

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



**Erich de Castro Dias**

**“PROTEOMA COMPARATIVO DA MEDULA ESPINHAL LOMBAR DE RATOS  
SUBMETIDOS À LESÃO NERVOSA PERIFÉRICA DURANTE O PERÍODO PÓS-  
NATAL”**

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato (a)  
ERICH CASTRO DIAS  
[Signature]  
aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao  
Instituto de Biologia para  
obtenção do Título de Mestre em  
Biologia Funcional e Molecular,  
na área de Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. José Camillo Novello

Campinas, 2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

**D543p** Dias, Erich de Castro  
Proteoma comparativo da medula espinhal lombar de ratos submetidos à lesão nervosa periférica durante o período pós-natal / Erich de Castro Dias. – Campinas, SP: [s.n.], 2009.

Orientador: José Camillo Novello.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Proteoma. 2. Proteínas. 3. Medula espinhal. 4. Ratos neonatos. 5. Nervos periféricos – Ferimentos e lesões. I. Novello, Jose Camillo. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

**Título em inglês:** Comparative proteome of rat's spinal cord submitted to a peripheral nerve injury in postnatal period.

**Palavras-chave em inglês:** Proteome; Proteins; Spinal cord; Neonate rats; Peripheral nerves – Wounds and injuries.

**Área de concentração:** Bioquímica.

**Titulação:** Mestre em Biologia Funcional e Molecular.

**Banca examinadora:** José Camillo Novello, Cláudio Chrysostomo Werneck, Carlos Alberto Labate.

**Data da defesa:** 21/09/2009.

**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Funcional e Molecular.

Campinas, 21 de Setembro de 2009

**BANCA EXAMINADORA**

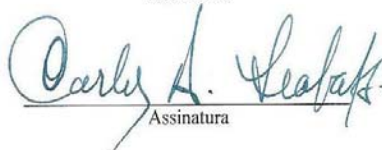
Prof. Dr. José Camillo Novello (Orientador)

  
Assinatura

Prof. Dr. Claudio Chrysostomo Werneck

  
Assinatura

Prof. Dr. Carlos Alberto Labate

  
Assinatura

Prof. Dr. Sérgio Marangoni

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Profa. Dra. Claudia Herrera Tambeli

\_\_\_\_\_  
Assinatura

*“Science is an integral part of culture. It's not this foreign thing, done by an  
arcane priesthood. It's one of the glories of the human intellectual  
tradition.”*

**Stephen Jay Gould**

*“Emancipate yourself from mental slavery, none but ourselves can free our mind.”*

**Bob Marley**

Dedico essa dissertação à minha mãe e à  
minha avó pelo esforço e carinho desde a  
minha criação até esta minha formação.

## **AGRADECIMENTOS:**

À UNICAMP, universidade que eu amo e no qual passei os melhores anos da minha vida.

Em especial ao Dr. Daniel Martins de Souza, ou melhor, ao Java, pelo auxílio e suporte durante todo o desenvolvimento deste trabalho, que apesar de não ter sido o orientador que assina, sempre foi aquele que ensina, mesmo do outro lado do mundo.

Ao Prof. Dr. José Camillo Novello pela oportunidade à mim dada de ingressar ao laboratório de proteômica e pela confiança demonstrada durante esses três anos.

Ao Prof. Dr. Francesco Langone que abriu as portas de seu laboratório de neurologia e a quem devo muito por conseguir atingir os objetivos desse trabalho.

À Nani, minha melhor amiga, que muito me ajudou e me aguentou durante todo esse trabalho, pela companhia divertida em dias de experimentos longos, carinho, atenção, capacidade de planejamento e inteligência admirável que muito me foi útil.

Ao Daniel e ao Henrique (Guaxinim, Bigode, Bólinhos), que, sendo a nata do O2D, mesmo não valendo 1 real, serão meus amigos para vida toda.

À galera da República Subako de Kobra, local em que eu morei me divertindo durante muitos anos, onde estão meus amigos de Campinas e o Subakinho, o cão que tanto gosto.

Ao Zélo, brother e companheiro de jogos do Corinthians e de aventuras com os Gaviões.

Aos meus amigos de Jundiaí pelo incentivo de que um dia terminaria o mestrado.

À equipe do Laboratório de Neurologia, em especial ao André Vieira (Arroz) que muito me auxiliou na dissertação e foi fundamental nas cirurgias que tornaram viável esse estudo.

Ao Prof. Dr. Claudio Chrysostomo Werneck por sempre estar presente e disposto a ajudar perante qualquer eventualidade.

Ao Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira pela imensa contribuição durante o exame de qualificação.

À Dr. Thaís Caroline Dombroski, técnica de espectrometria de Massas do LNLS, por toda a sua ajuda e disponibilidade na utilização e processamento dos dados do MALDI Q-ToF.

Aos meus amigos de laboratório Neto, Shin, Hugo, Bruno, Karina, Denise, Tallita, Marta, Natália que, pelo bom humor e simpatia, fizeram o trabalho ser muito mais divertido.

Às secretárias do Departamento de Bioquímica, Marina, e da BFM, Andréia, pela simpatia e ajuda na burocracia que não é pouca.

À Profa. Dra. Sílvia Viccari Gatti pela excelente iniciação científica e pelo ensinamento de uma redação técnica, a qual muito utilizei durante essa dissertação.

Aos órgãos financiadores, pela viabilização do estudo.

Obrigado!

# ÍNDICE GERAL

RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUÇÃO.....	3
1.1 Lesão de nervo periférico .....	3
1.2 Medula espinhal.....	5
1.3 Análise proteômica .....	7
1.4 Eletroforese de duas dimensões em gel de poliacrilamida.....	8
1.4.1 Detecção das proteínas separadas por 2DE.....	12
1.5 Identificação das proteínas por espectrometria de massas.....	14
1.6 Estudo comparativo de expressão de proteínas.....	18
2. OBJETIVOS.....	20
2.1 Objetivo geral.....	20
2.2 Objetivos específicos .....	20
3. JUSTIFICATIVA.....	21
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	22
4.1 Material de estudo .....	22
4.2 Condições de acondicionamento.....	22
4.3 Procedimentos cirúrgicos.....	22
4.4 Extração e quantificação das proteínas.....	24
4.5 Eletroforese de duas dimensões em gel de poliacrilamida.....	25
4.5.1 Procedimentos para 2de.....	25
4.5.1.1 Focalização isoeletrica (IEF) .....	25
4.5.1.2 Tratamento das <i>IPG strips</i> .....	26



4.5.1.3	Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	27
4.5.2	Detecção das proteínas.....	27
4.6	Análise quantitativa da expressão protéica .....	28
4.7	Identificação dos <i>spots</i> .....	29
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	31
5.1.	Estabelecimentos de diretrizes de âmbito amostral .....	31
5.2	Padronização da eletroforese de duas dimensões e da detecção dos <i>spots</i> .....	35
5.3	Análise do perfil proteômico nas faixas de pH 3-10NL e 4-7L.....	39
5.4	Análise Computacional Das Imagens .....	42
5.5	Identificação das proteínas por Ms .....	47
5.5.1	Identificação das proteínas observadas na faixa de pH 4-7L.....	48
5.5.2	Identificação das proteínas observadas na faixa de pH 3-10NL .....	60
6.	CONCLUSÕES.....	67
7.	PERSPECTIVAS .....	68
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	69

## Índice de Figuras

Figura 1: Mapa proteômico padrão .....	10
Figura 2: Representação de <i>narrow range strips</i> .....	12
Figura 3: Identificação proteica por <i>Peptide Mass Fingerprinting</i> .....	15
Figura 4: Esquema da cirurgia de secção de nervo ciático .....	23
Figura 5: Fotografia da região da medula espinhal coletada.....	24
Figura 6: Comparação dos perfis eletroforéticos de proteínas medulares .....	33
Figura 7: Visualização do perfil eletroforético das proteínas medulares .....	34
Figura 8: Perfis bidimensionais obtidos utilizando as <i>strips</i> 3-10 NL e 4-7L.....	36
Figura 9: Perfil bidimensional obtido utilizando a <i>strip</i> 6-11L .....	37
Figura 10: Perfil proteômico de proteínas medulares na faixa 3-10NL.....	40
Figura 11: Perfil proteômico de proteínas medulares na faixa 4-7L .....	41
Figura 12: Imagem do programa MELANIE 5.02 .....	43
Figura 13: Histogramas representativos dos 7 spots estatisticamente diferentes na faixa de pH 4-7L .....	45
Figura 14: Histogramas representativos dos 6 spots estatisticamente diferentes na faixa de pH 3-10NL .....	46
Figura 15: Espectro obtido por MALDI-ToF da Anexina A6 .....	51
Figura 16: Espectro obtido por MALDI Q-ToF da Albumina .....	53
Figura 17: Espectro obtido por MALDI Q-ToF da Albumina .....	54
Figura 18: Espectro obtido por MALDI-ToF da PDI A3 .....	55
Figura 19: Espectro obtido por MALDI-ToF da PDI A3 .....	55
Figura 20: Espectro obtido por MALDI-ToF da UchL1 .....	57
Figura 21: Espectro obtido por MALDI-ToF da Tubulina $\beta$ 5.....	59
Figura 22: Espectro obtido por MALDI Q-ToF da GSTM1.....	62
Figura 23: Espectro obtido por MALDI Q-ToF da G6PD .....	64
Figura 24: Espectro obtido por MALDI Q-ToF da Catalase .....	65

## Índice de Tabelas

Tabela 1: Proteínas identificadas por MALDI-ToF da faixa de pH 4-7L com $p > 0,05$ .....	49
Tabela 2: Proteínas identificadas por MALDI-ToF da faixa de pH 4-7L .....	50
Tabela 3: Proteínas identificadas por MALDI Q-ToF da faixa de pH 4-7L.....	51
Tabela 4: Proteínas identificadas por MALDI Q-ToF da faixa de pH 3-10NL .....	61

## Abreviaturas:

- ☞ 2-DE: Eletroforese de duas dimensões em gel de poliacrilamida
- ☞ CBB: Coomassie Blue (R-250)
- ☞ CBC: Coomassie Blue colloidal (G-250)
- ☞ DIGE: Difference Gel Electrophoresis (Gel de Eletroforese Diferencial)
- ☞ IEF: Isoeletrofocalização
- ☞ IPG: Immobilized pH Gradient (Gradiente imóvel de pH)
- ☞ MALDI-ToF: *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight* (Desorção e Ionização por Laser Assistida por Matriz - Tempo de Voo)
- ☞ MALDI-ToF/ToF: *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight/Time of flight* (Desorção e Ionização por Laser Assistida por Matriz - Tempo de Voo/ Tempo de Voo)
- ☞ MS: Espectrometria de Massas
- ☞ MS/MS: Espectrometria de Massas em série
- ☞ PAGE: Poliacrilamide Gel Electrophoresis (Eletroforese em Gel de Poliacrilamida)
- ☞ pI: Ponto Isoelétrico
- ☞ PMF: Peptide Mass Fingerprinting (Impressão digital das massas dos peptídeos)
- ☞ SDS: Dodecil Sulfato de Sódio
- ☞ SNC: Sistema Nervoso Central
- ☞ SNP: Sistema Nervoso Periférico

## RESUMO

Neurotraumas periféricos, situação recorrente atualmente na humanidade, resultam em reorganizações e modificações tanto do sistema nervoso periférico que foi lesado quanto do sistema nervoso central, mais especificamente da medula espinhal na tentativa de reparar o dano gerado.

O período pós-natal apresenta intensa plasticidade neuronal medular já que é o intervalo no qual a medula espinhal apresenta a maior capacidade de sofrer alterações e rearranjos dependentes de estímulos internos e externos, sendo assim, podem ocorrer modificações em seu desenvolvimento. Logo, este período é considerado ideal para estudos dos mecanismos envolvidos na degeneração e em possíveis reparos do tecido nervoso após um neurotrauma periférico.

Visando contribuir para a elucidação dos mecanismos de neurodegeneração, este trabalho propôs um enfoque proteômico, área que na era pós-genômica tornou-se essencial tanto para a compreensão dos mecanismos que regem um organismo quanto para a análise comparativa entre duas condições contrastantes no mesmo organismo. Utilizando-se uma combinação entre as duas técnicas mais clássicas e usuais em estudos de proteoma, a eletroforese de duas dimensões e a espectrometria de massas, estudou-se o perfil proteômico da medula espinhal de ratos com sete dias de vida em duas situações distintas, uma que sofreu axotomia do nervo ciático com dois dias de vida, e a outra que não sofreu tal lesão, com a finalidade de conhecer as proteínas diferencialmente expressas nas duas classes e sugerir suas prováveis funções biológicas. Dentre essas, foram identificadas proteínas responsáveis diretamente e indiretamente pela desintoxicação celular e combate as espécies reativas de oxigênio como a catalase, a glutathione S-transferase Mu1 e a glicose 6-fosfato 1-desidrogenase, além da proteína dissulfeto isomerase A3 que participa do processo oxidativo. Proteínas estruturais como a tubulina  $\beta$ -5 e a anexina A6 também foram identificadas. Infere-se, dessa forma, que essas e outras proteínas podem representar alvos moleculares importantes para futuros tratamentos visando à diminuição da degeneração e o reparo de uma lesão nervosa periférica.

## **ABSTRACT**

Peripheral neurotraumas are a common situation nowadays in humanity. These nerve damages results in reorganizations and modifications over the own injured peripheral nerve system and over the central nerve system, more specifically over the spinal cord due the attempt to repair the damage.

The post-natal period shows intense neuronal plasticity on spinal cord because the spinal cord ability to suffer alterations and rearrangements due internal and external stimuli, therefore maybe occur modifications in your development. Therefore, this period is ideal for study the involved mechanisms in nerve degeneration and nerve tissue repair after a neurotrauma.

Trying to contribute with the degeneration mechanisms elucidation, this study proposed a proteomic approach, field which in the post-genomic era has become essential for both, to understanding all the pathways which controls an organism as to comparative analysis between two different conditions of the same organism. Using the two most useful and classical techniques combination for proteomics labor, which are two dimension electrophoresis and mass spectrometry, was studied a seven days of life rat's spinal cord proteomic profile in two different situations: in the first, the rats had suffered sciatic nerve section with two days of life and other that the rats had not suffered any trauma in sciatic nerve. The purpose is to know the differentially expressed proteins in the two classes and suggest their probable biological functions. Among these, proteins directly responsible for the cell detoxification and combat the reactive oxygen species were identified, like a catalase, a Glutathione S-transferase Mu 1 and a Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase. Structural proteins like a  $\beta$ -5 Tubulin and Protein disulfide isomerase A3 were indentified too. Thus it, these and other proteins could represent important molecular targets to future treatments aiming the post trauma degeneration decrease and the peripheral nerve injury repair.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Lesão de nervo periférico

Recentes trabalhos vêm elucidando os mecanismos que coordenam a formação do sistema nervoso na embriogênese e em que período ocorre a maturação do mesmo.

Sabe-se que na classe Mammalia, a formação desse sistema está praticamente concluída no final do período intra-uterino, todavia a maturação continua após o nascimento (Eyre *et al.*, 2000; Buss *et al.*, 2007).

Na embriogênese, há a formação de uma quantidade bastante grande e diversa de neurônios. Estudos revelaram que estas células apresentam sensibilidade a fatores neurotróficos diversos e a competição por estes fatores é responsável pela seleção de neurônios que constituem circuitos funcionais (Kuno, 1990; Oppenheim, 1991; Korsching, 1993; Gordon, 1995; Levi-Montalcini, 2000; Bennete *et al.*, 2002).

Em adição, diversos estudos mostraram que durante o período pós-natal ocorrem fenômenos de neuroplasticidade e refinamentos do sistema nervoso, principalmente na medula espinhal (Avossa *et al.*, 2003; Bem Ari, 2001; Greensmith *et al.*, 2000; O'Donovan *et al.*, 1998), em que um número expressivo de neurônios motores, sensitivos e interneurônios espinhais formados na embriogênese são eliminados, inferindo-se que seja devido à competição por fatores neurotróficos, que são, conjuntamente com os neurotransmissores e matriz extracelular, responsáveis pela sobrevivência, maturação e organização funcional do sistema nervoso (Kashihara *et al.*, 1987; Levi-Montalcini, 1987; Kuno, 1990; Sendtner *et al.*, 1990; Oppenheim, 1991; Lowrie e Vrbová, 1992; Deckwerth e Johnson, 1993; Johnson e Deckwerth, 1993; Cellerino & Maffei, 1996; Greensmith e Vrbová, 1996; Pizzorusso & Maffei, 1996; Pettmann e Henderson, 1998; Whiteside *et al.* 1998; Oliveira *et al.*, 1997; Sanes & Lichtman, 1999; Sendtner, 2000; Beck, 2001; Keller-Peck *et al.*, 2001; Oliveira *et al.*, 2002; Banks & Noakes, 2002; Rezende, 2005).

Trabalhos anteriores apontam que neurônios motores e sensitivos de ratos e camundongos durante a primeira semana após o nascimento são vulneráveis a lesão

axonal, pois ainda se encontram em um período crítico do desenvolvimento. Considerando uma lesão no nervo ciático de um rato no dia do nascimento (P0), cerca de 75% dos neurônios sensitivos e 100% dos neurônios motores atingidos irão morrer. Essa vulnerabilidade diminui com o desenvolvimento do animal (Schmalbruch, 1984, 1987a, 1987b, 1988, 1990; Lowrie e Vrbová, 1992; Lowrie *et al.*, 1994; Rezende, 2005).

Durante a primeira semana de vida dos roedores, acredita-se que os fatores neurotróficos e a morte celular induzida pela axotomia de nervo periférico estejam intrinsecamente ligados, pois, nesta fase do desenvolvimento, os neurônios são dependentes de fatores derivados de seus respectivos alvos. Já na idade adulta, células não neurais presentes no próprio nervo poderiam prover esses fatores, evitando assim o número significativo de morte celular, fato que não acontece no início do desenvolvimento (Kashihara *et al.*, 1987; Kuno, 1990; Sendtner *et al.*, 1990; Lowrie e Vrbová, 1992; Sendtner *et al.*, 1992a,b; Yan *et al.*, 1993; Funakoshi *et al.*, 1993; Friedman *et al.*, 1995; Greensmith e Vrbová, 1996; Lowrie e Lawson, 2000; Oliveira *et al.*, 2002; Rezende, 2005).

Devido a essa importância, os fatores neurotróficos são alvos de diversos estudos *in vitro* e *in vivo* devido à necessidade de investigação de tratamentos para doenças neurodegenerativas e neurotraumas, situações que frequentemente acometem a população humana (Neuhaus *et al.*, 2003; Pradat, 2003; Salehi *et al.*, 2003; Rezende, 2005).

Lesões traumáticas de nervos periféricos (TPNI) ocorrem quando por algum motivo externo, o indivíduo tem seu nervo periférico seccionado e/ou esmagado. As causas disso podem ser desde batida, corte e perfuração até choque térmico ou elétrico (Robinson, 2000, 2004). Os mais comuns na população humana são traumas devido a acidentes automotivos ou lacerações por vidro, facas, metais ou qualquer outro objeto perfuro-cortante, assim como fraturas de ossos longos (Campbell, 2008).

Essas lesões resultam em profundas modificações e reorganizações do sistema nervoso central e periférico, tais como a degeneração de neurônios profundamente comprometidos, a tentativa de regeneração de alguns axônios lesados e ainda a reinervação do tecido afetado por outros ramos de axônios intactos

(Zochodne and Levy, 2005). Pode ocorrer também uma alteração das proteínas expressas que garantam a alteração da função de transmissão de impulsos para uma função de crescimento, como a tubulina, actina, GAP-43 (Fu e Gordon, 1997; Campbell, 2008).

Os mecanismos da plasticidade e reorganização dos circuitos da medula espinhal e a sua ligação com uma axotomia periférica são muito complexos, pois podem resultar em um benefício adaptativo, alterando a expressão de diversas proteínas que alterarão a função e a estrutura da árvore de axônios na região, fato que pode até regenerá-lo, no entanto essas alterações podem gerar malefícios para o indivíduo, entre esses estão diversos problemas colaterais, como dores, hiperreflexia etc. (Campbell, 2008).

Atualmente, este é um vasto campo de estudo, pois não há técnicas que garantam a redução da degeneração de neurônios afetados ou a total regeneração nervosa, sendo os principais estudos voltados à reestruturação e modificações que englobam também o sistema nervoso central, principalmente a medula espinhal.

## **1.2 Medula Espinhal**

Macroscopicamente, divide-se a medula espinhal em quatro áreas distintas: Cervical, Torácica, Lombar e sacral. Existem duas regiões bastante espessas quando se verifica a medula espinhal, que correspondem à intumescência cervical e a intumescência lombar. As intumescências cervical e lombar correspondem às áreas de conexão entre a medula e as raízes nervosas que formam os plexos braquial e lombosacral, os quais inervam respectivamente os membros superiores e inferiores (Machado, 2000).

