 1989.

FEY, S.; LARSEN, P. 2D or not 2D. **Current Opinion in Chemical Biology**. n.5, p. 26-33, 2001.

GALDOS, A. C. R. **Análise proteômica do saco vitelino de bovinos**. [Proteomic analysis of bovine yolk sac]. 2009. 111 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

GODOVAC-ZIMMERMANN, J; BROWN, L. R. Perspectives for mass spectrometry and functional proteomics. **Mass Spectrometry Reviews.**, v. 20, p. 1-57, 2001.

GONZÁLEZ-BUITRAGO, J. M. Multiplexed testing in autoimmunity laboratory, **Clin Chem Lab Med.**, v. 44, p. 1169–1174, 2006.

GONZÁLEZ-BUITRAGO, J. M., **Proteómica clínica**, SEQC, Barcelona (2007).

GONZÁLEZ-BUITRAGO, J. M., FERREIRA, L.; LORENZO, I. Urinary proteomics, **Clin Chim Acta.**, v. 375, p. 49–56, 2007.

GÖRG, A.; KLAUS, A.; LÜCK, C.; WEILAND, F. Two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients for proteome analysis: A laboratory manual. Disponivel em: <<http://www.wzw.tum.de/blm/deg/>>. Acesso em: 3 agosto 2010.

GÖRG, A.; POSTEL, W.; GÜNTHER, S. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. **Electrophoresis**. v. 9, p. 531-546, 1988.

GRAVES, P.R.; HAYSTEAD, T.A.: Molecular biologist's guide to proteomics. **Microbiology Molecular Biology Reviews**, v. 66, p. 39-63, 2002.

GREEN, R. D.; QURESHI, M. A.; LONG, J. A.; BURFENING, P. J.; HAMERNIK, D. L. Identifying the Future Needs for Long-Term USDA Efforts in Agricultural Animal Genomics. **International Journal of Biological Sciences**, v. 3, n. 3, p. 185-191, 2007.

GROSS, B.A. Conf. Proc. IEEE Eng. **Med. Biol. Soc. BioMEMs.**, v. 7, p. 5129, 2004.

GYGI, S. P.; RIST, B.; GERBER, S. A.; TURECEK, F.; GELB, M. H.; AEBERSOLD, R. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. **Nature biotechnology**, v. 17, n. 10, p. 994-999, 1999.

HAGER, J.W. [Recent trends in mass spectrometer development](#). **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 378, n. 4, p. 845-850, 2004.

HERNANDEZ, A. SM.; SAN MIGUEL, R.; MARTÍN-GIL, F. J. Importancia de las aplicaciones clínicas de la Proteómica. **Revista del Laboratorio Clínico**, v. 3, n. 1, p. 40-48, 2010.

HOCHSTRASSER, D. F., APPEL, R. D., GOLAZ, O., PASQUALI, C., SANCHEZ, J.C., BAIROCH, A. Sharing of worldwide spread knowledge using hypermedia facilities and fast communication protocols (Mosaic and World Wide Web): the example of ExPASy. **Methods of Information in Medicine**; v. 34, p. 75–78, 1995.

HOCHSTRASSER, D.; APPEL, R. The 1999 SWISS-2DPAGE database update. **Nucleic Acids Res.** v.28, p.286-288, 2000.

HOCHSTRASSER, D. F. Proteome in perspective. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 36, p. 825–36, 1998.

HOOGLAND, C.; SANCHES, J.; TONELLA, L. BINZ, P.; BAIROCH, A.;

ISFOR, R. J. Proteomics analysis of striated muscle. **Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sci.** v. 771, p. 155-165, 2002.

ISSAQ, H. J.; CONRAD, T. P.; PRIETO, D.A.; TIRUMALAI, R.; VEENSTRA, T. D. SELDITOF MS for diagnostic proteomics, **Anal Chem.**, v. 75, p. 148–155, 2003.

IYER, V. R.; EISEN, M. B.; ROSS, D. T.; SCHULER, G.; MOORE, T.; LEE, J. C. F.; TRENT, J. M.; STAUDT, L. M.; HUDSON, J. JR.; BOGUSKI, M. S.; LASHKARI, D.; SHALON, D.; BOTSTEIN, D.; BROWN, P. O. The transcriptional program in the response of human fibroblasts to serum. **Science.**, v. 283, p. 83–87, 1999.

JAIN, K. K. Role of pharmacoproteomics in the development of personalized medicine, **Pharmacogenomics.**, v. 5, p. 331–336, 2004.

JAMES, P. Protein identification in the post-genome era: the rapid rise of proteomics. **Quarterly reviews of biophysics**, v. 30, p. 279-331, 1997.

KARAS, M., HILLENKAMP, F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. **Analytical Chemistry.**, v. 60, p. 2299–301, 1988.

KATZ-JAFFE, M.G.; MCREYNOLDS, S.; GARDNER, D.K.; SCHOOLCRAFT, W.B. The role of proteomics in defining the human embryonic secretome. **Molecular Human Reproduction.**, v. 15, n. 5, p. 271-277, 2009.