A medula espinhal integra o sistema nervoso central juntamente com o encéfalo. Trata-se de uma região altamente organizada e complexa, sendo sede de informações relacionadas com diversas funções no organismo. Atua garantindo o perfeito funcionamento da motricidade somática e controlando as vísceras, devido a sua função como um canal de transmissão de impulsos nervosos provenientes desses



órgãos com destino cerebral e vice-versa (Jessel, 2000). Tratando-se de mamíferos, essa transmissão ocorre em posições específicas, como nas intumescências. O período pós-natal é de suma importância para a integração funcional desses circuitos, pois é um período no qual ocorre intensa neuroplasticidade medular, ou seja, que está sujeita a modificações morfológicas e funcionais devido a variações bioquímicas e sinais neurais. Sendo assim, o período pós-natal é o período crítico de neuroplasticidade, isto é, define-se como o intervalo de tempo no qual as informações externas (meio ambiente) e internas possuem grande capacidade de influenciar o desenvolvimento do sistema (Hensh, 2005; Ohno *et al*, 2005), fato que justifica o porquê de estudar os mecanismos que regem a medula espinhal justamente neste período de vida após submeter o indivíduo a algum tipo de neurotrauma periférico.

Devido à grande relevância clínica para o desenvolvimento de tratamentos e cirurgias corretivas em caso de neurotraumas, a elucidação dos mecanismos envolvidos na maturação morfofuncional, sobre a expressão de proteínas medulares em diferentes situações e quais as vias de transduções envolvidas na degeneração e na regeneração nervosa tornou-se imprescindível.

Mesmo com o avanço da era genômica, com muitos experimentos utilizando roedores, não elucidaram completamente as vias bioquímicas e moleculares da resposta mediada pela medula espinhal nestes casos de lesão (Pandey & Mann, 2000). Com o avanço da era pós genômica, o foco dos estudos está principalmente na tradução das sequências de DNA, isto é, em saber quais proteínas são expressas, e qual o papel que elas desempenham no funcionamento das células, tecidos e órgãos, papel esse, que é o foco nas mais diversas pesquisas, com o objetivo criar bancos de dados com informações estruturais e funcionais acerca de diversas proteínas, correlacionando-as com seus respectivos genes (Husi & Grant 2001).

Dessa forma, mostra-se relevante o estudo dos proteomas dos organismos, através de técnicas que investigam o produto final da tradução dos genes, isto é, as proteínas. Na era pós-genômica, as proteínas, passaram a ter uma significativa importância em todos os estudos que englobam o entendimento da atividade e funcionamento de um sistema orgânico, pois são as moléculas que medeiam todas as reações bioquímicas do organismo.

### 1.3 Análise Proteômica

Ao final da era genômica, o pensamento de que com o conhecimento da sequência gênica dos organismos todas as perguntas referentes a doenças, processos biológicos e expressão dos mais diversos caracteres encontrariam sua resposta foi desbancado. Pesquisadores depararam-se com a necessidade de compreender os processos que esses genes coordenavam, isto é, entender a “mensagem” que passavam. Para isso, seria necessário o conhecimento do complemento proteico do genoma. Wilkins e colaboradores em 1995 nomearam esse “complemento proteico do genoma” de proteoma.

O proteoma de um organismo é altamente mutável de acordo com as condições e estímulos a que o organismo está sendo exposto, fato esse, que difere do genoma, que é estático (Wilkins et al., 1999). Nota-se assim, que o estudo destas alterações, internas e externas, as quais um organismo está exposto é extremamente importante na investigação dos sistemas vivos quando se tem a finalidade de melhor compreender o funcionamento molecular de uma organela, célula ou tecido.

Atualmente, entende-se por proteoma o conjunto de proteínas expressas por uma célula, tecido ou organismo em determinado momento, sob determinada condição (López, 2007).

Visto isso, passou-se a reconhecer a importância do estudo das proteínas para a melhor compreensão bioquímica dos processos biológicos, pois são elas que ativamente participam de cada um deles, o tempo todo, sendo, portanto moléculas de comprovada importância no desenvolvimento e homeostase dos organismos (Aebersold & Mann, 2003). O aprofundamento das pesquisas sobre a estrutura e a função das proteínas (Uetz, *et al.* 2000; Salis, *et al.* 2003) aliado ao desenvolvimento de técnicas e abordagens diversas para esta finalidade, criou-se um novo ramo da ciência que até a década de 90 não existia, a “proteômica”, ciência esta, que abrange a sequência, a estrutura, a atividade das proteínas expressas por uma célula, assim como suas modificações pós traducionais, interações e alterações que as proteínas venham a sofrer.

Dessa forma, destaca-se a proteômica como um complemento essencial da genômica, pois sem esse estudo não há como caracterizar a estrutura, função e expressão dos produtos finais dos genes (Ong & Pandey, 2001; Nee, 2002; Aebersold & Mann, 2003).

No início dos estudos proteômicos, no fim da década de 90, os objetivos eram identificar todas as proteínas de um organismo que podiam ser detectadas pelas técnicas existentes, isto é, elucidar, o melhor possível, o mapa proteômico de um determinado organismo em um determinado momento. Atualmente, os objetivos foram alterados, sendo a análise comparativa entre duas condições do mesmo organismo mais empregada, devido à possibilidade do emprego das proteínas diferencialmente expressas em terapias, tratamentos de condições ou diagnósticos de doenças (Martins-De-Souza *et al.*, 2008).

#### **1.4 Eletroforese de duas dimensões em gel de Poliacrilamida**

Uma das técnicas mais difundidas e empregadas na análise proteômica surgiu muito antes do advento dessa ciência. A eletroforese de duas dimensões em gel de poliacrilamida (2DE) surgiu na década de 70 e foi desenvolvido para a separação de proteínas utilizando um gel de poliacrilamida (Klose, 1975; O'Farrel, 1975; Pandey & Mann, 2000). Conquanto a invenção da técnica seja de quase 40 anos, os métodos que possibilitaram a identificação das proteínas separadas pela 2DE de forma rápida e conclusiva são muito mais recentes, sendo desenvolvidos ao longo dos últimos 15 anos (Aebersold and Goodlett, 2001).

A 2DE é uma técnica muito abrangente e poderosa, pois tem a capacidade de separar misturas complexas de proteínas em um único gel (Aebersold & Goodlett, 2001; Zhu, *et al.*, 2003), gerando informações relevantes como o ponto isoelétrico (pI) e a massa molecular (MW) dessas proteínas. A reunião dessa técnica com a espectrometria de massa (MS) é uma abordagem muito versátil e robusta.

Embora técnicas mais recentes como o “*shotgun proteomics*” (Nesvizhskii & Aebersold 2005; Old 2005) tenham sido desenvolvidas, a técnica de eletroforese bi-

dimensional continua sendo muito utilizada devido ao seu baixo custo, confiabilidade de resultados, reprodutibilidade razoável e uma total compatibilidade com a MS (López, 2007).

A 2DE, como próprio nome diz, é constituída por duas fases distintas na separação de proteínas. A primeira, chamada de primeira dimensão, é a focalização isoelétrica (IEF). Nesta etapa as proteínas são separadas em um gradiente de pH até atingirem o ponto estacionário, em que a soma total de suas cargas seja zero, isto é, até alcançarem o seu pI. O tampão para adicionar à sua amostra, adequado para a isoeletrofocalização contém agentes caotrópicos (ureia, tiourea) para converter todas as proteínas em uma única conformação, um (ou mais) detergente não iônico ou zwitterionico para aumentar a solubilidade das proteínas hidrofóbicas e um agente redutor para prevenir eventos oxidativos, além dos anfólitos carreadores que auxiliam na focalização das proteínas para os respectivos pIs (López, 2006).

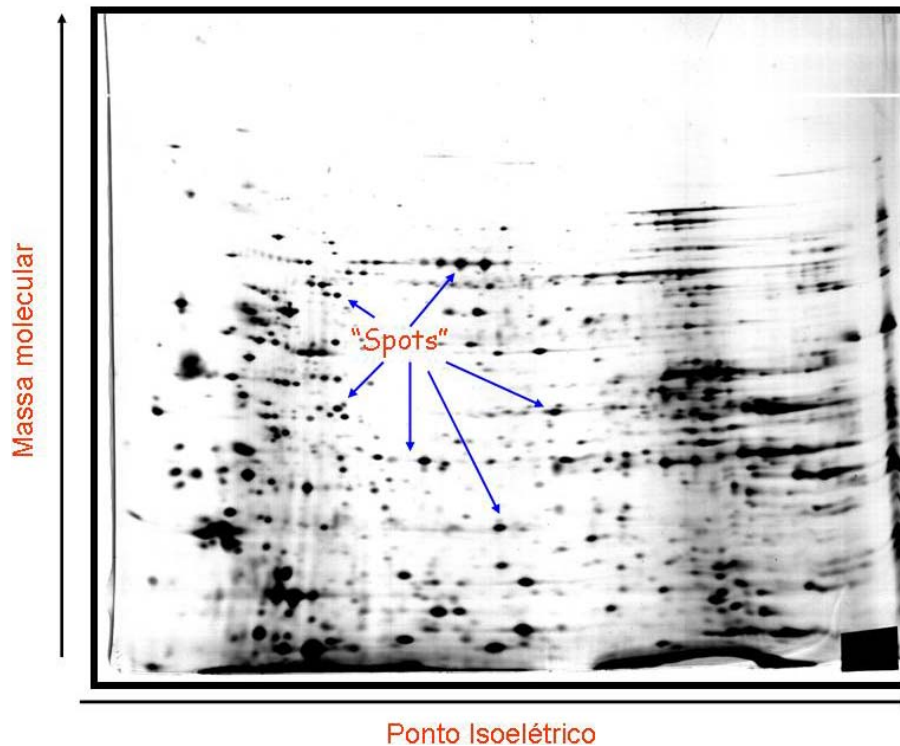
A segunda etapa (segunda dimensão) consiste na separação das proteínas, já separadas pelas IEF, por MW utilizando o método de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo o detergente sulfato dodecil de sódio (SDS-PAGE) (O'Farrel, 1975; Zhu, et al., 2003). Com isso, a eletroforese de duas dimensões tem a capacidade de evidenciar, com uma boa resolução, mais de 2000 proteínas diferentes (López, 2007; Badock, *et al.*, 2001)

Após as duas etapas citadas acima, o gel mostra um perfil com inúmeros pontos, chamado de “*spot*”, que corresponde uma determinada proteína. Quanto maior o volume e a intensidade do spot, maior a concentração desta proteína na célula, isto é, a abordagem 2DE permite uma análise quantitativa das proteínas presentes na amostra estudada. Essa plataforma apresenta uma alta resolução por causa da separação das proteínas por parâmetros diferentes e independentes (pI e MW).

Dessa forma, nota-se claramente a complexidade e utilidade desta plataforma, que, além de isolar as mais diversas proteínas, fornece em um único gel uma série de dados a respeito de diversas proteínas, como o pI, MW, abundância relativa de cada proteína, além de permitir a análise e identificação futura por MS. Dados adicionais ainda podem ser obtidos, como a visualização de modificações pós traducionais

através da análise da corrida eletroforética da proteína em questão (Martins-de-Souza *et al.*, 2008).

O mapa proteômico configura-se, então, da seguinte maneira: Da esquerda para direita há um aumento de  $pI$ , ou seja, as proteínas com menor  $pI$  ficam à esquerda, e com maiores  $pI$  ficam à direita. De baixo para cima há um aumento de MW, isto é, as proteínas menores tendem a ficar em uma posição inferior no perfil, enquanto as proteínas maiores tendem a ficar superiormente. Com isso, há a possibilidade da distinção das proteínas estudadas e, com isso, classificá-las como ácidas, básicas, de alto peso ou de baixo peso molecular (figura 1).



**Figura 1:** Mapa proteômico padrão. As setas azuis apontam os “spots” no gel. Setas pretas indicam um aumento gradativo tanto de ponto isoelétrico (eixo X), quanto de Massa molecular (eixo Y).

Todavia, esta técnica apresenta algumas deficiências importantes. Entre as principais estão o fato de excluir proteínas de alto peso molecular (maiores que 120 kDa) e as proteínas de 10 kDa co-migram com o front de SDS durante a segunda dimensão, isto é, proteínas menores que 10 kDa apresentam uma nula ou baixa

resolução por esta técnica. As proteínas extremamente ácidas, as extremamente básicas assim como as muito hidrofóbicas (geralmente proteínas de membrana) também são excluídas ao utilizar a técnica de 2DE (Gygi *et al.*, 2000).

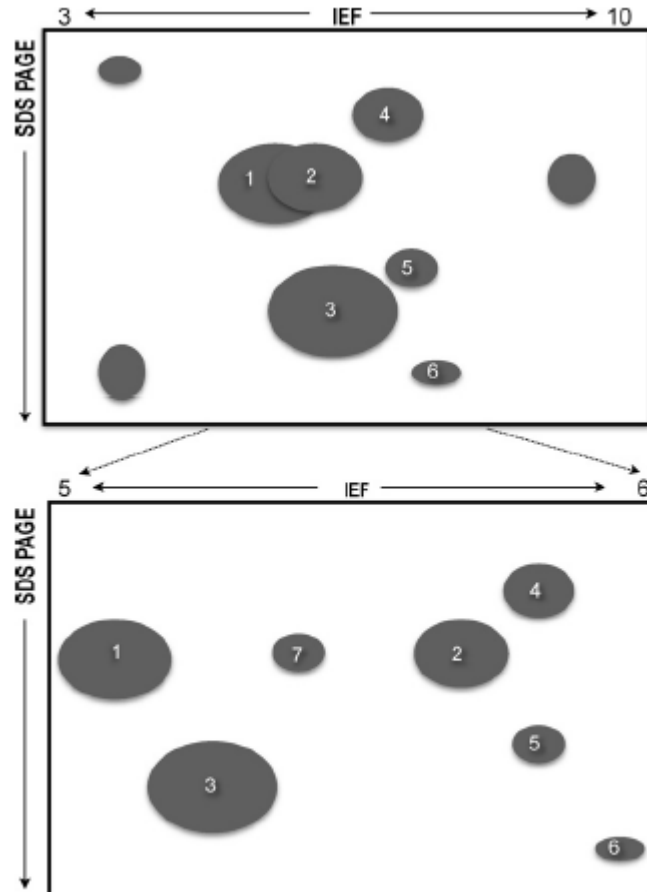
Outra significativa deficiência é quanto às proteínas de baixa expressão. Denominam-se proteínas de baixa expressão aquelas que apresentam pequeno número cópias por célula, isto é, algumas proteínas, como as estruturais, podem atingir um patamar de 1.000.000 de cópias/célula, já algumas proteínas pouco expressas podem ter apenas 10 cópias/célula. Sendo assim, por muitas vezes elas nem são detectadas nem pela impregnação por prata. Fato é que uma célula pode possuir entre 10,000-30,000 tipos diferentes de proteínas e no máximo 10,000 podem ser visualizadas na impregnação por prata (Badock, *et al.*, 2001).

Além disso, na tentativa de aplicar maiores quantidades de amostra a fim de evidenciar essas proteínas menos expressas, pode acontecer a chamada sobreposição, fato que ocorre quando as proteínas muito expressas, por possuir um peso e pI semelhante a alguma outra proteína, podem se sobrepor à essas proteínas, impedindo que sejam visualizadas e estudadas pela técnica 2DE e MS (Badock, *et al.*, 2001). Tais proteínas de baixa expressão são muito importantes, pois podem ser potenciais biomarcadores de doenças ou alvos para drogas e não são detectados, seja pelo fato de estarem em uma baixa concentração, seja pela sobreposição de outras proteínas mais abundantes.

Assim sendo, algumas estratégias começaram a surgir para superar as limitações, tais como, a análise do subproteoma, fato que reduz a complexidade do estudo do proteoma da célula pelo fato de analisar separadamente o proteoma de cada organela por 2DE e MS (Jung, *et al.*, 2000). Já Badock e colaboradores propuseram em 2001 o pré-fracionamento das amostras, isto é, anteriormente a técnica de 2DE, submeter a amostra ao RP-HPLC para uma separação por hidrofobicidade, por exemplo, a fim de realizar uma separação prévia das proteínas, em ordem crescente de hidrofobicidade, para melhor analisar os géis e permitir a visualização de proteínas pouco expressas e evitar a sobreposição.

O presente trabalho adotou um caminho alternativo para superar as limitações da 2DE, caminho este proposto em 2000 por Gygi *et al.*, que recomendava o uso de

diferentes tiras (IPG *strips*) com faixas de pH diversas e estreitas, para melhor reproduzir uma certa região de proteínas, seja a região ácida, básica ou central do gel. Com isso, podem-se visualizar melhor as proteínas, pois evita a sobreposição e permite uma melhor dispersão dos *spots* (Figura 2).



**Figura 2:** Representação de como a utilização de *strips* com uma faixa estreita de pH pode otimizar a visualização dos *spots*.

#### 1.4.1 Detecção das Proteínas separadas por 2DE

Existem diversos métodos para se detectar as proteínas separadas por 2DE. Os métodos mais comuns são os colorimétricos que são aplicados após a eletroforese como o *Coomassie Blue Coloidal* e o nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ )

O *Coomassie Blue* é o método mais confiável para a quantificação dos spots, pois apresenta linearidade quantitativa (Fazekas, *et al.*, 1963). A detecção é baseada na ligação das moléculas do corante com as proteínas por interação eletrostática, levando-se em consideração a baixa afinidade deste corante com o gel de poliacrilamida, permitindo a visualização dos spots. O limite de detecção de proteínas por este método é entre 10-100ng/spot (Polland, *et al.*, 2005). Existem dois métodos de coloração por *Coomassie*, o tradicional utilizando o *Coomassie-R250* e o *Coomassie Coloidal* utilizando o *Coomassie-G250*, estabelecido por Candiano *et al.*, (2004).

Já a coloração por prata é um método, entre 5 e 50 vezes mais sensível que *Coomassie* (Binz, *et al.*, 1999; Bienvenut *et al.*, 1999). É um excelente método para análises qualitativas, porém de pobre poder quantitativo, pois a intensidade de coloração dos spots depende do tempo de revelação e não é linear com a quantidade de proteínas. Dessa forma, a comparação entre dois géis torna-se difícil (Rabilloud, 1990; Rabilloud, 1999).

Embora estas duas sejam as mais comumente utilizadas, existem alternativas para a detecção de proteínas, como a detecção pré eletroforética pela utilização de fluoróforos (SYPRO, DIGE) ou detecção radioativa. Ambos os métodos são confiáveis e sensíveis, por exemplo, o método DIGE (difference gel electrophoresis) atinge uma detecção de 0,2ng/spot (Sitek, *et al.*, 2006)

Posteriormente à detecção, as imagens dos géis são digitalizadas e uma análise quantitativa das proteínas deve ser realizada utilizando programas computacionais específicos. Esta análise visa à comparação quantitativa entre spots que representam a mesma proteína em duas classes distintas de géis (classe lesado e controle, por exemplo), para evidenciar, quiçá, alguma diferença estatisticamente relevante, demonstrando que determinada proteína em determinada condição é super-expressa ou sub-expressa.

Os programas frequentemente utilizados são o MELANIE (Genebio- Swiss-Prot) e Image Master Platinum (Ge *Biosciences*). Estes programas contêm algoritmos que detectam os spots, os quantificam levando em consideração o seu volume relativo e fazem a comparação (*matching*) entre as duas ou mais classes desejadas



com a finalidade de encontrar os *spots* diferencialmente expressos e realizar os testes estatísticos necessários para a comprovação. Este processo de comparação levando em consideração o volume relativo é chamado de análise densitométrica.

Dessa maneira, encontram-se *os spots* desejados. Isto posto, pode-se fazer a excisão destes spots e submetê-los, após um processamento especial, à MS para que sejam identificados.

### **1.5 Identificação das Proteínas por Espectrometria de Massas**

A técnica de MS surgiu com a necessidade de identificar as proteínas por um método rápido e preciso, e logo foi associada como o complemento que faltava aos ensaios de 2DE.

A metodologia 2DE, até então, era incompleta, pois apenas separava as proteínas, por pI e MW, entretanto não era capaz de identificar cada um dos *spots* que eram visualizados em seu gel. Com a integração das duas técnicas, foi estabelecida uma metodologia robusta e poderosa para a identificação com segurança de diferentes proteínas e na resolução dos mapas proteômicos de espécies cujo genoma já esteja seqüenciado completamente.

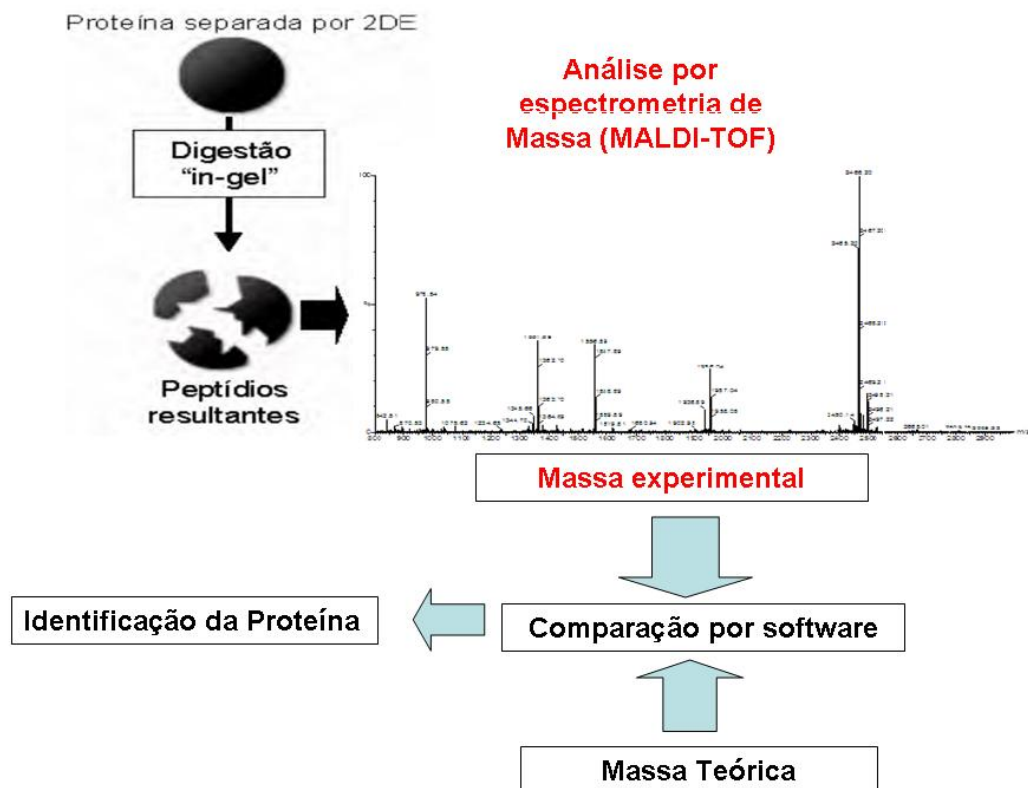
Após obter o mapa proteômico "*in gel*", os *spots* selecionados pela análise computacional devem ser submetidos a uma digestão trípica para clivar as proteínas em peptídeos e esses serem analisados no espectrômetro de massa.

A identificação dos spots se dá pelo método "*peptide mass fingerprinting*" (PMF) (Henzel, *et al.*, 1993; James, *et al.*, 1993), no qual se considera o fato de cada proteína apresentar uma sequência de aminoácidos específica e particular. Uma informação importante neste momento é que a sequência das proteínas são conhecidas pelo fato do genoma do organismo estar completamente seqüenciado.

Por exemplo, é muito usual obter os peptídeos utilizando como protease a tripsina, que é uma enzima que cliva sempre na porção C-terminal dos aminoácidos de lisina e arginina. O resultado ao expor essa protease a uma determinada proteína é a formação de um conjunto de peptídeos com massas e seqüências específicas. Ao

expô-la a outra proteína o resultado será a obtenção de outros peptídeos, com outras massas e sequências. Sendo assim, proteínas diferentes resultam em peptídeos diferentes, os quais são a sua “impressão digital”. (Pappin *et al.*, 1993; Corthals *et. al*, 1999; Aebersold & Goodlett, 2001; Thiede *et al.*, 2005).

Considerando o fato que cada proteína apresenta a sua própria “impressão digital”, a análise do espectrômetro de massas gera uma lista de massas de todos os peptídeos daquela proteína estudada. Simultaneamente ocorre a digestão “*in silico*” desta proteína a partir do banco de dados genômico do organismo (Henzel *et al.*, 2003). Dessa forma, cruzam-se as informações e a proteína em questão pode ser identificado com o auxílio de uma ferramenta de procura em banco de dados (Ex.: Mascot, Expsy aldense, MS-Fit). (figura3)



O aparelho de espectrômetro de massas é composto por três partes principais que são o ionizador, o analisador e o detector (Siuzdak, 1994).

O ionizador é responsável por ionizar as moléculas, isto é, gerar íons a partir de compostos orgânicos e inorgânicos, para que possam ser analisados e separados pela relação massa/carga ( $m/z$ ) no analisador e detectados qualitativamente e quantitativamente no detector (Martins-de-Souza, 2008; Menezes, 2009). O desenvolvimento de meios sofisticados de ionização branda (Karas & Hillenkamp, 1988), isto é, que não causam fragmentação excessiva da amostra e que conseguem ionizar moléculas relativamente grandes ou susceptíveis ao calor, ocorreu na década de 90 graças ao desenvolvimento dos métodos ESI (*Electrospray Ionization*) e MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization*) inventados na década anterior por John B. Feen e Koichi Tanaka respectivamente (Siuzdak, 1994; Aebersold & Mann, 2003; Wysocki *et al.*, 2005).

O aparelho de MS mais utilizado nas identificações por PMF é o MALDI-TOF. Assim sendo, a forma de ionização da molécula é a ionização a laser assistido por matriz (MALDI). Neste aparelho, a molécula é miscigenada a uma matriz ácida (substância que tem alta capacidade de absorver energia) e um “tiro” laser atinge esse complexo que vaporiza a matriz e transforma a molécula em um gás ionizado, ou seja, e conseqüentemente possa ser analisado no próximo compartimento do espectrômetro de massa, o analisador.

O analisador TOF, *time-of-flight*, tem a função de analisar a molécula ionizada previamente pelo laser. O nome tempo de voo é sugestivo, pois os íons vão “voar” por um tubo analítico de comprimento conhecido, com isso, há a separação das moléculas segundo a relação da massa do íon com o tempo que o mesmo leva para percorrer o tubo. Uma molécula mais leve atravessa o tubo mais rapidamente do que uma molécula mais pesada. A relação do tamanho do tubo com o tempo exato que a molécula leva para atravessá-lo determina sua massa com grande precisão (Mann *et al.*, 2001; Wysocki *et al.*, 2005; Martins-de-Souza *et al.*, 2008).

Algumas deficiências desse método eram evidentes, como por exemplo, a possibilidade de moléculas de mesma relação massa/carga adquirir uma energia

cinética inicial diversa fazendo com que atravessassem o tubo analítico em tempos diversos, gerando um erro ao analisá-lo e a conseqüente queda na resolução. Tal situação foi contornada com o desenvolvimento de algumas técnicas corretivas, dentre as quais o desenvolvimento do analisador TOF do tipo refletor que desacelera os íons até a energia cinética ser nula antes de atingir o detector, fazendo com que os íons de mesma relação massa/carga cheguem ao detector ao mesmo tempo. (Mamiryn, 2001; Gross, 2004; Hoffmann & Stroobant, 2007; Menezes, 2009).

Os dados obtidos pelo analisador são recolhidos pelo terceiro compartimento fundamental de um espectrômetro de massa, o detector. Este transmitirá os dados para o programa computacional do aparelho, configurando assim o espectro da proteína. O espectro é na verdade um gráfico formado pela relação entre a intensidade relativa da corrente elétrica (eixo y) com a relação m/z do componente da amostra (eixo x). O espectro apresenta alguns picos pelo fato de inúmeras moléculas serem analisadas simultaneamente, isto é, todos os peptídeos resultantes da digestão de um *spot* são analisados ao mesmo tempo, e cada peptídeo detectado será parte integrante do espectro que acarretará na identificação da proteína.

Eventualmente, nas análises do proteoma de mamíferos, que apresentam um genoma complexo, encontram-se algumas proteínas que apresentam “impressões digitais” semelhantes dificultando a sua identificação pelo método MALDI-ToF. Neste caso, mais dados da proteína são necessários para a sua identificação e para a resolução deste problema, foram desenvolvidos análises e aparelhos para aumentar a confiabilidade da identificação destas proteínas (Martins-de-Souza, 2008).

Entre os equipamentos mais sofisticados que foram desenvolvidos estão os espectrômetros de massa híbridos (MS/MS). Exemplos de equipamentos, com a ionização MALDI, muito utilizados para o estudo destes proteomas complexos são o MALDI-ToF/ToF, o qual é um espectrômetro que contém mais de um analisador em série ToF e o MALDI Q-ToF que apresenta um quadrupolo acoplado ao ionizador MALDI que permite uma pré seleção dos íons de acordo com sua relação m/z, posteriormente esses íons são submetidos ao analisador ToF.

O progresso desenvolvido frente ao MALDI-ToF com apenas um analisador é que pelo fato de apresentar o segundo analisador ToF o capacita a selecionar, no

espectro de massas, os peptídeos de interesse para que sejam fragmentados com o objetivo de elucidar a sequência de aminoácidos destes peptídeos, deixando assim o dado obtido muito robusto e confiável (Medzihradzsky, *et al.*, 2000; Bienvenut, *et al.*, 2002; Martins-de-Souza, 2008).

## 1.6 Estudo comparativo de expressão de proteínas

Diversos estudos proteômicos cujo intuito é a comparação das proteínas expressas pela mesma espécie em duas distintas condições têm sido realizados. Por exemplo, Badock *et al.* (2001), compararam células epiteliais humanas (HBL-100) a duas situações distintas, em parte delas induziram apoptose e na outra cultura não foi induzida essa apoptose. Com isso, conseguiram identificar, por eletroforese de duas dimensões e espectrometria de massa MALDI-TOF seis proteínas diferencialmente expressas nas células apoptóticas. O presente estudo visou essa abordagem comparativa, utilizando amostras de organismos de mesma espécie em duas condições distintas para se verificar a diferença de expressão proteica e identificação dessas diferenças.

Para esta estratégia de investigação proteômica, a eletroforese de duas dimensões, repartindo esse campo com o advento do método por *shotgun*, é ainda uma das técnicas mais utilizadas, pois permite a separação, detecção e quantificação de milhares de proteínas em único experimento (Klose, *et al.* 2002). O equipamento de espectrômetro de massas permite a identificação dessas proteínas, formando a combinação base dos estudos de proteoma por vários anos.

O desenvolvimento destes estudos ocorreu na era pós genômica, na qual a disponibilidade das sequências completas de genomas e o desenvolvimento de inúmeros programas computacionais (análise *in silico*) permitiram a correlação entre os dados obtidos por MS com essas sequências, podendo assim identificar a proteína em questão e de qual gene ela foi traduzida (Wilkins *et al.*, 1997; López, 2007), porquanto, houve um avanço significativo no entendimento dos fenômenos biológicos.

Tendo em vista a abordagem proposta, comparação de proteomas em duas condições distintas, e a comprovada harmonia entre as técnicas destacadas acima, há a perspectiva de que este estudo forneça dados importantes, como a identificação de proteínas envolvidas em processos de regeneração, cujo conhecimento possa auxiliar em futuros tratamentos eficazes para indivíduos que sofram de neurotraumas.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Comparar e analisar os mapas proteômicos da medula espinhal de ratos *Wistar* com idade pós-natal de 7 dias (P7) submetidos à lesão periférica nervosa (nervo ciático) no período pós-natal de 2 dias (P2) com ratos *Wistar* controle (sem lesão) a fim de identificar as proteínas diferencialmente expressas que apresentem, porventura, alguma função biológica relevante na degeneração nervosa ou que possam ser estudadas futuramente para o seu emprego no tratamento de neurotraumas.

### **2.2 Objetivos Específicos**

**a)** Caracterizar os mapas proteômicos, em faixas de pH diversas com o intuito de reduzir a sobreposição proteica, de ratos *Wistar* P7 submetidos e não submetidos à lesão periférica utilizando a técnica de eletroforese de duas dimensões.

**b)** Apontar as proteínas diferencialmente expressas entre as duas classes em ratos P7 utilizando a análise *in silico* e análise estatística.

**c)** Identificar as proteínas diferencialmente expressas utilizando espectrometria de massas MALDI-TOF.

**d)** Pesquisar as funções biológicas das proteínas diferenciais caracterizadas por espectrometria de massas a fim de inferir seu possível papel na degeneração nervosa e consequentemente exportar esses dados para estudos futuros no tratamento de neurotraumas.

### 3. JUSTIFICATIVA

Lesões periféricas acometem muitos seres humanos atualmente, causando lesões graves como perda total ou parcial de movimento de membro. Diversos trabalhos na literatura citam fatores causadores destes neurotraumas, como por exemplo, acidente automobilístico.

A ciência tem progredido muito no desenvolvimento cirúrgico para refazer os nervos lesionados, todavia pouco tem caminhado no âmbito da compreensão das proteínas e das vias de sinalização dessas que compõem os nervos e que podem porventura evitar a degeneração após sofrer algum trauma.

Considerando conhecimentos prévios quanto ao período de maior neuroplasticidade do organismo e ainda sobre a adaptabilidade do proteoma de um organismo quando exposto a diferentes situações ambientais, pretendeu-se, utilizando modelo de estudo animal (*Rattus norvegicus*) simular uma lesão periférica lesionando o nervo ciático do indivíduo a fim de apontar e identificar as diferenças de expressão proteica entre os estados sem lesão periférica e com lesão.

Tendo em vista que a análise proteômica do organismo é uma ferramenta confiável e sensível, além de permitir uma obtenção detalhada dos produtos protéicos do organismo, o atual estudo visou utilizar esta técnica para comparar as proteínas expressas pelo organismo nas duas diferentes condições ambientais e, por conseguinte encontrar e identificar as proteínas diferencialmente expressas além de inferir a função biológica desta proteína com a sua expressão diferencial.

Este trabalho pode servir de base para trabalhos futuros visando o tratamento de neurotraumas, que utilizem essas informações proteicas para novos alvos de drogas terapêuticas ou como conhecimento para a redução da degeneração nervosa pós-trauma.



## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Material de Estudo**

A espécie utilizada nesse estudo foi o *Rattus norvegicus*. Foram fornecidos pelo Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica - CEMIB - da UNICAMP ratas junto com uma ninhada com zero dias de vida (P0) com cerca de seis neonatos por ninhada.

Três indivíduos da ninhada sofreram cirurgia (descrita a seguir) com dois dias de vida (P2) e três permaneceram intactos.

No experimento piloto, foram utilizados ratos com quatro (P4), sete (P7) e 21 (P21) dias. No restante do trabalho a idade escolhida para ser estudada foi sete dias (P7). Durante todo o tempo, todos os ratos foram mantidos juntos, com a presença da mãe para amamentá-los.

### **4.2 Condições de acondicionamento**

Para tal estudo, os animais foram acondicionados em gaiolas plásticas, numa sala com controle de temperatura entre  $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ , umidade de 50% e ciclo de 12 horas claro/12h escuro, dentro de estantes ventiladas (Alesco modelo 9902.001). As ratas receberam livre acesso ração padrão para roedores e água filtrada (Protocolo CEEA-UNICAMP 878-2).

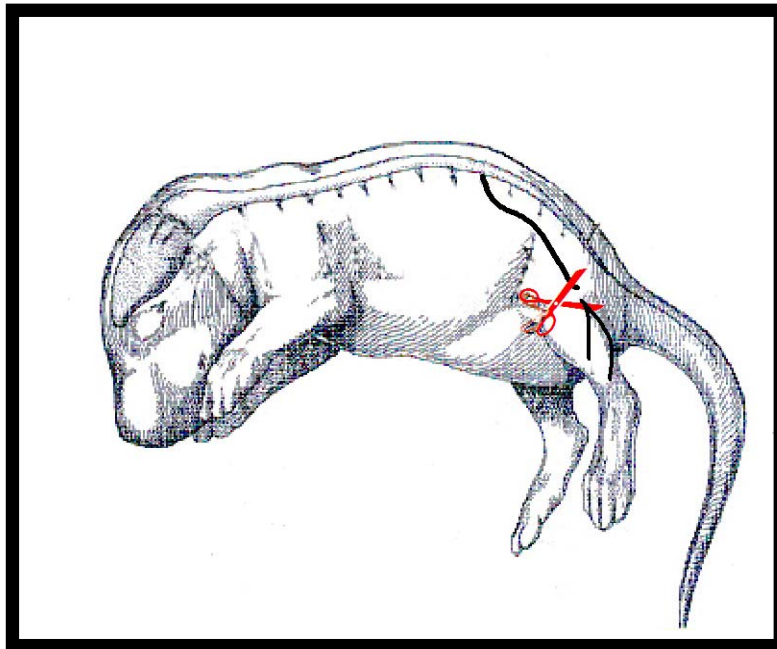
### **4.3 Procedimentos cirúrgicos**

No presente trabalho, realizaram-se duas cirurgias nos neonatos. A primeira (secção do nervo ciático) foi realizada em P2 somente em metade da ninhada utilizada, para assim, formar a classe de ratos “lesados” e a classe “controle” composta por aqueles que se mantiveram íntegros. A segunda (extração da medula

espinhal) foi realizada em todos os indivíduos de ambas as classes em P4, P7 e P21 no experimento piloto, e somente em P7 no experimento em si.

Previamente de ambas as cirurgias os ratos foram anestesiados por hipotermia (Rogério *et al.* 2002).

Para a primeira cirurgia, os neonatos em P2, após serem anestesiados, foram colocados em decúbito ventral sob microscópio cirúrgico (D.F. Vasconcelos, M90), para realizar uma pequena incisão na face lateral de ambas as coxas. Feito isso, a musculatura foi afastada para exposição do nervo ciático. Ao encontrá-lo, com a assistência de uma microtesoura (Vannas, Steel Inox-S. OF3212) realizou-se uma pequena secção no mesmo e, para assegurar o sucesso do procedimento, foi retirado um segmento de aproximadamente três milímetros do coto distal (Figura 1). A musculatura foi então reposicionada e a pele suturada com fio de seda 8-0 (Ethicon).

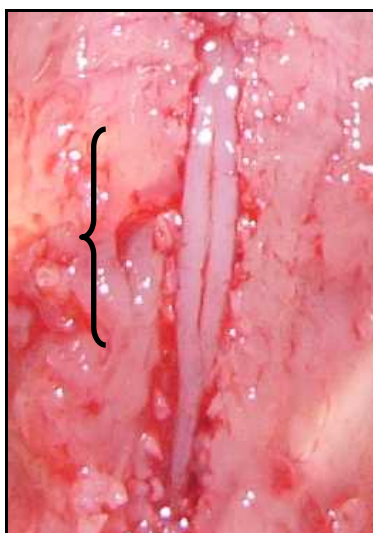


**Figura 4:** Esquema do procedimento de lesão nervosa periférica em neonatos

Logo após, os animais foram colocados em local aquecido até despertarem da anestesia e serem devolvidos à mãe.

Já a segunda cirurgia foi, em sua ampla maioria, feita em ratos P7. A posição e o equipamento utilizado para tal procedimento foi igualmente o decúbito ventral e

microscópio cirúrgico (D.F. Vasconcelos, M90). Após decapitação, a pele dorsal foi retirada com o auxílio de uma tesoura, assim expondo o dorso do animal. Removeu-se, com um bisturi cirúrgico padrão, a musculatura presente sobre as vértebras assim como as próprias para a exposição da medula espinhal. Com isso, seccionou-se uma região entre as vértebras T12 e S1, chamada de intumescência lombar (Figura 2), depositou-se em um tubo eppendorf de 1,5ml, aferiu-se o peso em uma balança analítica e rapidamente esse material foi colocado em nitrogênio líquido para seu rápido congelamento e evitar a ação de proteases intrínsecas com posterior estocagem em biofreezer (-80°C) até o momento do uso.



**Figura 5:** Região seccionada da medula espinhal, correspondente à intumescência lombar, está delimitada pela chave.

#### **4.4 Extração e Quantificação das proteínas**

A extração foi realizada de acordo com (Deshane *et al.*, 2004). Cada medula foi processada individualmente no próprio eppendorf em que foi depositada após a coleta cirúrgica. Para determinar o volume do tampão de extração levou-se em consideração o peso de cada amostra. Esse tampão contém os seguintes reagentes: ureia 7M, tiourea 2M, CHAPS 4% (m/v), DTT 70mM e inibidor de protease 1% (v/v) (Sigma P8340) como descrito em Martins-de-Souza *et al.*, 2007.

Imerso nesse tampão, cada medula foi macerada mecanicamente com o auxílio de um pistilo para tubo eppendorf, e em seguida submetida à uma centrifugação a 14000rpm por 15 minutos em uma centrífuga (Eppendorf 54415 C). Após esse processo, coletou-se o sobrenadante e o mesmo foi novamente estocado em biofreezer para posterior quantificação.

Nota-se que as amostras de mesma classe jamais foram reunidas, sendo preservada a individualidade de cada uma, isso para que futuramente, na composição do *pool* de cada classe, cada indivíduo apresentar a mesma proporção relativa.

Para quantificação das proteínas utilizou-se o método descrito por Bradford (1976), baseada em uma curva padrão de albumina de soro bovino (BSA) para determinar a concentração da amostra. Feito isso, utilizou-se da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12,5% para verificar se a leitura obtida com o método escolhido para a quantificação das proteínas está coerente e para normalizar as amostras, garantindo assim a mesma aplicação protéica de cada indivíduo no *pool*.

## **4.5 Eletroforese de duas dimensões em gel de poliacrilamida**

### **4.5.1 Procedimentos para 2De**

#### **4.5.1.1 Focalização Isoelétrica (IEF)**

A focalização isoelétrica (IEF) consiste na primeira dimensão (1D) da técnica intitulada de eletroforese de duas dimensões em gel de poliacrilamida (2DE).