KLOSE, J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A Novel Approach to Testing for Induced Point Mutations in Mammals. **Humangenetik**, v. 26, p. 231-243, 1975.

LAGE, H. Proteomics in cancer cell research: An analysis of therapy resistance, **Pathol Res Pract.**, v. 200, p. 105–117, 2004.

LAMOND, A.I.; MANN, M. Cell biology and the genome projects: a concerted strategy for characterizing multiprotein complexes by using mass spectrometry. **Trends in Cell Biology.**, v. 7, p 139–42. 1997.

LE NAOUR, F. Contribution of proteomics to tumor immunology, **Proteomics.**, v. 1, p. 1295–1302, 2001.

LINK, A. J.; ENG, J.; SCHIELTZ, D. M.; CARMACK, E.; MIZE, G. J.; MORRIS, D. R.; GARVIK, B. M.; YATES, J. R., 3rd. Direct analyses of protein complexes using mass spectrometry. **Nature Biotechnology**, v. 17, n. 7, p. 676-682, 1999.

MA, Y.; PENG, J.; HUANG, L.; LIU, W.; ZHANG, P.; QIN, H. Searching for serum tumor markers for colorectal cancer using 2D-DIGE approach. **Electrophoresis.**, v. 30, p. 2591-2599, 2009.

MOORE, G. E.; MINOWADA, J. Historical progress and the future of human cell culture research, **Hum Cell.**, v. 5, p. 313–333, 1992.

MYERS, T. G.; ANDERSON, N. L.; WALTHAM, M.; BUOLAMWINI, J. K.; SCUDIERO, D. A.; PAULL, K. D.; SAUSVILLE, E. A.; WEINSTEIN, J. N.; A protein expression database for the molecular pharmacology of cancer. **Electrophoresis**, v. 18, p. 647–53, 1997.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. 3 ed. New York: WH Freeman and Company, , 2002. 117 p.

NEUBAUER, G.; KING, A.; RAPPSILBER, J.; CALVIO C.; WATSON, M.; AJUH P.; SLEEMAN, J.; LAMOND, A.; MANN, M. Mass spectrometry and STdatabase searching allows characterization of the multi-protein spliceosome complex. **Nature Genetics**., v. 20, p. 46–50, 1998.

O'FARRELL, P. H. High Resolution Two-Dimensional Electrophoresis of Protein. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 250, n. 10, p. 4007-4021, 1975.

PABA, J.; SANTANA, J. M.; TEIXEIRA, A. R. L.; FONTES, W.; SOUSA, M. V.; RICART, C. A. O. Proteomic analysis of the human pathogen *Trypanosoma cruzi*. **Proteomics**., v. 4, p. 1052-1059, 2004.

PANDEY, A.; MANN, M. Proteomics to study genes and genomes. **Nature**, Massachusetts, v. 405, n. 6788, p.837-846, 2000.

PETRICIOIN, E. F.; RAJAPASKE, V.; HERMAN, E. H.; AREKANI, A. M., ROSS, S.; JOHANN, D. D. Toxicoproteomics: Serum proteomic pattern diagnostics for early detection of drug induced cardiac toxicities and cardioprotection, **Toxicol Pathol.**, v. 32, p. 122–130, 2004.

PURETZKY, A. A.; GEOHEGAN, D. B. Gas-phase diagnostics and LIF imaging of 3-hydroxypicolinic acid MALDI matrix plumes. **Chem. Phys. Lett.** v. 286, p. 425-432, 1998.

QUALTIERI, A.; PERA, M. L.; URSO, E.; BONO, F.; VALENTINO, P.; SCORNAIENCHI, M. C.; QUATTRONE, A. Two-dimensional electrophoresis of peripheral nerve proteins: optimized sample preparation. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 159, p. 125-133, 2007.

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

RABILLOUD, T. Solubilization of proteins for electrophoresis analysis. **Electrophoresis**, v. 17, p. 813-829, 1996.

RABILLOUD, T. Use of thiourea to increase the solubility the membrane proteins in Two-Dimensional electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 19, p. 758-760, 1998.

RABILLOUD, T. Detecting proteins separated by 2-D gel electrophoresis. **Anal. Chem.**, v. 72, p. 48A-55A, 2000.

RABILLOUD, T. Two dimensional gel electrophoresis in proteomics: old, old fashioned, but still climbs up the mountains. **Proteomics**, v. 2, p. 3-10, 2002.

RACHAMANDRAN, C.; GORIS, J.; WAELKENS, E.; MERLEDEVE, W.; WALSH, D. The interrelationship between cAMP-dependent alpha and beta subunit phosphorylation in the regulation of phosphorylase kinase activity. Studies using subunit specific phosphatases. **Journal Biology Chemycal**, v. 262, p. 3210-3218, 1987.

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. **Comunicado Técnico**, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, n. 136, p. 1-12, 2005.

ROMEO, M. ESPINA, J. V.; LOWENTHAL, M. H.; ESPINA, B.; PETRICON, E. F.; LIOTTA, L. A. CSF proteome: A protein repository for potential biomarker identification, **Expert Rev Proteomics**, v. 2, p. 57-70, 2005.