Tal passo foi conduzido em tiras (*strips*) de poliacrilamida desidratadas de 18 cm com gradiente imobilizado de pH (IPG - *Immobilized pH Gradient*). Utilizou-se, neste estudo, duas faixas de separação de pH, uma de 3-10 não linear e outra de 4-7 linear (*GE Healthcare*).

As três amostras de cada classe foram reunidas em um *pool* contendo 600µg de proteína total, que foram solubilizadas em um tampão de rehidratação, muito

parecido com aquele tampão de extração já descrito, composto por ureia 7M, tiourea 2M, CHAPS 4% (m/v) (Sigma – St. Louis, MO, USA), DTT 70mM, anfólito 2% (v/v) (IPG Buffer , pH 3-10 não linear e IPG Buffer, pH 4-7 linear) além de azul de bromofenol 0.002% (m/v). Com exceção do detergente CHAPS, os outros reagentes utilizados foram fabricados pela *GE Healthcare*, Uppsala, Sweden. Todos os reagentes reunidos com a amostra devem atingir um valor final de 350µL, que é a capacidade de rehidratação da tira utilizada.

O volume total da solução foi colocado em um suporte (*strip holder*) de tamanho correspondente as tiras, e posteriormente houve a sobreposição das mesmas sobre a solução. Sobre as *strips*, adicionou-se 2mL de óleo mineral (*Dry strip cover fluid*) com a finalidade de evitar a cristalização da ureia.

Primeiramente, esse conjunto foi submetido a 12h de rehidratação a uma temperatura constante de 20°C. Logo após, mantendo-se a temperatura, inicia-se o programa da IEF, que é formada por três etapas, consistindo em 1h sob uma corrente de 500V, 1h adicional a 1000V e finalmente voltagem livre até acumular entre 90 e 100 KVh em um aparelho IPGphor (*GE Healthcare*) mantendo a corrente constante em 50µA.

#### **4.5.1.2 Tratamento das IPG strips**

O tratamento das tiras de poliacrilamida é necessário para a transição das proteínas previamente separadas pelo ponto isoelétrico (1D) para a segunda dimensão que consiste na eletroforese em gel poliacrilamida contendo SDS cuja separação dessa vez é por massa molecular (MW).

As tiras de poliacrilamida foram sujeitas a uma solução contendo Tris-HCl pH 8.8 50mM, ureia 6M, glicerol 30% (v/v), SDS 2% (m/v) e DTT 2% (m/v) por 12 minutos para uma redução padrão das pontes dissulfeto das proteínas, quebrando assim a sua conformação original e expondo o seu interior ao detergente aniônico SDS.

Em um segundo momento, as tiras foram submetidas à outra solução contendo os mesmo componentes, exceto o DTT, que foi substituído por Iodoacetamida 2,5%

visando alquilar os enxofres reduzidos prevenindo sua reoxidação durante a eletroforese.

#### **4.5.1.3 Eletroforese em gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)**

A segunda dimensão da 2DE foi realizada em um gel homogêneo de poliacrilamida 12,5% (m/v), de acordo com o método descrito por Laemmli (1970). O gel de poliacrilamida foi preparado homogeneamente e verticalmente. A solução para isso é composta de Acrilamida/Bis-Acrilamida (37,5:1; m/m) em uma concentração de 12,5% (m/v), Tris HCl pH 8.8, SDS 0,1% (m/v), persulfato de amônio 0,05% (m/v) e TEMED 0,05% (v/v) no dia anterior ao da corrida, que resulta em um gel de seguintes dimensões: 180mm x 160mm x 1,5mm.

As tiras, após o processo de equilíbrio, foram colocadas sobre a superfície do gel e seladas com agarose 0,5% (m/v) a 70°C. Para a corrida eletroforética foi utilizado um sistema SE-600 (*Amersham GE Biosciences*) com refrigeração interna Multitemp II (*Amersham GE Healthcare Biosciences*), a uma temperatura de 20°C em uma solução Tris-HCl 25mM, Glicina 192mM e SDS 0,1% (m/v), a mesma solução utilizada como tampão de corrida.

A primeira etapa foi efetuada por 1h a 60V, garantindo assim que as proteínas penetrassem ao mesmo tempo no gel. A segunda etapa foi efetuada fixando a corrente elétrica em 35mA por gel, com uma duração de cerca de cinco horas, período necessário para que a frente de corrida visualizada pelo corante azul de bromofenol (BFB) atingisse o final do gel.

#### **4.5.2 Detecção das proteínas**

Feita a 2DE, é necessário a detecção das proteínas que ficaram retidas na malha do gel. Para isso, primeiramente é necessário submeter este gel a um tratamento para a fixação das proteínas.

O método empregado foi o de Candiano *et al.* (2004) utilizando Coomassie blue coloidal. Primeiramente os géis foram expostos por um período *overnight* (12h) em uma solução fixadora contendo etanol 30% (v/v) (Merck – Darmstadt, Germany) e ácido fosfórico 2% (v/v). Logo após, os géis foram lavados com água destilada por três vezes. Em seguida, os géis foram deixados em contato por três dias, sob agitação constante em uma solução contendo ácido fosfórico 10% (v/v), sulfato de amônio 10% (m/v), metanol 20% (v/v), coomassie blue G 250 0,12% (m/v). O excesso de corante foi removido com uma lavagem de 1h com água destilada.

#### 4.6 Análise quantitativa da expressão protéica

Após a coloração, os géis foram scaneados e as imagens adquiridas em 300dpi de resolução (tons de cinza) usando um Sharp Scanner JX (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). As imagens foram digitalizadas e salvas em arquivos com o formato .TIFF (8 bits).

Para a análise das imagens foi utilizado o *software* MELANIE 5.02 (Genebio - S.A., Swiss Institute of Bioinformatics, Geneva, Switzerland), que apresenta todas as condições necessárias para detecção e quantificação das proteínas dos géis 2DE, assim como a calibração de ponto isoelétrico (pI) e peso molecular (MW) dos spots, fato que permite uma fidedigna comparação (*matching*) dos diferentes mapas proteômicos provenientes das diferentes classes analisadas.

O programa MELANIE é capaz também de fazer testes estatísticos. Dessa forma, o teste estatístico escolhido para verificar a significância dos resultados foi o teste T (*student-t*), e o valor de  $P < 0,05$  foi escolhido para a seleção dos spots diferencialmente expressos levando-se em consideração a significância estatística dessas diferenças, baseado em experimentos prévios desenvolvidos em nosso laboratório bem como por outros grupos (Alexander *et al.*, 2007; Martins-de-Souza *et al.*, 2008; Martins-de-Souza *et al.*, 2009).

#### 4.7 Identificação dos Spots

Os *spots* selecionados foram retirados manualmente dos géis com o auxílio de uma lâmina.

Os peptídeos foram gerados e extraídos do gel de acordo com o protocolo Schevchenko *et al*, 1996, o qual recomenda o tratamento dos *spots* com uma solução de Acetonitrila 50% e AMBIC (Bicarbonato de Amônio) 25mM por 10 minutos com repetição única para retirar o corante (Coomassie Blue) dos géis. Em seguida lavaram-se cada *spot* com água deionizada adicionando acetonitrila 100% por duas vezes para a completa desidratação do gel. O protocolo ainda sugeria a secagem das amostras em *Speed-Vac Plus* por 40 minutos.

Para a digestão *in gel* empregou-se a “*Sequence Grade Trypsin*” (Promega – Madson, USA) juntamente com AMBIC 50mM com posterior banho de gelo e incubação a 37°C por 12 horas.

Feito isso, os peptídios foram gerados. Para a sua extração foi adicionado uma solução de acetonitrila 50% (v/v) e ácido fórmico 5% (v/v) com a função de bloquear a ação da tripsina. Após 20 minutos essa solução foi transferida para um tubo estéril novo. O método foi repetido por duas vezes de 20 minutos e então somado às coletadas primeiramente no tubo novo.

A solução contendo os peptídeos foi concentrada, submetida à secagem no equipamento *Speed-Vac Plus* até permanecer com aproximadamente 20ul de volume final. As amostras foram purificadas e concentradas utilizando *Zip Tips C18* (Millipore® - Bilerica, MA, USA) e eluídas em uma solução de Acetonitrila 60% e TFA 0,1% em outro tubo. Essas amostras foram secas até aproximadamente 2μL. A matriz utilizada para aplicar as amostras na placa do espectrômetro de massa MALDI-TOF foi a α-ciano-4-hidroxicinâmico (Sigma – St. Louis, MO, USA). Essa matriz compõe uma solução cuja proporção sugerida por Corthals *et. al*, (1999) é de 1,5% da própria matriz, 60% de Acetonitrila e 0,1% de TFA.

A matriz é uma substância que auxilia na ionização da amostra perante o agente ionizador (laser). Para identificação das amostras foi utilizada a técnica de *Peptide Mass Fingerprinting* e para algumas amostras também a tecnologia MS/MS.



Para o PMF utilizou-se o espectrômetro de massas *Voyager<sup>TM</sup>* DE-PRO MALDI-ToF (*Applied Biosystems* – Foster City, CA, USA). A calibração interna foi feita com a utilização do padrão comercial 4700 Cal Mix (*Applied Biosystems*) e para a obtenção do perfil de quebra dos peptídeos e da provável sequência de aminoácidos foi utilizado um espectrômetro de massas MALDI Q-ToF (*Waters Micromass* – Milford, MA, USA). O processamento dos dados brutos obtidos neste aparelho foi feito utilizando o programa MASCOT DAEMON, o qual conectava o programa MASCOT DISTILLER com o programa de busca em banco de dados MASCOT.

Finalmente, para a identificação dos *spots*, as massas obtidas a partir da análise dos peptídeos no espectrômetro de massa, foram confrontadas com os valores teóricos existentes em bancos de dados de proteínas públicos, mais especificamente o *SWISS-PROT*. Para essa comparação foram empregados os programas *Expasy Aldente* e o *MASCOT*. Os parâmetros para essa busca foi um mínimo de quatro *hits*, isto é, que ao menos quatro peptídeos obtidos experimentalmente apresentariam correspondência teórica com um erro máximo de 100 ppm. Além disso, para os *spots* que foram analisados em MALDI Q-ToF, determinou-se como parâmetro que ao menos um peptídeo fosse submetido à fragmentação e análise MS/MS. A intensidade dos picos, assim como a massa molecular e o pI teórico das proteínas foram verificados e confrontados com a localização experimental no gel 2DE, para corroborar a identificação.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Estabelecimentos de diretrizes de âmbito amostral

A definição de diretrizes importantes com relação às amostras utilizadas configurou a primeira etapa do estudo. Entre essas, estão o estabelecimento de parâmetros acerca da montagem de amostras, idade pós-natal a ser trabalhada (levando-se em conta que o período pós-natal de um rato *Wistar* vai do primeiro dia de vida (P1) até o vigésimo primeiro dia de vida (P21), quando o mesmo desmama) e o estabelecimento do protocolo para a extração das proteínas medulares.

Levando-se em consideração trabalhos da literatura (Kunz *et. al*, 2005) e experiência adquirida anteriormente pela associação do próprio laboratório de proteômica da Unicamp com o Laboratório de Neurobiologia do departamento de Fisiologia Animal da Unicamp liderado então pelo Prof. Francesco Langone (Shiniti, 2008), foi planejado realizar todos os experimentos de análise proteômica medular utilizando a montagem de um *pool* de amostras formado por três indivíduos (n=3). A escolha dessa abordagem em detrimento da análise de indivíduos singulares foi baseada por dois motivos:

- a) O primeiro foi minimizar a variância dentro da classe, e evidenciar as diferenças entre as classes estudadas, ressaltando assim, as proteínas que são diferencialmente expressas nas classes.
- b) O segundo motivo foi a necessidade da obtenção de uma quantidade mínima de proteínas para se tornar viável técnica da eletroforese bi-dimensional. Ao reunir três medulas para formar uma classe, conseqüentemente, triplica-se a quantidade de proteínas na classe, permitindo assim um maior aproveitamento para a experimentação e obtenção dos dados.

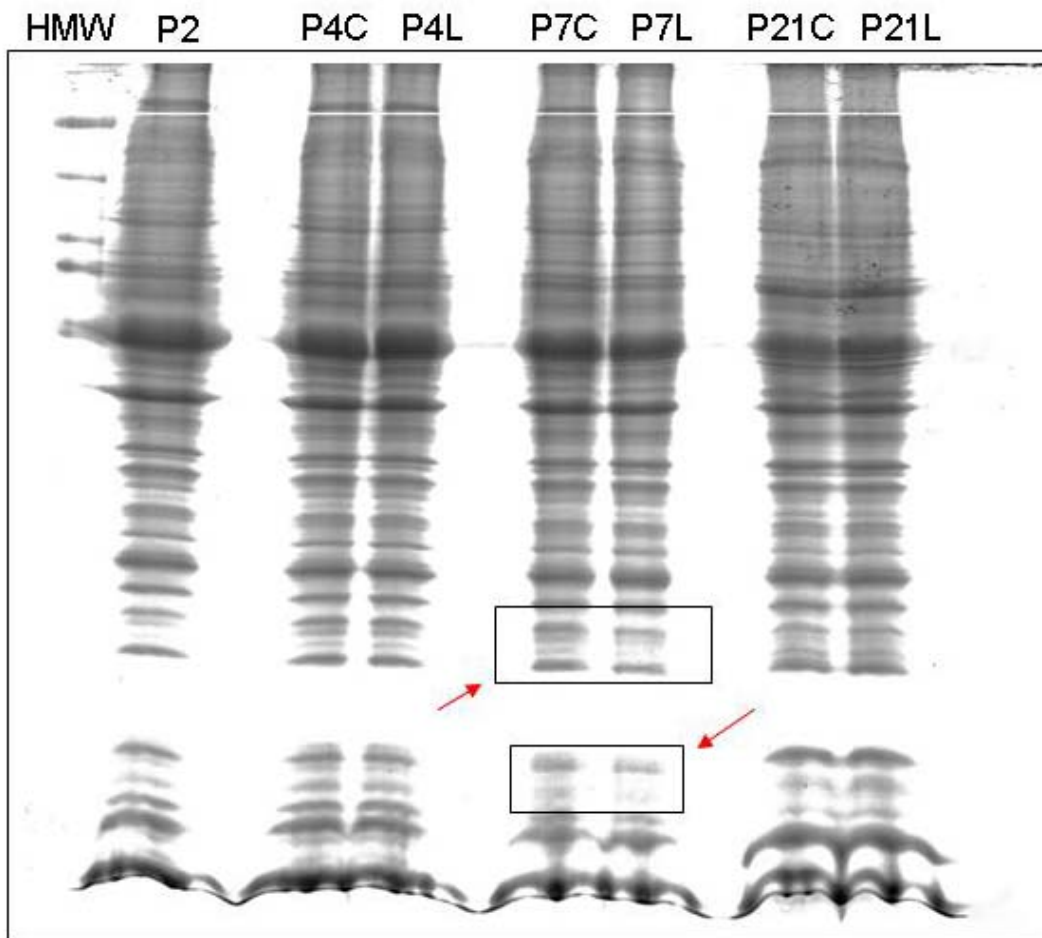
Definido como seriam formadas as diferentes classes, houve a necessidade de estabelecer o protocolo de extração das amostras. O método utilizado foi o mesmo já empregado anteriormente por Shiniti (2008), que, para extrair as proteínas medulares de ratos neonatos utilizou o protocolo de associação de lise mecânica, através de pistilo para *ependorf* e lise química, usando um tampão de extração como descrito

no ítem 4.4 em Materiais e Métodos. Dessa forma, as amostras eram imersas em um tampão cujo conteúdo envolvia proteases, agentes caotrópicos, detergentes e agentes redutores de ponte dissulfeto, sendo em seguida maceradas mecanicamente com o pistilo, até todo o tecido ser homogeneizado.

Feito isso, essa mistura foi submetida a 15 minutos de centrifugação a 14000 rpm, coletando o sobrenadante e desprezando o *pellet*, seguido de uma quantificação pelo método *Bradford* (Bradford, 1970) e normalização por SDS-PAGE. As amostras foram extraídas individualmente e a formação do *pool* ocorreu somente posteriormente a esta etapa.

Sabendo que o período pós-natal é de grande importância para a maturação do sistema nervoso, foram levantadas hipóteses para a determinação de qual idade seria estudada. Determinou-se seccionar o nervo ciático dos indivíduos da classe “lesado” com dois dias de vida (P2), no início do período pós-natal. Com isso, estabeleceu-se um ensaio piloto no qual seriam estudadas as medulas de ratos com quatro dias de vida, sete dias de vida e vinte e um dias de vida (P4, P7 e P21, respectivamente) a fim de precisar qual a idade em que a medula espinhal apresenta maior diferença de expressão proteica em relação ao controle devido a este estímulo externo (lesão periférica).

O piloto consistia em extrair as proteínas medulares de ratos das duas classes (lesado e controle) nas diferentes idades propostas, formar o *pool* (n=3) para cada idade e compará-las utilizando um SDS-PAGE padrão, porém com dimensões maiores (180mm x 160mm x 1mm) com intuito de separar as bandas e evidenciar com maior clareza as diferenças interclasses (Figura 6).



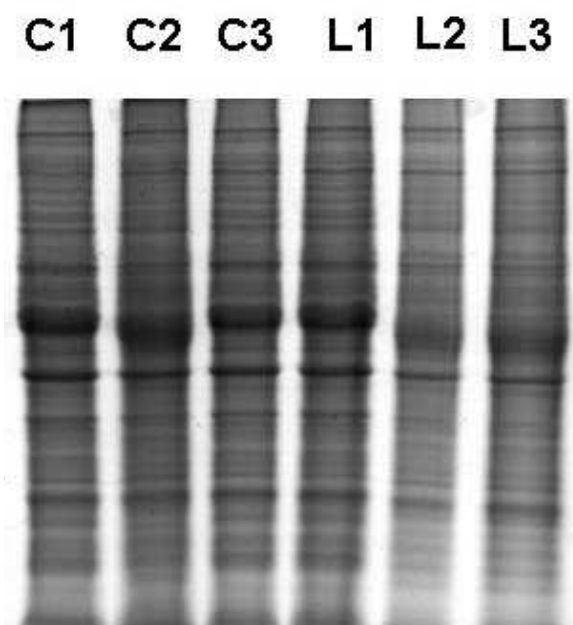
**Figura 6:** Perfil eletroforético linear das proteínas medulares em diferentes idades de ratos *Wistar* neonatos. HMW é o marcador de alto peso molecular e as letras C e L designam as classes Controle e Lesado. As regiões destacadas são as que apresentaram maiores diferenças de expressão entre os grupos comparados.

O resultado obtido é mostrado na figura 6, onde as áreas destacadas mostram as maiores diferenças do perfil eletroforético constatadas ao se comparar as duas classes do estudo. Observa-se uma diferença no padrão de bandas ao comparar as classes controle e lesado na idade P7. Nas outras duas idades, P4 e P21, não foram observadas tais diferenças.

Levantou-se uma hipótese para justificar esse dado, pois se sabe que a medula espinal nas três primeiras semanas de vida do roedor é extremamente sensível a sinais do meio interno, e neste caso, com dois dias de vida houve um sinal bastante marcante (secção de um nervo periférico), fato que com certeza implica na

modificação da expressão de algumas proteínas medulares (Campbell, 2008), porém pode ser que algumas alterações retardem mais a acontecer e posteriormente a expressão de algumas proteínas estabilizam-se. Um exemplo disto são as proteínas ligadas a apoptose e a macrófagos, que são muito evidentes nos momentos seguintes a lesão e com o passar dos dias estabilizam-se, não sendo tão evidenciadas (Richardson e Lu, 1994; Campbell, 2008). Além disso, os receptores NGF apresentam-se com sua densidade aumentada nas células de Schwann por sete dias após a secção no nervo ciático (Taniuchi, *et al.*, 1986) Fatos como estes podem explicar o porquê da comparação das duas classes na idade P21 não ter resultado em tantas diferenças como na idade P7.

Dessa forma, foi estabelecido pelo ensaio piloto que a idade adotada para o decorrer dos experimentos seria a P7, conseqüentemente foram extraídas as proteínas das medulas dos ratos com sete dias de vida pelo protocolo já descrito (Figura 7).



**Figura 7:** Gel de poliacrilamida linear contendo as extrações das proteínas medulares dos três indivíduos que formam o *pool* das classes C (controle) e L (Lesado). As extrações são feitas individualmente, não há formação de *pool* nesta etapa.

## **5.2 Padronização da Eletroforese de duas dimensões e da detecção dos spots**

A eletroforese de duas dimensões é uma técnica que apresenta diversas variações de parâmetros, dependendo do tipo de amostra a ser utilizada. Sabendo disso, uma das preocupações iniciais deste estudo foi a de realizar a padronização necessária para atingir os interesses, como a observação do maior número de proteínas possíveis, com a amostra a ser estudada.

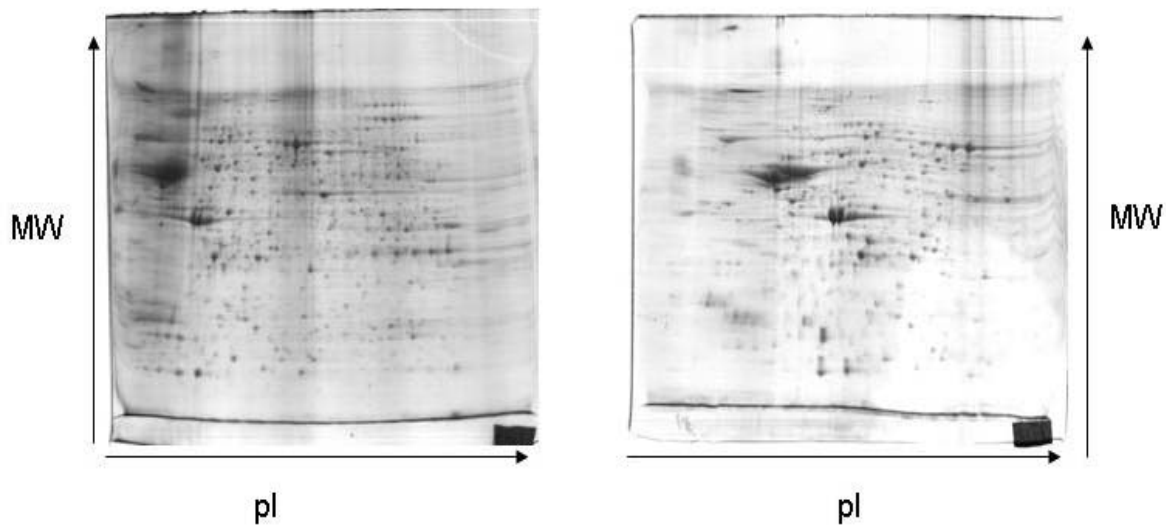
O presente estudo teve como objetivo central observar o perfil proteômico em diversas faixas de pH, para, como relatado anteriormente, otimizar a observação das proteínas e evitar a sobreposição (*overlapping*). Sendo assim, foi necessário padronizar a isoeletrofocalização para todas as faixas de pH que foram utilizadas.

As faixas de pH pretendidas para este trabalho foram a 3-10 não-linear para observar uma disposição mais ampla das proteínas, contendo proteínas ácidas e básicas; faixa 4-7 linear para realçar a região levemente ácida e neutra da amostra, com intuito de ampliar uma região que geralmente apresenta um número muito grande de *spots*; faixa 6-11, para observar principalmente as proteínas básicas.

Durante a padronização da IEF muitos fatores devem ser considerados para evitar a existência de arrastes horizontal e vertical, entre eles estão a eliminação de sais da amostra, ajuste do tempo de focalização, pois não pode ser muito curto nem muito longo e a quantidade de amostra e de anfólitos carreadores a serem aplicados (Berkelman e Stenstedt, 1998).

A padronização baseou-se nos experimentos de Kunz e colaboradores (1995) e de Shiniti (2008), entretanto com algumas alterações.

Para os géis 3-10NL e 4-7 linear a padronização que gerou os melhores resultados de visualização de *spots* foi realizada em aparelhos IPGphor e integrada por 12 horas de reidratação, seguida por três etapas de focalização: 500V por uma hora, 1000V por uma hora e 8000V até atingir um acúmulo entre 90KVh e 100KVh (figura 8). Além disso, a quantidade de anfólitos carreadores manteve-se 2% do volume de amostra mais tampão, como sugerido pelo fabricante e a amostra aplicada foi de 600µg de proteínas.

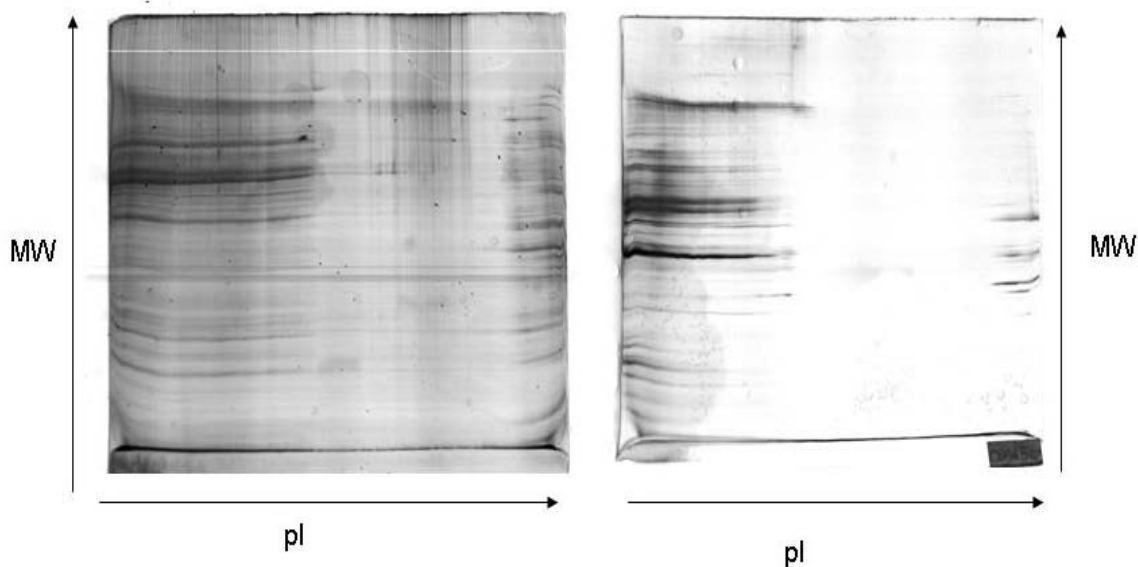


**Figura 8:** Perfil eletroforético das faixas 3-10NL (esquerda) e 4-7L (direita) em gel de poliacrilamida 12,5%. A quantidade de proteína aplicada foi de 600µg e a coloração por Comassie Blue Coloidal.

Já com as amostras submetidas à análise na faixa de pH 6-11 não foi possível estabelecer uma padronização. Inicialmente foram testados os mesmos parâmetros, o que resultou em inúmeros arrastes horizontais, denotando uma falha na focalização das proteínas em seus respectivos pIs (figura 9). Diversas tentativas foram feitas, reduzindo o tempo de focalização, aumentando o tempo de focalização, diminuindo a porcentagem de anfólitos carreadores para 1% do volume da amostra e depois para 0,5% e ainda foi testado diminuir a quantidade de proteínas aplicadas, corando o gel com nitrato de prata. Nenhuma das alternativas funcionaram.

Berkelman e Stenstedt (1998) relataram que as *strips* 6-11 necessitavam de um tipo de específico de aparelho para uma perfeita focalização. Esses são os aparelhos Multiphor, que adotam o sistema *cup-loading* de aplicação das amostras. Isto é, nesse sistema todo o volume de amostra mais tampão é aplicado ou na extremidade catódica ou na anódica (a escolha da extremidade depende de padronização) e durante a corrida a amostra cobre a *strip*. Nos aparelhos presentes no laboratório de proteômica, IPGphor, espalha-se a amostra por toda a *strip* antes de iniciar a focalização isoelétrica. Tendo em vista esse contratempo, não foi possível

padronizar a IEF para esta faixa de pH, sendo retirada do estudo. Diversos trabalhos enfatizaram e evidenciaram a dificuldade de padronização para estas tiras dessa faixa de pH (Eravci *et al.*, 2008; Mamone, *et al.*, 2005).



**Figura 9:** Exemplo de géis de poliacrilamida 12,5% de faixa de pH 6-11. Notar os arrastes horizontais evidenciando a falta de focalização. À esquerda foi acumulado 90KVh com 2% de anfólito e à direita 50KVh e 0,5% de anfólito.

Concluída a melhor padronização da IEF e da corrida eletroforética, o próximo passo foi o estabelecimento do melhor protocolo de detecção de *spots*, ou seja, da coloração dos géis, tendo em vista a otimização de parâmetros relativos como a sensibilidade do corante, o que vai determinar a eficácia e a quantidade de *spots* detectados, e a qualidade de quantificação destes *spots*.

As metodologias mais comumente empregadas, por serem pós-eletroforese e reversíveis, são a impregnação por nitrato de prata e a coloração por Coomassie Brilliant Blue (CBB). Os destaques destes métodos são o baixo custo e a compatibilidade com espectrometria de massas para a subsequente identificação das proteínas.

No período inicial do trabalho, julgou-se que a abordagem utilizando a metodologia de coloração por impregnação por prata seria a mais indicada para



provavelmente melhor verificar a diferença de expressão devido a sua alta sensibilidade. As amostras seriam economizadas, pois não necessitaria carregar uma quantidade muito grande de amostras por gel (cerca de 50µg).

No decorrer do trabalho, observou-se que a compatibilidade com a técnica de espectrometria de massas era bem mais baixa para proteínas de baixa abundância ao se comparar com o CBB (Kim et. al., 2004; Gigy et. al., 2000) e, além disso, a quantificação de proteínas apresentava-se deficitária visto que não oferece grande linearidade entre a intensidade do *spot* e a quantidade de uma determinada proteína, tornando difícil uma comparação mais precisa, especialmente entre diferentes géis (Rabilloud, 1999).

Sendo assim, a abordagem utilizando Coomassie (G ou R) foi empregada por apresentar a tal linearidade entre quantidade de proteína e tamanho do *spot* assim como uma total compatibilidade com espectrometria de massas. Todavia, a estratégia de utilizar CBB R-250 (Fazekas et al., 1963) foi descartada por sua sensibilidade ser de 5 a 50 vezes menor que a coloração por prata.

Logo, adotou-se uma estratégia em que combinasse a propriedade de detecção quantitativa do Coomassie e que se aproximasse da sensibilidade da detecção por nitrato de prata e ainda que fosse compatível com espectrometria de massas. Após algumas experiências de padronização foi definida a estratégia que seria utilizada no decorrer do trabalho. Seguindo o protocolo descrito por Candiano e colaboradores (2004) adotou-se a coloração por Coomassie Blue Coloidal (Coomassie G-250) ou “Silver Blue”. O motivo para isso foi o fato deste corante apresentar alta sensibilidade, próxima da técnica do nitrato de prata convencional, mostrando-se mais adequada para análise, verificação, comparação e identificação de proteínas de baixa expressão.

### 5.3 Análise do Perfil Proteômico das diferentes classes na faixa de pH 3-10NL e 4-7L

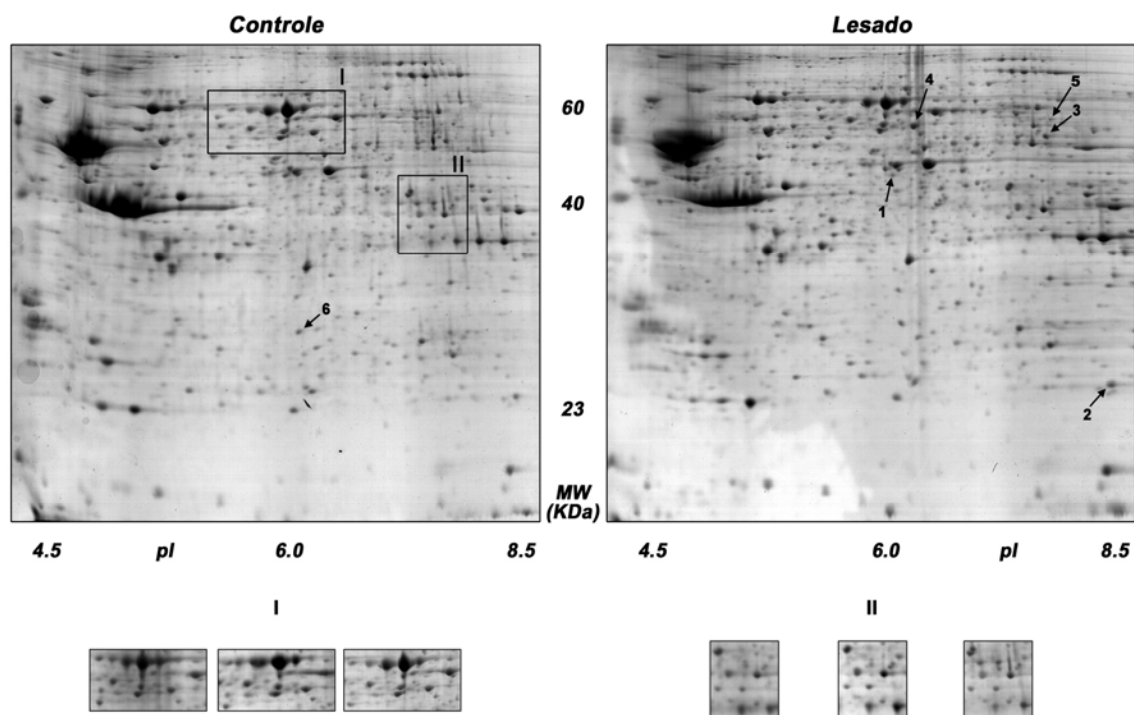
A padronização foi feita para garantir a reprodutibilidade da técnica. Esta etapa foi essencial para a o estudo utilizando uma estratégia proteômica, pois, visa minimizar as diferenças intraclasses produzidas por diferentes corridas, e com isso, maximizar as diferenças extraclasses produzidas pela expressão diferencial diversa.

Após a etapa de padronização da IEF nas faixas de pH 3-10NL e 4-7L , da corrida eletroforética e da coloração dos géis utilizando amostras medulares de ratos, foram confeccionados alguns géis nesta faixa de pH, para as duas classes analisadas em ambas as faixas de separação de proteínas, todavia os géis obtidos passaram por uma seleção levando em consideração a reprodutibilidade dos *spots* nos diferentes géis, selecionando os três melhores géis por classe (n=3), tornando possível, assim, a posterior comparação entre as classes.

Nesta confecção, foram aplicados, em cada gel, 600µg de proteína total extraídas da região lombar da medula espinhal dos neonatos (P7), sendo 200µg de cada indivíduo, totalizando assim o *pool* de três indivíduos como proposto anteriormente nos materiais e métodos. O gel foi confeccionado com uma concentração de 12,5% de acrilamida durante todos os experimentos.

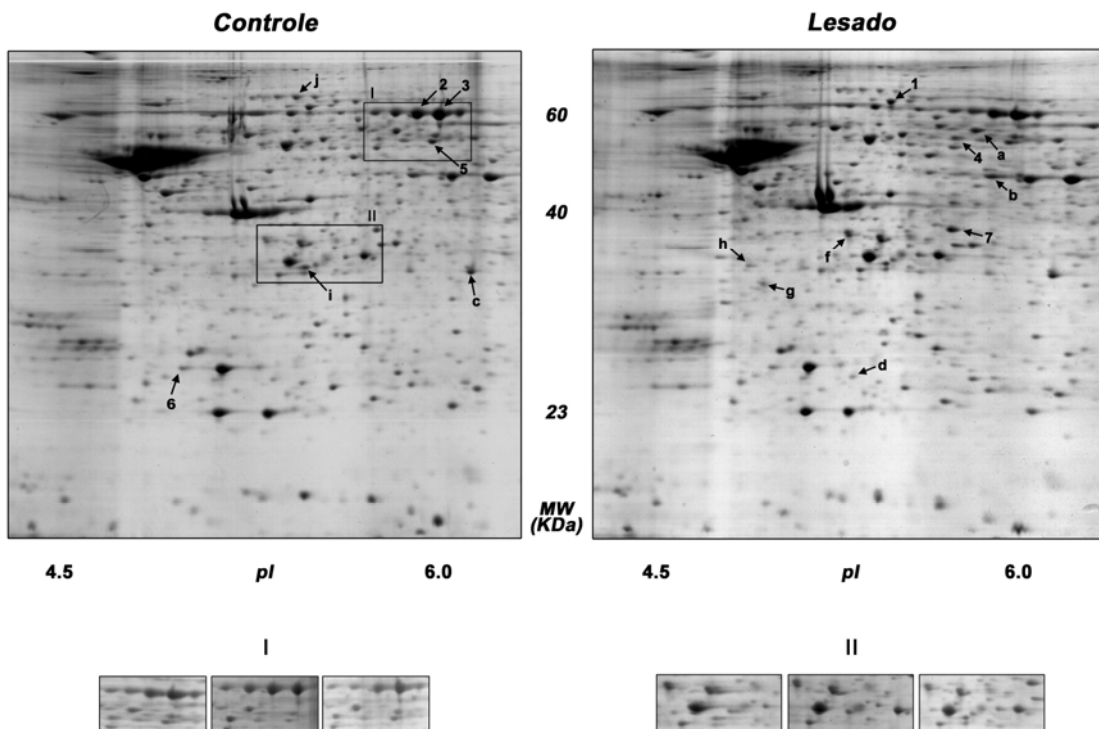
Dessa forma, foi obtido os perfis proteômicos de medula espinhal na faixa de pH 3-10NL e na faixa de pH 4-7L em triplicata. Isso foi obtido para ambas as classes analisadas: a classe “lesado”, a qual sofreu previamente lesão periférica no nervo ciático e a classe “controle”, que permaneceu íntegra.

Na figura 10 observa-se um dos géis da triplicata de cada uma das classes com as proteínas separadas em uma faixa de pH 3-10NL.



**Figura 10:** Perfil proteômico na faixa de pH 3-10NL da medula espinhal de *Rattus norvegicus* em duas distintas situações: “lesado” e “controle”. Os *spots* indicados por número são aqueles que apresentaram diferença significativa de expressão ( $P < 0,05$ ). As duas regiões (I e II) demarcadas por quadro foram destacadas abaixo e comparadas com os outros géis da triplicata comprovando a reprodutibilidade da técnica.

Na figura 11 encontra-se o que foi observado utilizando uma faixa de pH mais restrita, a 4-7L. Novamente observa-se na figura um gel por classe, as quais têm a comparação feita a partir da triplicata ( $n=3$ ) obtida. As classes continuam sendo lesado, que contém os indivíduos que sofreram uma prévia lesão e controle, àqueles que não sofreram tal lesão.



**Figura 11:** Perfil proteômico na faixa de pH 4-7L da medula espinhal de *Rattus norvegicus* em duas distintas situações: “lesado” e “controle”. Os *spots* indicados por número são aqueles que apresentaram diferença significativa de expressão ( $P < 0,05$ ). As letras representam os *spots* que apresentaram diferenças, porém estas não foram estatisticamente relevantes ( $P > 0,05$ ). As duas regiões (I e II) destacadas por quadro foram evidenciadas logo abaixo, assim como as correspondentes nos outros géis da triplicata comprovando a reprodutibilidade da técnica.

Perante os resultados observados em ambas as faixas de separação de proteínas, nota-se que houve uma boa representatividade de *spots* nos géis de ambas as classes, denotando uma escolha adequada referente à coloração empregada, no caso, *coomassie blue* coloidal, assim como, uma confiabilidade de resultados para comparação.

Evidencia-se ainda a semelhança dos géis das diferentes classes em uma primeira macroanálise, fato que já era esperado devido tratar-se de perfis proteômicos de uma mesma região anatômica (intumescência lombar).

Verificando mais atentamente as regiões destacadas (Quadro I e II das figuras 10 e 11), assim como o correspondente destas regiões nos outros géis da triplicata (Figura 10 e 11) pode-se inferir que a reprodutibilidade da técnica foi estabelecida

com sucesso, visto que os mesmos conjuntos de proteínas são verificados em todos os géis da triplicata. Fato esse que corrobora as especificações de López (2007) o qual afirma que para uma análise proteômica confiável, todos os géis de um grupo ou classe, que são submetidos a uma mesma condição de corrida eletroforética necessitam de uma eficiente reprodutibilidade para ser adequado estabelecer uma coerente comparação entre esses e géis de outros grupos submetidos à mesma condição de corrida.

No quadro I da figura 10, por exemplo, evidencia-se um conjunto de três *spots* bem intensos em todos os géis da triplicata, assim como é observado em todos os géis que o quadro II da mesma figura destaca, cinco *spots* bem expressos, o que denota empiricamente a reprodutibilidade da técnica. Observa-se o mesmo fato nas regiões destacadas por quadros na figura 11, onde os *spots* presentes no gel escolhido como sendo o de referência também estão presentes nos demais.