ROUT, M. P.; AITCHISON, J.D.; SUPRAPTO, A.; HJERTAAS, K.; ZHAO, Y.; CHAIT, B. T. The yeast nuclear pore complex: composition, architecture, and transport mechanism. **Journal of Cell Biology**, 2000; 148: 635-51.

SANTOS, P. M.; TEIXEIRA, M. C.; CORREIA, I. S. A análise proteômica quantitativa na revelação de mecanismos de resposta a stresse químico em microorganismos. **Boletim de Biotecnologia**, n. 77, p. 7-17, 2004.

SCHLAEPPI, J. M.; WOOD, J.M. Targeting vascular endothelial growth factor (VEGF) for anti-tumor therapy, by anti-VEGF neutralizing monoclonal antibodies or by VEGF receptor tyrosine-kinase inhibitors. **Cancer Metastasis Reviews**. v. 18, p. 473-81, 2000.

SHAW, D. J. **Electrophoresis**. London: Academic Press. 1969, p.144.

SIZOVA, D.; CHARBAUT, E.; DELALANDE, F.; POIRIER, F.; HIGH, A. A.; PARKER, F.; DORSSELAER, A. V.; DUCHESNE, M.; DIU-HERCEND, A. Proteomics analysis of brain tissue from an Alzheimer's disease mouse model by two-dimensional difference gel electrophoresis. **Neurobiology of Aging**, v. 28, p. 357-370, 2007.

STRYER, L.; TYMOCZKO, J. L.; BERG, J. M. **Bioquímica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 5 Ed. 2004. p. 513.

STULTS, J. T.; ARNOTT, D. Proteomics. **Methods Enzymology**, v. 402, p. 245-289, 2005.

TAVARES, M. F. M. Eletroforese Capilar: conceitos básicos. **Química Nova**. v.19, n. 2, p. 173-181, 1996.

THONGBOONKERD, V. Proteomics in Nephrology: Current Status and Future Directions. **American Journal of Nephrology**, v. 24, p. 360-378, 2004.

TISELIUS, A. A new apparatus for Electrophoretic analysis of colloidal mixtures. **Transactions of the Faraday Society**, v. 33, p. 524-531, 1937.

TWYMAN, R. M. **Principles of Proteomics**, New York: BIOS Scientific, 2004. 400 p.
UETZ, P.; GIOT, L.; CAGNEY, G.; MANSFIELD, T. A.; JUDSON, R. S.; KNIGHT, J. R.; LOCKSHON, D.; NARAYAN, V.; SRINIVASAN, M.; POCHART, P.; QURESHI-EMILI, A.; LI, Y.; GODWIN, W.; CONOVER, D.; KALBFLEISCH, T.; VIJAYADAMODAR, G.; YANG, M.; JOHNSTON, M.; FIELDS, S.; ROTHBERG, J. M. A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Sccharomyses cerevisiae*. **Nature**, v. 403, n. 6770, p. 623-627, 2000.

USAMI, M.; MITSUNAGA, K.; NAKAZAWA, K. Two-dimensional electrophoresis of protein from cultured postimplantation rat embryos for development toxicity studies. **Toxicology in Vitro**, v. 21, p. 521-526, 2007.

WASHBURN, M. P.; ULASZEK, R. R.; YATES, J. R.; 3rd. Reproducibility of quantitative proteomics analyses of complex biological mixtures by multidimensional protein identification technology. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 19, p. 5054-5061, 2003.

WATSON, J. T. **Introduction to mass spectrometry**, United States, Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1997, p. 496.

WESTERMEIER, R.; NAVEN, T. **Proteomics in Practice**: A laboratory Manual of proteome analysis, Germany, Weinheim: Wiley-VCH Verlag-GmbH., 2002, p. 329.

WILKINS, M. R.; PASQUALI, C.; APPEL, R. D.; OU, K.; GOLAZ, O.; SANCHEZ, J. C.; JAN, J. X.; GOOLEY, A. A.; HUGHES, E.; HUMPHERY-SMITH, I.; WILLIAMS, K. L.; HOCHSTRASSER, D. F. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. **Nature Biotechnology**, v.14, p. 61-65, 1996.

WILKINS, M. R.; WILLIAMS, K. L.; APPEL, R. D.; HOCHSTRASSER, D. **Proteome research**: new frontiers in functional genomics. Germany: Springer-Verlag, 1997. p 243.

ZENOBI, R.; KNOCHENMUSS, R. Ion formation in MALDI mass spectrometry., **Mass Spectrom. Rev.**, v. 17, p. 337-366, 1998.

ZHENG, P. P., LUIDER, T. M.; PIETERS, R.; AVEZAAT, C. J.; VAN DEN BENT, M. J.; SILLEVIS SMITT, P. A. Identification of tumor-related proteins by proteomic analysis of cerebrospinal fluid from patients with primary brain tumors, **J Neuropathol Exp Neurol.**, v. 62, p. 855–862, 2003.