#### **5.4 Análise computacional das imagens**

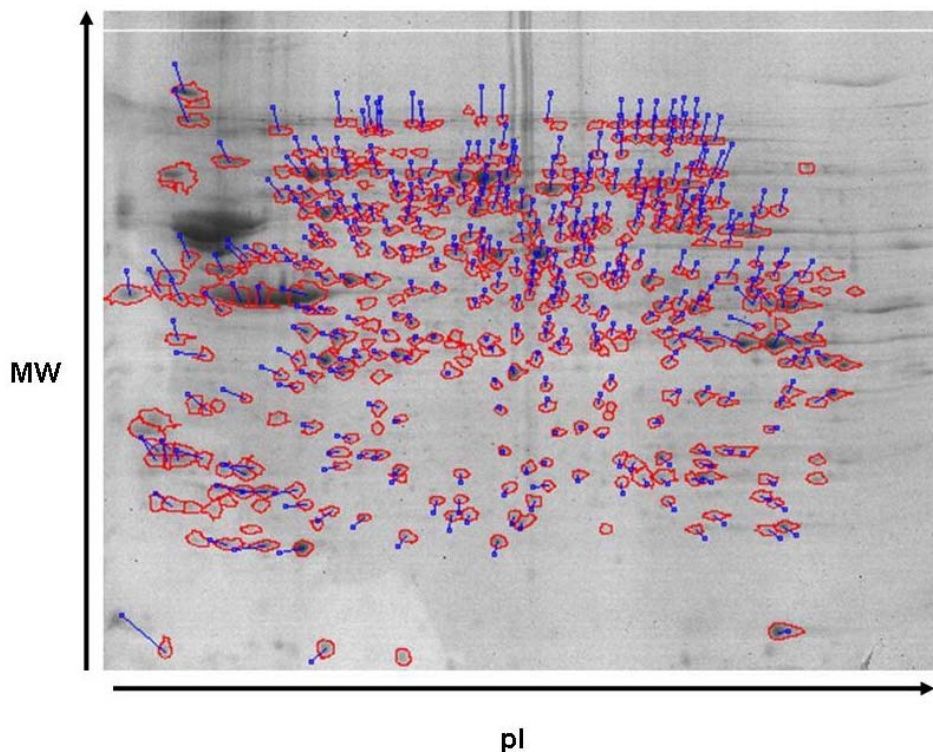
Após a obtenção das imagens da eletroforese das duas dimensões nas duas faixas de pH, foi notada a presença de centenas de *spots*. Para comparar quantitativamente esse número imenso de dados detectados é necessária uma ferramenta robusta e confiável. Sendo assim, o uso adequado de algum *software* para análise computacional é imprescindível. (Marengo *et al.*, 2005).

Como relatado no item 4, em materiais e métodos, o software utilizado foi o Melanie 5.02 (GeneBio - S.A., Swiss Institute of Bioinformatics, Geneva, Switzerland), que conta com uma interface simples e presença de ferramentas para análise estatística, algo fundamental na comparação entre as classes para a seleção dos *spots* diferencialmente expressos.

Nesta referida análise, todos os *spots* obtidos foram detectados e comparados (*matching*) quantitativamente entre as diferentes classes. A finalidade foi a de encontrar aqueles que apresentem uma expressão diferencial, para que com isso fossem encaminhados para análise de espectrometria de massas.

Analisando tanto a classe “lesado” como a classe “controle” nas duas faixas de pH estudada, logo na fase de detecção automática dos *spots* foi observada uma alta similaridade entre os géis no que diz respeito ao seu perfil proteômico geral.

O passo seguinte à detecção automática foi a correção e verificação manual dos *spots*, isto é, quando foi verificado se tudo o que o programa delimitou e apontou como sendo um *spot* realmente era ou tratava-se de artefatos. Feito isso, a média de *spots* detectados na classe lesado foi de 406 na faixa de pH 3-10NL e 295 na faixa de pH 4-7L. Para a classe controle, a média de *spots* detectados foi de 442 na faixa de pH 3-10NL e 287 na faixa de pH 4-7L. O gel que apresentou a melhor representatividade de *spots*, dentre os três que compunham a triplicata, foi escolhido como sendo o gel de referência e a partir deste o programa permitiu a confecção de um gel sintético e a normalização da intensidade dos géis, para que a comparação entre as classes (figura 12) fosse feita de forma fidedigna e confiável.



**Figura 12:** Imagem do programa Melanie 5.02 comparando géis da faixa de pH 3-10 NL das duas classes. As linhas azuis mostram a posição relativa dos *spots* da classe “lesado”, os quais foram pareados com aqueles detectados em vermelhos, da classe “controle”.

Como relatado no item quatro (Materiais e Métodos) o programa Melanie apresenta a possibilidade de utilizar no próprio programa testes estatísticos nas amostras estudadas. Sendo assim, foi utilizado uma dessas ferramentas estatísticas disponibilizadas, o Teste T, teste muito utilizado por outros autores para a comparação de duas classes distintas de amostras (Martins-de-Souza, *et al.*, 2008; Martins-de-Souza, *et al.*, 2009).

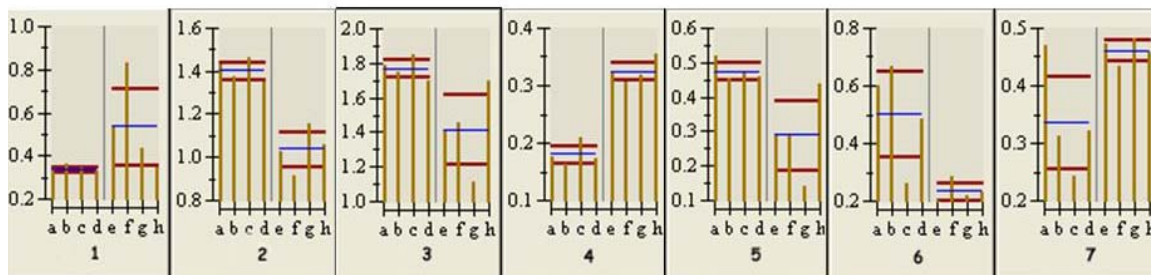
Todos os *spots* detectados pelo programa que apresentaram pares na outra classe puderam ser submetidos a esse teste estatístico, visando com isso encontrar o valor  $p$ , para observar se há ou não variância estatística significativa entre os *spots* pareados nestas diferentes condições. Se  $p < 0,05$  há uma variância significativa, ou seja, a diferença encontrada não foi por acaso, realmente existe uma alteração na expressão desta proteína. Para encontrar o  $p$ , tendo o valor de T, foi necessário o auxílio de uma tabela estatística padrão, a qual relaciona valores de T, grau de liberdade da amostra e valores de  $p$ .

Primeiramente foram submetidas à análise computacional as imagens relativas aos géis da faixa 4-7L. Submetendo todos os *spots* que foram pareados nas duas classes estudadas ao teste T, foram observadas diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em sete destes *spots*. Os valores obtidos no Teste T para estes *spots* estão evidenciados nas tabelas 2 e 3.

Os algarismos arábicos (1-7) na figura 11 evidenciam quais são esses *spots* e onde eles estão localizados no perfil proteômico. Já as letras, que também apontam a *spots* na mesma figura (figura 11), retratam *spots* que, em um primeiro momento, demonstravam a apresentação de uma diferença quantitativa significativa, todavia tal fato foi rechaçado pelo Teste T, mostrando que as diferenças de expressão destes *spots* entre as classes não eram significativas ( $p > 0,05$ ).

Para evidenciar a diferença quantitativa de expressão dos *spots*, o *software* gera histogramas nos quais é comparado o volume relativo deste *spot* em cada um dos géis que compõe a triplicata, além da comparação feita com os géis da outra classe. Pode-se ainda observar os dados do gel sintético confeccionado pelo próprio *software*.

Os histogramas correspondentes aos *spots* diferencialmente expressos na faixa de pH 4-7 linear estão representados na figura 13. Na parte inferior do histograma pode-se observar a qual *spot* ele está representando (1 a 7).



**Figura 13:** Histogramas da variação do volume relativo dos 7 *spots* com expressão diferencial entre as classes “controle” e “lesado” na faixa de pH 4-7L. As letras a, b, c, d, representam o volume do spot correspondente nos géis “controle” e as letras e, f, g, h nos géis “lesado”.

No gráfico, as barras amarelas correspondem ao volume do *spot* naquele gel, a linha horizontal azul representa a tendência central e as linhas horizontais vermelhas os limites extremos.

Sendo as letras a, b, c, d correspondente aos géis controle e as letras e, f, g, h aos géis lesados, pode-se evidenciar na figura 13, pelas barras amarelas verticais dos histogramas, que os *spots* 2, 3, 5 e 6 são mais expressos nos géis da classe controle, em contrapartida os *spots* 1, 4 e 7 são mais expressos nos géis da classe lesado.

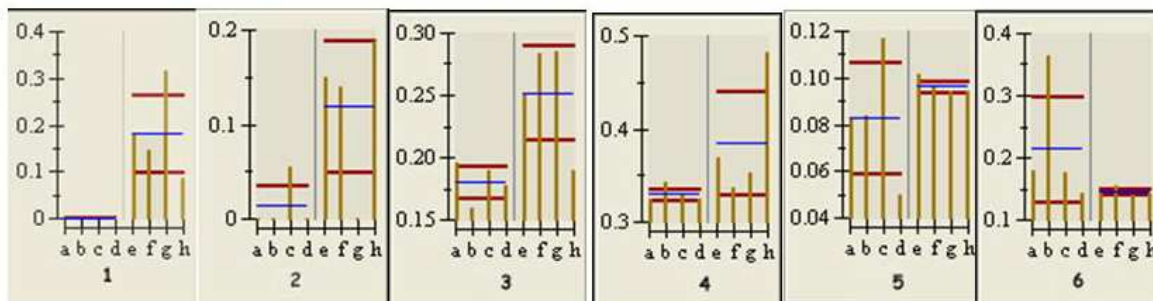
Outro dado revelado pelos histogramas da figura 13 é que todos esses *spots* estão presentes em todos os géis de ambas as triplicatas.

Posteriormente, foram submetidas à análise computacional as imagens dos géis da faixa de pH 3-10NL. Após ser realizado o Teste T, revelou-se a presença de seis *spots* com uma expressão diferencial significativa entre as classes “controle” e “lesado”. Tais *spots* estão apontados na figura 10 colocada no subitem anterior. Nesta figura observam-se as posições desses *spots* de interesse no perfil proteômico da amostra. Os valores do teste T para estas proteínas foram postados na tabela 4.

Novamente, o programa Melanie gerou histogramas relativos a cada um dos seis *spots*, a fim de verificar e demonstrar a diferença da expressão quantitativa dos *spots* entre as classes e revelar a expressão desses em cada gel das triplicatas.



Estes histogramas que correspondem às proteínas diferencialmente expressas ao analisar a faixa de pH 3-10NL estão representados pela figura 14. Na parte inferior do histograma pode-se observar a qual *spot* ele está representando (1 a 6).



**Figura 14:** Histogramas da variação do volume relativo dos 6 *spots* com expressão diferencial entre as classes “controle” e “lesado” na faixa de pH 3-10NL. As letras a, b, c, d, representam o volume do *spot* correspondente nos géis “controle” e as letras e, f, g, h nos géis “lesado”.

Nos histogramas, os géis da classe controle estão representados pelas letras a, b, c, d enquanto os géis da classe lesado estão representados pelas letras e, f, g, h. Além disso, como citado acima, as barras amarelas correspondem ao volume do *spot* naquele gel, a linha horizontal azul representa a tendência central e as linhas horizontais vermelhas os limites extremos.

A figura 14 revela que cinco dessas proteínas que apresentaram relevância estatística estão mais expressas na amostra referente à classe “lesado” (1-5) e apenas uma na classe “controle” (6).

Além disso, pelo primeiro histograma (1) pode-se concluir que o *spot* em questão não está presente nos géis da classe controle, pois não houve o registro dos dados sobre o volume relativo do *spot* nas letras correspondentes, sendo assim o teste T não pode ser realizado para este *spot* (Tabela 4).

Já os demais histogramas denotam que os *spots* estudados estão presentes em ambas as classes, porém com variância significativa.

Em suma, a análise computacional permitiu selecionar os *spots* de interesse, ou seja, aqueles que revelaram apresentar diferenças significativas de expressão para duas condições ambientais distintas.

Portanto, justifica-se assim o porquê de tais *spots* tenham sido submetidos à análise de espectrometria de massa com intuito de conhecer sua identidade proteica.

## 5.5 Identificação das proteínas por MS

O programa Melanie, após detectar todos os *spots* em cada um dos géis, apontou os *spots* que estavam diferencialmente expressos entre as duas classes estudadas. Tais *spots* foram então extraídos dos géis e submetidos individualmente a uma digestão trípica, que gerou um conjunto de peptídeos para cada um dos *spots*, baseando-se no protocolo padrão de Schevechenko (1996) com algumas modificações, dentre elas uma etapa adicional de purificação em colunas Zip Tip C18 (Millipore). Os peptídeos purificados foram finalmente analisados por espectrometria de massas (MS) do tipo MALDI-ToF e através do método de *peptide mass fingerprinting*, a identificação inequívoca de cada uma das proteínas foi realizada.

Nas análises realizadas de todos os *spots* por MALDI-ToF, os picos monoisotópicos dos espectros de massas foram submetidos à busca em bancos de dados (*Swiss-Prot*) por intermédio do programa *Expasy-Aldente* ([www.expasy.org/tools/aldente](http://www.expasy.org/tools/aldente)). A tolerância de erro considerada foi de no máximo 150 ppm, objetivando manter o erro abaixo dos 100 ppm para erros de calibração externa e 25 ppm para erros de calibração interna. Além disso, no programa foram mantidas as informações padrões, ou seja, faixa de procura de pH (0 a 14), MW (0 a 200 Kda), foi definida a espécie *Rattus norvegicus* e foi estabelecido um mínimo de 5 hits de peptídeos (entre o teórico e o observado) para a proteína ser considerada *match*. A calibração externa do aparelho foi realizada utilizando o CALMIX 4700 (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA) que possui picos de massa conhecida e para a calibração interna foram utilizados eventuais picos de tripsina contidos na amostra.

Algumas análises foram realizadas em um espectrômetro MALDI-Q-ToF isto é, que possui a capacidade de quebrar peptídeos e gerar a sequência teórica dos aminoácidos que compõem o peptídeo estudado. Para as análises neste aparelho

foram utilizadas uma tolerância de fragmento de 0,1Da, faixa de procura de pH (0 a 14), MW (0 a 200 Kda) e manteve-se a tripsina como a enzima utilizada para quebrar a proteína. O banco de dados que foi feita a busca continuou sendo o *Swiss-Prot*, todavia o programa alterou-se para o *MASCOT* ([http://www.matrixscience.com/search\\_form\\_select.html](http://www.matrixscience.com/search_form_select.html)).

### **5.5.1 Identificação das proteínas observadas na faixa de pH 4-7L**

Posteriormente ao estabelecimento do melhor protocolo para extração dos peptídeos, iniciou-se a análise por MS dos spots presentes nos géis de poliacrilamida obtidos a partir da utilização das IPG 4-7L.

Inicialmente, os *spots* de proteínas que estariam diferencialmente expressas dos géis para a identificação foram escolhidos visualmente. Entretanto, alguns destes *spots*, indicados pelas letras a-j na figura 11, não foram validados como significativamente diferentes entre os perfis 2De. Na tabela 1, foram colocadas as respectivas informações destas proteínas como a identificação do *spot*, valor da massa molecular (MW), ponto isoelétrico (pI), *score* entre outros dados. Estes dados foram colocados para efeito de informação, sem posteriores análises, visto que tais proteínas não são diferencialmente expressas ( $p > 0,05$ ) segundo o teste estatístico ao qual foram submetidas.

**Tabela 1:** Proteínas identificadas por MALDI-ToF em géis com faixa de pH 4-7L que não são significativamente diferencialmente expressas entre as classes estudadas.

<b>Spot</b>	<b>Acesso</b>	<b>Proteína</b>	<b>pI</b>	<b>MW</b>	<b>Hits</b>	<b>Score</b>	<b>Cobertura</b>
a	Q62952	Dihydropyrimidinase-related protein 3	6,0	62	8	18,92	21%
b	P04764	Alpha-enolase	6,2	47	12	43,48	31%
c	O88989	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	6,2	36	7	15,22	21%
f	Q6P9V9	$\alpha$ -1B Tubulin chain	5,0	50	9	18,25	30%
g	P69897	$\beta$ -5 Tubulin chain	4,8	50	8	14,25	19%
h	Q920J4	Thioredoxin-like protein 1	4,8	32	7	16,29	36%
i	Q4QRB4	$\beta$ -3 Tubulin chain	4,8	50	6	14,18	15%
j	P02773-2	Alpha-fetoprotein	5,8	37	6	15,09	18%

\* **Acesso:** baseado na identificação da proteína no Swiss-Prot; **pI:** ponto isoelétrico teórico; **MW:** massa molecular teórica; **Hits:** número de peptídeos identificados da proteína; **Cobertura:** porcentagem da proteína coberto pelo número de peptídeos identificados.

Diferentemente das proteínas citadas na tabela 1, o *software* após a análise estatística (Teste T) evidenciou a existência de sete *spots* com expressão diferencial entre as classes ( $p < 0,05$ ), sendo quatro super expressos na classe controle (*spots* 2, 3, 5, 6) e três super expressos na classe lesado (*spots* 1, 4, 7). Os referidos *spots* têm a sua localização nos géis de poliacrilamida indicada por algarismos arábicos na figura 11. A tabela 2 mostra dados de alguns destes *spots*, os quais foram identificados por MS MALDI-ToF. Entre estes dados estão a proteína identificada, número de acesso, pI, MW e valor de teste T e grau de cobertura da proteína.

Alguns *spots* não puderam ser identificados por MALDI-ToF e foram submetidos a uma análise em outro aparelho de MS, chamado MALDI Q-ToF. Este aparelho, além do espectro, fornece o perfil de quebra dos peptídeos assim como a sua provável sequência de aminoácidos. Os dados referentes a estes *spots* estão representados na tabela 3.

**Tabela 2:** Proteínas diferencialmente expressas identificadas por MALDI-ToF nos géis com faixa de pH 4-7L com significância estatística ( $p < 0,05$ ).

<b>Spot</b>	<b>Acesso</b>	<b>Proteína</b>	<b>pI</b>	<b>MW</b>	<b>Hits</b>	<b>Score</b>	<b>Cobertura</b>	<b>Teste T</b>
<b>Proteínas super expressas em animais lesados</b>								
1	P48037	Annexin A6	5,4	76	11	15,08	21%	8,36
4	P11598	Protein disulfide isomerase A3	5,8	54	19	67,42	34%	5,39
7	P69897	$\beta$ -5 Tubulin chain	4,8	50	10	16,24	23%	4,5
<b>Proteínas sub expressas em animais lesados</b>								
5	P11598	Protein disulfide isomerase A3	5,8	54	11	24,48	22%	4,98
6	Q00981	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	5,1	25	7	14,31	35%	4,83

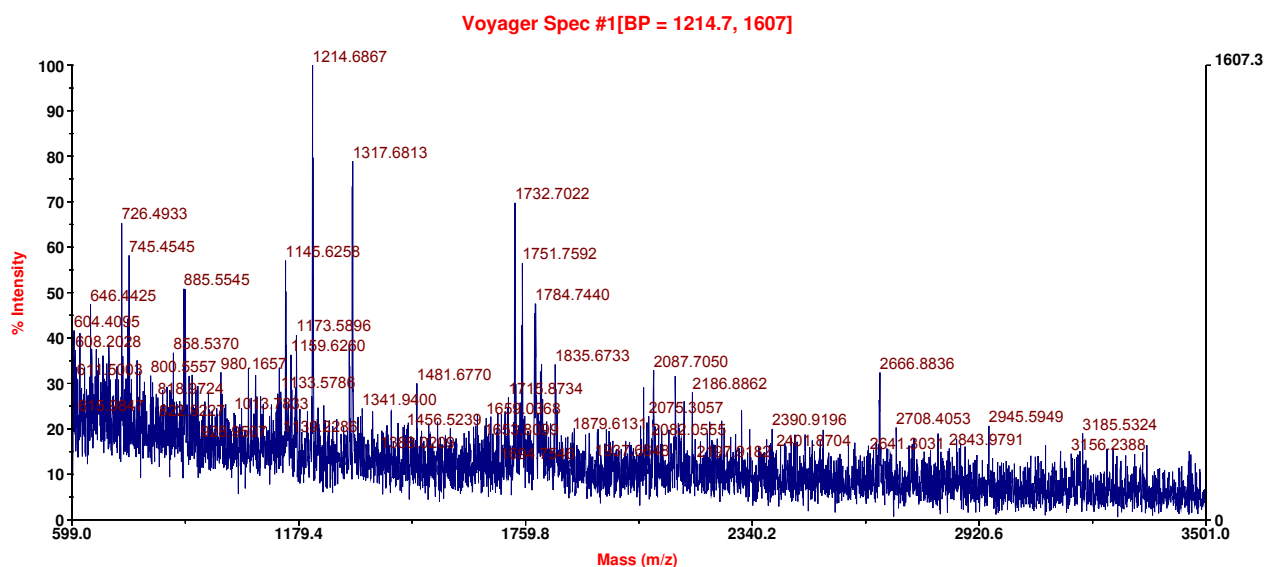
**Acesso:** baseado na identificação da proteína no Swiss-Prot; **pI:** ponto isoelétrico teórico; **MW:** massa molecular teórica; **Hits:** número de peptídeos identificados da proteína; **Cobertura:** porcentagem da proteína coberto pelo número de peptídeos identificados.

**Tabela 3:** Proteínas diferencialmente expressas identificadas por MALDI Q-ToF nos géis com faixa de pH 4-7L com significância estatística ( $p < 0,05$ ).

Spot	Acesso	Proteína	pl	MW	Hits	Score	Cobertura	TesteT
Proteínas sub expressas em animais lesados								
2	P02770	Serum albumin precursor	6,0	66,6	21	167	46,0	7,53
3	P02770	Serum albumin precursor	6,0	66,6	26	253	50,4	6,99

**Acesso:** baseado na identificação da proteína no Swiss-Prot; **pl:** ponto isoelétrico teórico; **MW:** massa molecular teórica; **Hits:** número de peptídeos identificados da proteína; **Cobertura:** porcentagem da proteína coberto pelo número de peptídeos identificados.

- **Spot 1: Anexina A6**



**Figura 15:** Espectro obtido por MALDI-ToF referente ao spot 1.

A proteína *AnexinaA6* (*Anxa6*) foi identificada pelo presente estudo como super expressa em ratos que sofreram lesão periférica (figura 15). Esta proteína é

caracterizada como sendo uma ligante de membrana que apresenta uma região com domínios conservados nos quais ocorrem a ligação de fosfolipídios dependentes de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) (Naciff, *et al.*, 1996; Kaetzel, M & Dedman, J.R., 2004). Essa ligação ocorre na superfície aniônica do fosfolipídio dependente de cálcio (Kaetzel, M & Dedman, J.R., 2004).

Por ser intimamente relacionada com este íon, a Anxa6 desempenha uma função importante em diferentes células do organismo de um mamífero, como em células de músculo cardíaco e em células do tecido ósseo.

A Anxa6 é a mais abundante no coração, e, dependendo da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  participa em eventos relacionados com membrana, como endocitose, exocitose, apoptose e liga-se a proteínas do citoesqueleto (Camors *et al.*, 2004). Além disso, desempenha a função de se ligar à actina e estabilizar os sarcolemas presentes nos cardiomiócitos durante a estimulação celular, todavia para isso depende necessariamente da presença de cálcio celular (Locate *et al.*, 2008). Wang *et al.*, (2002) demonstraram que o influxo de cálcio para dentro da placa de crescimento dos condrócitos é mediado pela Anexina VI, e está diretamente envolvida na diferenciação, mineralização e apoptose deste tipo celular.

Em medula espinhal, esta proteína em específico tem uma distribuição abrangente, pois se concentra tanto em gânglios nervosos dorsais como em pequenos neurônios sensitivos e motores, principalmente nas membranas plasmáticas. Esses padrões de localização diferencial podem refletir uma função biológica como transdução de sinais mediados por  $\text{Ca}^{2+}$  dentro do sistema nervoso central (Naciff, *et al.*, 1996).

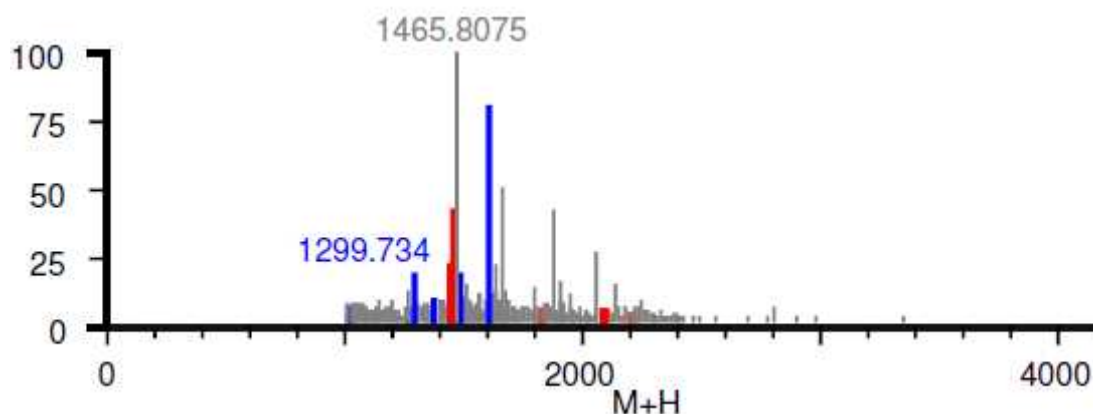
Estudos anteriores sugeriram a importância do canal de cálcio para o reparo e regeneração da membrana celular após uma lesão no tecido nervoso, visto que ao bloquear esses canais o reparo diminui significativamente e ao estimular a formação destes canais a regeneração era otimizada, desde que a concentração de cálcio não superasse um limite. Esses fatos indicam a importância do influxo de cálcio para a regeneração axonal (Kubaltski *et al.*, 2004; Nehrt *et al.*, 2007). Pode-se inferir que na situação onde ocorre o aumento da concentração de cálcio citosólico e da sua

passagem pela membrana ocorra um aumento na concentração das proteínas de membrana dependentes deste íon, como por exemplo, a Anxa6.

Kang e colaboradores em 2006 estudaram o mapa proteômico de uma medula espinhal lesionada e evidenciaram após 24 horas a presença de, entre outras proteínas, Anxa6 super expressa em relação ao tecido medular controle.

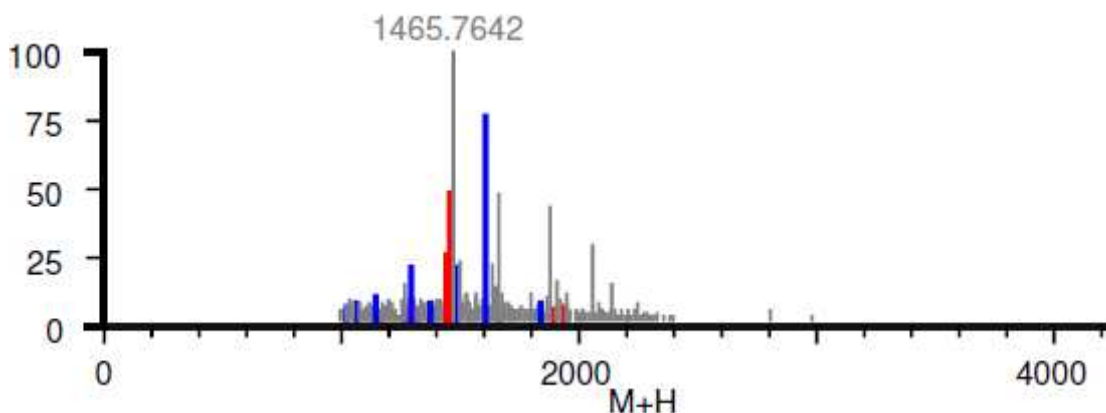
Dados como esses apresentados na literatura, em que é sugerida a importância do cálcio e do aumento da expressão de seus canais para a regeneração nervosa e a evidência da expressão diferenciada de anexina A6 em tecido nervoso lesionado, corroboram com o resultado obtido por este estudo, no qual se evidenciou uma super expressão da Anxa6, proteína cuja ação está mediada pela associação com fosfolipídios dependentes de cálcio, na classe de ratos em que houve a lesão nervosa.

- **Spot 2 e Spot 3: Albumina**



**Figura 16:** Espectro obtido por MALDI Q-Tof referente ao *spot* 2.





**Figura 17:** Espectro obtido por MALDI Q-ToF referente ao *spot* 3.

Os *spots* 2 e 3 resultaram após análise por MS MALDI Q-ToF na mesma identificação proteica, a albumina (Figuras 16 e 17). Como a própria imagem do gel (figura 11) retrata, a albumina é uma proteína muito expressa em mamíferos em geral e apresenta inúmeras funções conhecidas no organismo, como manutenção da pressão osmótica do organismo, conexão com a força muscular e transporte inespecífico de algumas substâncias no plasma sanguíneo.

A albumina é muito abundante no plasma sanguíneo e também está presente no líquor (líquido cefalorraquidiano).

Observa-se na figura 11 que os *spots* 2 e 3 são bastante expressos, algo que não aconteceu em todos os outros *spots* que apresentaram variância estatística entre classes. Sendo assim, apesar da possibilidade da albumina possuir algum tipo de função biológica decorrente da axotomia realizada nesta classe de ratos, infere-se que tenha ocorrido algum tipo de contaminação no momento da retirada mecânica da medula espinhal, seja pelo líquor ou pelo plasma sanguíneo do próprio neonato e devido a este fato a albumina não foi considerada por este estudo como uma proteína potencialmente envolvida no processo degeneração desencadeado pela lesão periférica.

- **Spot 4 e Spot 5: Proteína Dissulfeto IsomeraseA3 (PDI)**

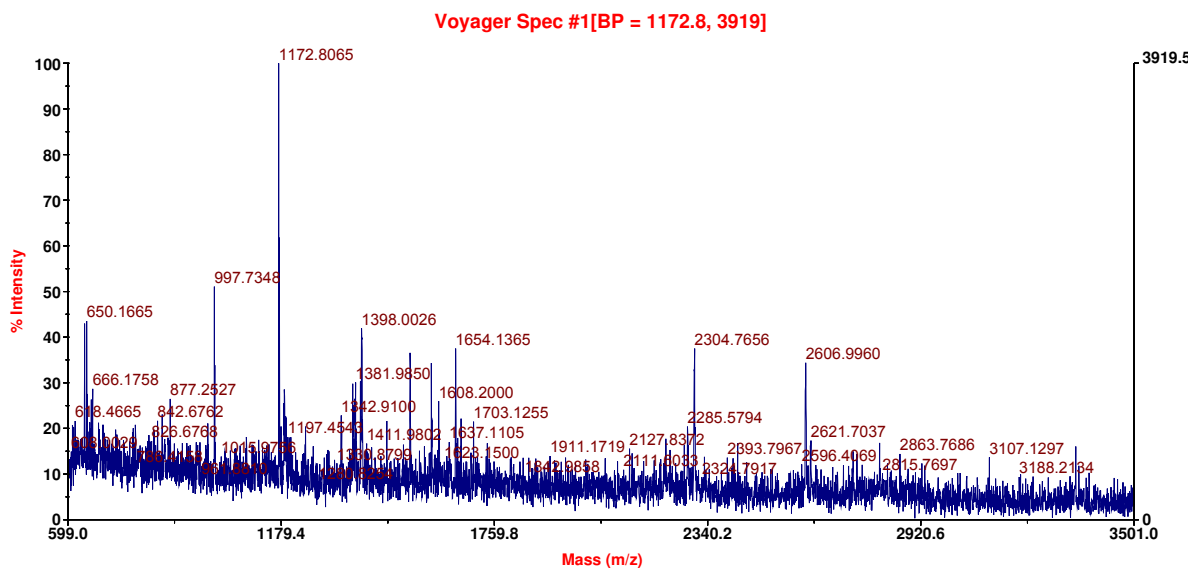


Figura 18: Espectro obtido por MALDI-ToF referente ao *spot* 4.

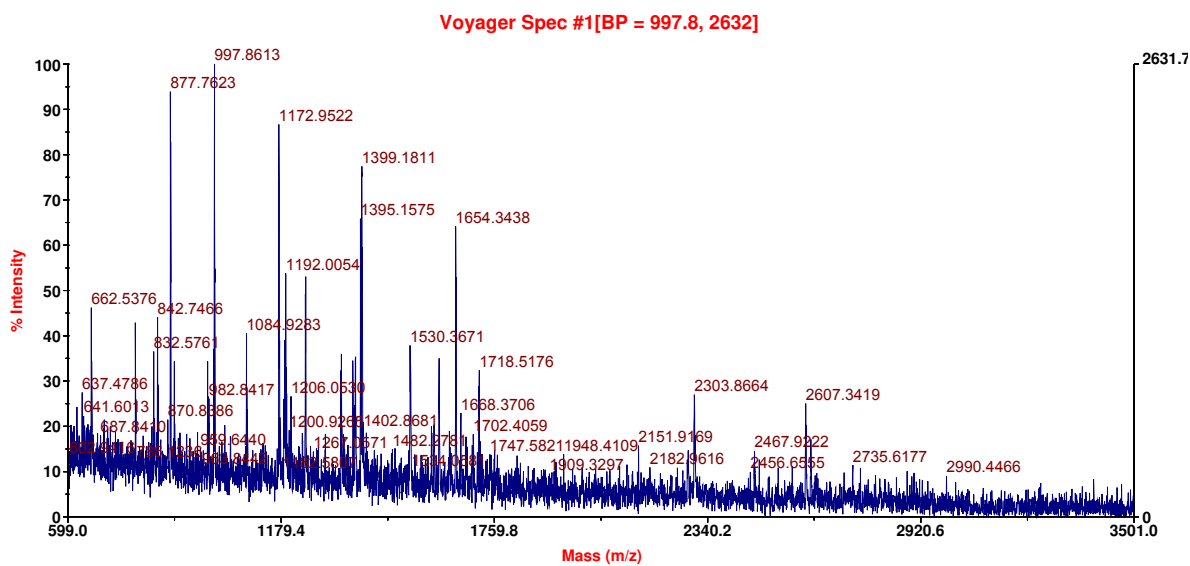


Figura 19: Espectro obtido por MALDI-ToF referente ao *spot* 5.

A proteína dissulfeto isomerase A3 (PDI) foi identificada em dois *spots* diferentes na presente análise (figuras 18 e 19). Entretanto a análise estatística indicou que os grupos nos quais ocorriam a super expressão eram contrastantes, isto é, a análise evidenciou que esta proteína um dos *spots* está presente na classe lesado e o outro *spot* está mais presente em ratos controle.

A maneira como está expressa, com a MW semelhante nos dois *spots* citados, porém com alteração no pI, sugere que deve ter ocorrido modificações pós-traducionais nesta proteína, alterando assim o seu pI (Pastorelli, *et al.*, 2006). Essas modificações podem ser, por exemplo, fosforilação ou perda de peptídeo-sinal. Estudos de proteoma têm recentemente apresentado interessantes resultados sobre o uso de perfis 2De para, não somente identificar proteínas diferencialmente expressas, mas também proteínas com diferentes modificações pós-traducionais, que podem levar a um papel diferencial de tal proteína (Ditzen *et al.*, 2006 e 2009; Kronsbein *et al.*, 2008).

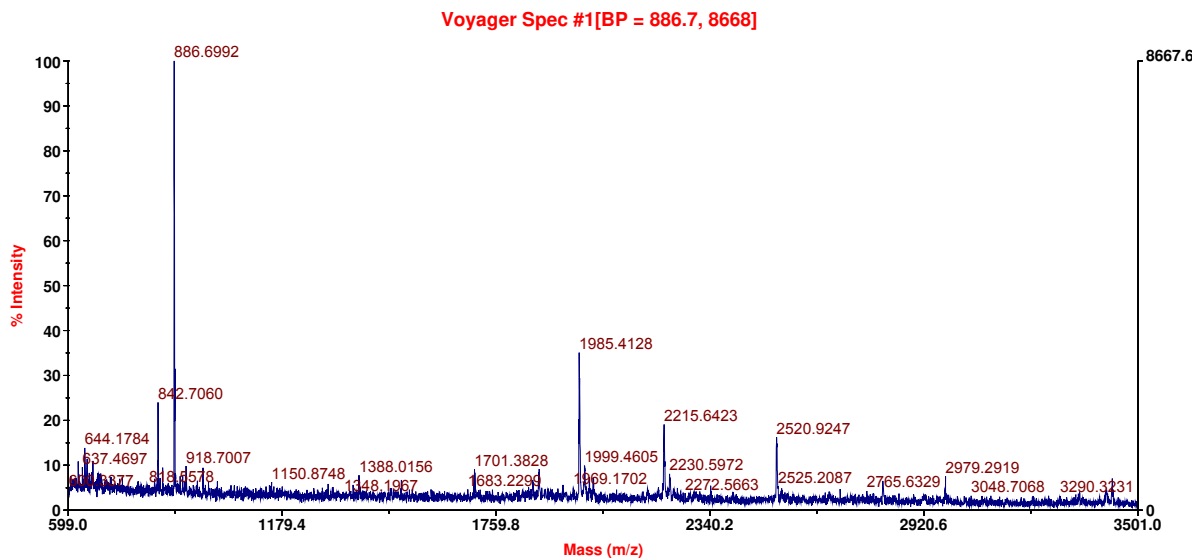
Esta proteína apresenta uma função na regulação nas reações de óxido-redução celular, pois é uma importante proteína oxidante (Kim, *et al.*, 2009). A PDI catalisa a formação de pontes dissulfeto no substrato e a sua isomerização. Na formação das pontes dissulfeto, essa reação implica na oxidação do substrato e redução da proteína, todavia a mesma proteína catalisa o sentido contrário de reação. Já para a reação de isomerização não ocorre oxidação da PDI (Wilkinson & Gilbert, 2004).

Após uma lesão tecidual de sistema nervoso, ocorre uma situação de intenso estresse oxidativo, na região lesada e na medula espinhal. Pode-se explicar tal fato devido às diversas espécies reativas de oxigênio, como o óxido nítrico (NO), que tem um papel importante na neurodegeneração do tecido nervoso. Pode-se inferir assim, que a presença em excesso da PDI em tecidos lesados pode ser explicada devido a existência de oxigênio em excesso, fato essencial para as reações de óxido-redução, nas quais a PDI apresenta uma importante função.

Para a classe controle, sugere-se que a constatação de uma presença maior de PDI, todavia com um pI diferente do constatado na classe lesado, é devido a

necessidade de modificações pós traducionais para que esta proteína seja funcional, ou seja, na classe controle, onde o tecido não se apresenta extremamente oxidado, a expressão da PDI é abundante na forma não modificada pós traducionalmente. Pode-se citar como um exemplo de modificação pós traducional a fosforilação.

- **Spot 6: Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase**



**Figura 20:** Espectro obtido por MALDI-ToF referente ao *spot 6*.

A proteína *Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1* (Uchl1) foi identificada pelo presente estudo como mais abundante em ratos que não sofreram lesão periférica (figura 20). Essa enzima é uma thiol protease que está envolvida no processamento de precursores de ubiquitina, hidrolisando um peptídeo específico na região C-terminal da ubiquitina (Chen, *et al.*, 2005). Essas proteínas apresentam uma função importante na maquinaria celular que rege a degradação de outras proteínas, função sináptica e apoptose neuronal (Hegde & DiAntonio, 2002)

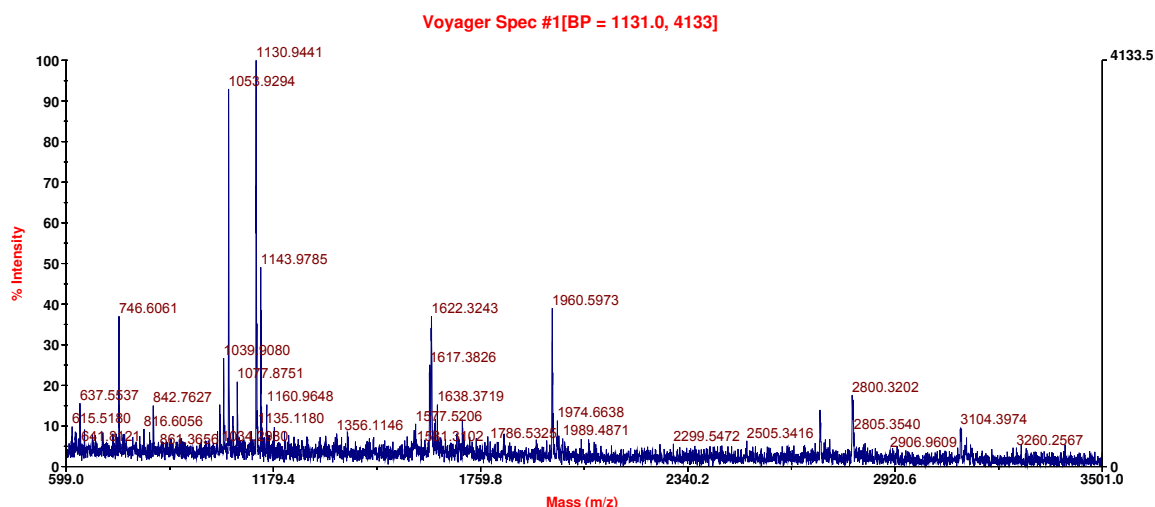
Alguns autores associaram a redução da quantidade dessa enzima com desordens neurodegenerativas como mal de Parkinson ou Alzheimer (Choi *et al.*, 2004; Lombardino *et al.*, 2005), alguns tipo de câncer (Tanaka *et al.*, 2008) e a perda axonal e morte celular (Mukoyama *et al.*, 1989).

O resultado obtido no presente trabalho mostra que na classe controle há uma maior presença da referida enzima, em comparação com a classe lesado. Dados da literatura, como os apresentados por Choi e colaboradores (2004), mostram o efeito prejudicial do estresse oxidativo na Uchl1, sugerindo desta maneira que a referida enzima é um dos principais alvos de oxidação, resultando em sua modificação e, por conseqüência, em danos irreversíveis a sua estrutura e função. Fatos como os apresentados permitem a justificativa do quadro evidenciado neste trabalho, isto é, justificam a sub expressão da Uchl1 na classe lesado e, por conseguinte, a maior abundância da mesma na classe controle.

Isso corrobora com o fato que a lesão nervosa periférica provoca um excesso de espécies reativas de oxigênio (EROS) aumentando significativamente o estresse oxidativo no tecido. Tendo em visto esses fatos, pode-se sugerir que esse excesso de moléculas oxidantes reaja com a Uchl1 alterando sua estrutura e forma e com isso ocorra a diminuição de sua expressão, tal qual ocorre com as doenças neurodegenerativas que a literatura destaca.

Com isso, sugere-se que a UchL1 está sendo danificada na classe lesado o que acarreta em uma diminuição da quantidade desta enzima nesta classe, fato que foi observado pelo teste estatístico.

- **Spot 7: Tubulina beta 5**



**Figura 21:** Espectro obtido por MALDI-ToF referente ao *spot 7*.

A proteína Tubulina beta 5 (Tubb5) foi identificada pelo presente estudo como super expressa em ratos que sofreram lesão periférica (figura 21). Pode-se justificar a super expressão desta proteína nos ratos lesados devido a sua íntima relação com o processo de regeneração neuronal após uma axotomia (Hoffman *et al.*, 1993).

Tanto a sobrevivência quanto a efetiva regeneração de neurônios após uma lesão periférica estão relacionadas com o aumento da expressão de genes ligados a formação de citoesqueleto, como por exemplo, os microtúbulos (Hoffman *et al.*, 1993; Fournier *et al.*, 1995), responsáveis pela reestruturação celular. Na medula espinhal foi observado um aumento na expressão do mRNA codificante de  $\beta$ -tubulina (Hoffman *et al.*, 1993) e a existência de uma super expressão de  $\beta$ -tubulina em medula espinhal após a lesão nervosa (Kang *et al.*, 2006), fatos que corroboram com os dados observados no presente estudo.

Com os dados observados, que os animais submetidos a uma lesão periférica apresentam super expressão de Tubb5 ao comparar-se com animais não lesados, e ainda sendo embasado pela literatura a qual apresenta alguns dados robustos sobre a observação da expressão diferenciada de  $\beta$ -tubulina, pode-se sugerir que a referida

proteína é importante para o reparo e para a regeneração nervosa, tanto estruturalmente como funcionalmente, após uma lesão nervosa periférica (Sharma *et al.*, 2009).

Portanto, é coerente e esperado observar a super expressão desta proteína em ratos que necessitam de um reparo celular, visto que é uma proteína presente no citoesqueleto celular, fato que ocorre em organismos que sofreram uma axotomização. Já em organismos intactos, a expressão deve manter-se em níveis normais, isto é, menos expressa ao se comparar com organismos super expressos.

### **5.5.2 Identificação das proteínas observadas na faixa de pH 3-10NL**

Prosseguindo com as identificações por MS dos *spots* presentes nos perfis 2De apontados como diferencialmente expressos pelo *software* iniciou-se a análise daqueles obtidos a partir da utilização das IPG 3-10NL.

Para esta faixa de pH, foram evidenciados seis *spots* diferencialmente expressos ( $p < 0,05$ ) entre as classes. Cinco destes *spots* (*spot* 1 ao *spot* 5) foram apontados como super expressos na classe “lesado” e apenas um (*spot* 6) como sub expresso, isto é, apresentando maior presença na classe “controle”. Os referidos *spots* têm a sua localização nos géis de poliacrilamida indicada por algarismos arábicos na figura 10.

Todas as identificações para esta classe foram realizadas em um espectrômetro de massa MALDI Q-ToF, isto é, que possui a capacidade de análise MS/MS, o qual fornece a provável sequência dos aminoácidos dos peptídeos analisados. Os dados referentes aos *spots* estão dispostos na tabela 4. Os *spots* 1, 3 e 6 não puderam ser detectados por MS provavelmente devido a baixa expressão destas proteínas na amostra, o que resulta em poucas cópias de peptídeos para análise por MS, dificultando a identificação.

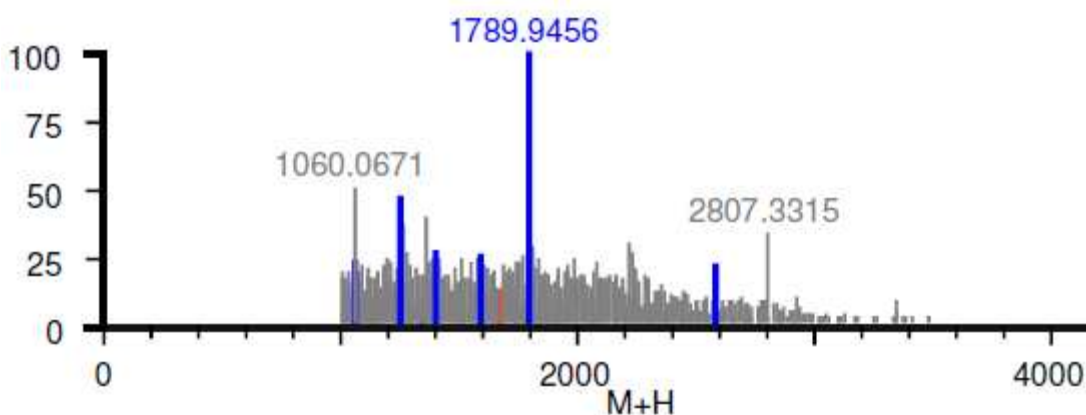
**Tabela 4:** Proteínas diferencialmente expressas identificadas por MALDI Q-Tof nos géis com faixa de pH 3-10NL com significância estatística ( $p < 0,05$ ).

<b>Spot</b>	<b>Acesso</b>	<b>Proteína</b>	<b>pI</b>	<b>MW</b>	<b>Hits</b>	<b>Score</b>	<b>Cobertura</b>	<b>Teste T</b>
<i>Proteínas super expressas em animais lesados</i>								
1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	-
2	P04905	Glutathione S-transferase Mu 1	8,35	25,8	12	110	61,75%	3,65
3	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	3,07
4	P05370	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	6,2	59,2	20	120	50,97%	3,43
5	P04762	Catalase	7,1	59,58	16	98	41,45%	3,65
<i>Proteínas sub expressas em animais lesados</i>								
6	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	3,25

**Acesso:** baseado na identificação da proteína no Swiss-Prot; **pI:** ponto isoelétrico teórico; **MW:** massa molecular teórica; **Hits:** número de peptídeos identificados da proteína; **Cobertura:** porcentagem da proteína coberto pelo número de peptídeos identificados.



- **Spot 2: Glutathione S-transferase Mu 1 (GSTM1)**



**Figura 22:** Espectro obtido por PMF referente ao spot 2.

A proteína *Glutathione S-transferase Mu 1 (GSTM1)* foi identificada como sendo super expressa em ratos que sofreram lesão periférica (Figura 22).

A função principal dessa enzima é a de catalisar a conjugação de compostos não-polares contendo carbonos eletrofílicos, nitrogênios ou átomos de enxofre, reduzindo, para isso, a glutathione (Hayes *et al.*, 2005).

Dessa maneira, a GSTM1 tem um papel fundamental no metabolismo de diversos compostos como drogas e pesticidas que contenham halogenonitrobenzenos, quinonas, carbonilas insaturadas (Strange *et al.*, 2001).

Além disso, essa enzima está também ligada ao metabolismo de peróxidos e outras EROS, metabólitos secundários formados pelo estresse oxidativo de um organismo (Oakley 2005), isto é, desempenha uma função importante na desintoxicação celular através da quebra de diversos compostos carcinogênicos e também por participar da defesa do organismo contra as moléculas oxidantes e mutagênicas.

No atual estudo esta enzima foi observada super expressa em ratos que sofreram a lesão periférica (figura 21). Sabe-se que, após uma lesão nervosa ou em algumas doenças neurodegenerativas são desencadeadas uma série de processos

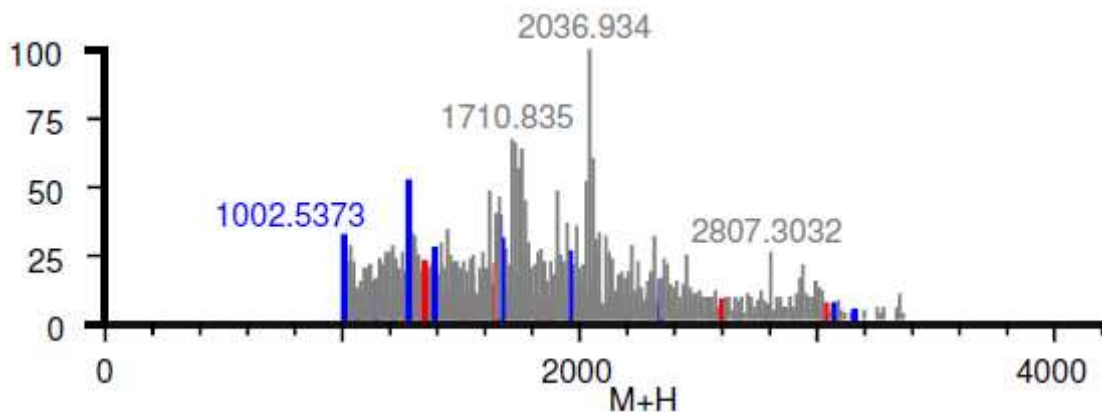
inflamatórios, e estes, entre outras consequências, são responsáveis pelo aumento das EROS no organismo (Floyd 1999). Quando um organismo está sob estresse oxidativo há uma super expressão de enzimas responsáveis pelo combate de moléculas como o peróxido de hidrogênio e radicais livres como a hidroxila e o ânion superóxido, entre estas enzimas estão a glutathione peroxidase e a catalase.

O ânion superóxido pode gerar metabólitos secundários responsáveis por danificar a membrana lipídica celular, entre esses metabólitos estão diversos hidroperóxidos que iniciam uma cascata de reações culminando na quebra de cadeias de ácidos graxos e formação de alguns compostos genotóxicos (Marnett *et al.*, 2003). No entanto, a enzima GSTM1, independentemente das peroxidases, tem a capacidade de conjugar os produtos da oxidação das membranas lipídicas com a glutathione e neutralizar a ação dessas moléculas, deixando assim de ser agressivas ao organismo. Sendo assim, as GSTs são enzimas responsáveis pela defesa do organismo contra subprodutos do estresse oxidativo que podem danificar as membranas celulares (Hayes *et al.*, 2005).

Pode-se sugerir desse modo que, assim como todas as outras enzimas responsáveis pela proteção do organismo contra algum tipo de EROS, as GSTs também têm sua expressão aumentada em uma situação em que há estresse oxidativo.

Pressupondo que a lesão nervosa inicia uma cadeia de reações oxidantes e, conseqüentemente, gera a formação de radicais livres danosos ao organismo justifica-se o porquê da expressão aumentada da GSTM1 na classe “lesado”.

- **Spot 4: Glicose 6-fosfato 1-desidrogenase**



**Figura 23:** Espectro obtido por PMF referente ao *spot 4*.

Foi identificada como sendo a Glicose 6-fosfato 1-desidrogenase (G6PD) a proteína representada pelo *spot 4* (Figura 23). Esta proteína, segundo testes estatísticos, está super expressa em ratos que sofreram lesão de nervo ciático com dois dias de vida.

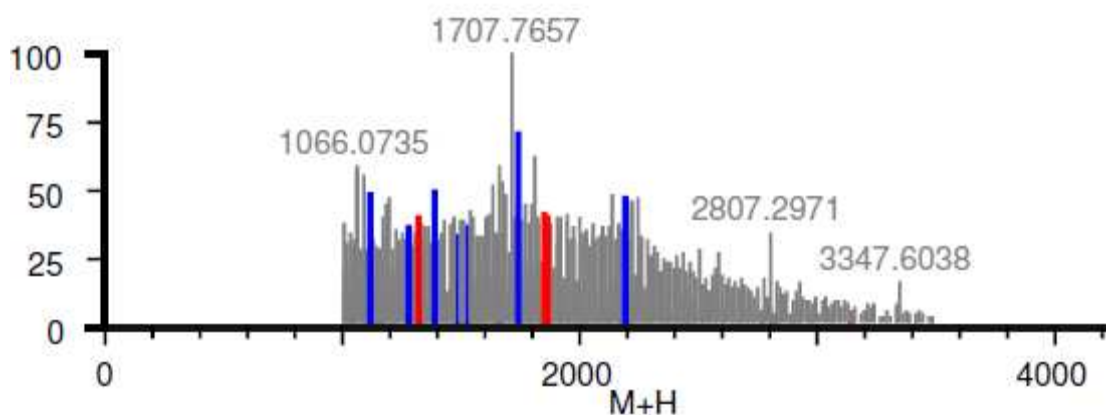
A G6PD é uma proteína que apresenta uma importante função na via das pentoses-fosfato, pois é uma dos componentes da maquinaria que transforma a glicose 6-fosfato em ribose 6-fosfato, essencial para síntese de nucleotídeos, gerando NADPH. A via das pentoses-fosfato é uma alternativa a glicólise e apresenta duas fases, a oxidativa e a não oxidativa. Na fase oxidativa ocorre a redução de  $\text{NADP}^+$  em NADPH, um agente redutor utilizado pelo organismo em reações anabólicas, como síntese de ácidos nucleicos e de lipídeos.

Além disso, o NADPH tem um importante papel de defesa celular contra a toxicidade das EROS, pois participa do processo de defesa do organismo por ser um doador de elétrons, principalmente reduzindo a glutatona, a qual também está envolvida com a neutralização da toxicidade das EROS (Pompella *et al.*, 2003).

Considerando essa função citada do NADPH no organismo e pressupondo que ao lesar o tecido nervoso aumenta significativamente o estresse oxidativo, pois se dá início à formação de EROS (Floyd 1999), sugere-se que, devido a este aumento

relatado, ocorreu a super expressão de enzimas que combatem os efeitos citotóxicos destas moléculas, entre elas, a glicose 6-fosfato 1-desidrogenase a qual apresenta como uma de suas principais características a condição de produzir NADPH, que como relatado, participa da defesa do organismo contra essas EROS juntamente com a glutathiona. Este fato corrobora com outros dados obtidos pelo presente estudo, como por exemplo, a observação GSTM1 a qual está envolvida na cascata de reações da neutralização das EROS utilizando para isso a glutathiona.

- **Spot 5: Catalase**



**Figura 24:** Espectro obtido por PMF referente ao *spot* 5.

A proteína catalase (Cat) foi identificada no presente estudo como super expressa em ratos que sofreram lesão periférica (figura 24).

Sabe-se que essa enzima desempenha uma função importante desintoxicação e na defesa do organismo contra os danos causados pelas EROS (Gatecka *et al.*, 2008). O peróxido de hidrogênio é a molécula formada em maiores quantidades nas reações químicas oxidativas do organismo, e é justamente contra esta molécula que a catalase age, quebrando-a em água e oxigênio (Dringen *et al.*, 2005).

Sabe-se que o estresse oxidativo desempenha uma importante função na patogênese secundária de uma lesão nervosa, seja na medula espinhal ou uma lesão periférica (Lee *et al.*, 2004).

Singh e colaboradores (2009) analisaram a medula espinhal de ratos que sofreram lesão periférica e observaram o aumento de radicais livres, de metabólitos secundários e proteínas presentes em uma condição de estresse oxidativo, de apoptose e de degeneração celular.

Dados como os apresentados por Singh *et al.* (2009) corroboram com os encontrados por este estudo, pois ao lesionar periféricamente o nervo ciático pode-se sugerir que houve um aumento significativo tanto de EROS quanto de metabólitos lesivos secundários, o que culminou na super expressão de proteínas responsáveis pela desintoxicação celular, como a catalase que foi identificada por MS.

Desse modo, ratificam-se os dados da literatura que tratam sobre a importância dessa enzima na desintoxicação celular além de corroborar com o sugerido para as enzimas GSTM1 e G6PD, que em uma situação de estresse (lesão nervosa) o organismo apresenta super expressão de enzimas que combatam os metabólitos secundários formados pelas reações após esta lesão. Entre estas enzimas encontra-se a catalase, justificando assim a diferença observada entre as classes “lesado” e “controle”.

## 6. CONCLUSÕES

- A comparação entre os proteomas de medula espinhal de *Rattus norvegicus* que não sofreram lesão nervosa periférica e daqueles que sofreram, resultou na observação de sete *spots* diferencialmente expressos ao analisar a faixa de pH 4-7L e de seis *spots* diferencialmente expressos ao analisar a faixa de pH 3-10NL.
- Deste total, foram identificadas nove proteínas diferencialmente expressas, todavia não foi possível identificar três *spots* além de dois *spots* representarem isoformas diferentes da mesma proteína.
- Foram identificadas seis proteínas super expressas na classe “lesado” e três que estavam em maior quantidade na classe “controle”.
- Foi verificada diferença de expressão em *spots* pouco expressos (poucas cópias de proteínas) e em *spots* expressos razoavelmente. Já para *spots* muito expressos (proteínas muito abundantes), não foi verificada a diferença de expressão entre as classes, fato que denota a importância da completa observação das proteínas em cada situação.
- A maioria das proteínas identificadas como super expressas em ratos da classe “lesado” constituem proteínas responsáveis pela desintoxicação celular e resposta ao estresse oxidativo.
- A tubulina, uma proteína presente nos microtúbulos e no citoesqueleto, foi observada como super expressa na classe “lesado”, e pode ser uma das responsáveis pela reorganização do tecido nervoso.
- Interessante notar que proteínas como *Thioredoxin-like protein 1* e *Dihydropyrimidinase-related protein 3* que não foram consideradas diferencialmente expressas pelo Melanie, tem papel no metabolismo anti-oxidativo, como também demonstrado e discutido pelas proteínas consideradas diferencialmente expressas.

## **7. PERSPECTIVAS**

O estudo comparativo entre os proteomas de ratos que sofreram uma lesão periférica no nervo ciático com aqueles que não sofreram tal lesão apontou algumas diferenças marcantes na expressão proteica.

Tais diferenças podem ser estudadas futuramente como possíveis alvos para a elaboração de um tratamento mais eficiente para redução da degeneração nervosa visto que atualmente é uma condição que acomete inúmeras pessoas devido principalmente a acidentes automobilísticos e armas em geral.

Atualmente não há um tratamento definitivo, há registro de avanços no campo cirúrgico (Campbell 2008), porém com prognóstico de recuperação limitada. A união de estudos elucidando a cascata de reações envolvidas após uma axotomia até a super expressão de algumas proteínas nesta condição com a continuidade dos estudos e desenvolvimento das técnicas que envolvem procedimentos cirúrgicos, podem ajudar o desenvolvimento de tratamentos mais eficientes e uma melhor qualidade de vida pós lesão.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEBERSOLD, R., GOODLETT, D. Mass spectrometry in Proteomics. **Chem. Rev.** 2001, 101, 269-295.

AEBERSOLD R & MANN M. Mass Spectrometry-Based Proteomics. **Nature** Mar 13;422 (6928):198-207, 2003.

ALEXANDER-KAUFMAN K, DEDOVA I, HARPER C, MATSUMOTO I. Proteome analysis of the dorsolateral prefrontal region from healthy individuals. **Neurochem Int.** 2007 Nov-Dec;51(6-7):433-9.

AVOSSA D.; SIRI M. D. R. ; MAZZAROL F; BALLERINI L. Spinal circuits formation: a study of developmentally regulated markers in organotypic cultures of embryonic mouse spinal cord. **Neuroscience** 122 391–405, 2003.

BADOCK V, STEINHUSEN U, BOMMERT K, *et al.*. Prefractionation of protein samples for proteome analysis using reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Electrophoresis.** 2001 Aug;22(14):2856-64. Review.

BANKS G. B. & NOAKES P.G. Elucidating the molecular mechanisms that underlie the target control of motoneuron death. **Int. J. Dev. Biol.** 46: 551-58, 2002.

BECK M, KARCH C, WIESE S, SENDTNER M. Motoneuron cell death and neurotrophic factors: basic models for development of new therapeutic strategies in ALS. **Amyotroph Lateral Scler. Other Motor Neuron Disord., 2(Suppl.1):S55-68**, 2001.

BEN-ARI, Y. Developing networks play a similar melody. **Trends neurosci.** Vol. 24 n. 6, 2006.

BENNET MR, GIBSON WG, LEMON G. Neuronal cell death, nerve growth factor and neurotrophic models: 50 years on. **Auton Neurosci., 95(1-2):1-23**, 2002.

BERKELMAN, T AND STENSTEDT, T. 2-D electrophoresis – Principle and Methods, **Ge biosciences Hand book**, 1998.

BIENVENUT WV, DÉON C, PASQUARELLO C, CAMPBELL JM, SANCHEZ JC, VESTAL ML, HOCHSTRASSER DF. Matrix-assisted laser desorption/ionization-tandem mass spectrometry with high



resolution and sensitivity for identification and characterization of proteins. **Proteomics**. 2002 Jul;2(7):868-76.

BINZ P. A. ; MÜLLER M.; WALTHER D.; BIENVENUT W. V.; GRAS R.; HOOGLAND C.; BOUCHET G.; GASTEIGER E.; FABBRETTI R.; GAY S.; PALAGI P.; WILKINS M. R.; ROUGE V.; TONELLA L.; PAESANO S.; ROSSELLAT G.; KARMIME A.; BAIROCH A.; SANCHEZ J. C.; APPEL R. D.; HOCHSTRASSER D. F. A molecular scanner to automate proteomic research and to display proteome images. **Anal Chem.**;71(21):4981-8, 1999

BRADFORD MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**.1976 Mai 7;72:248-54.

BUSS R. R.; SUN W.; OPPENHEIM R. W. Adaptive roles of programmed cell death during nervous system development. **Annu. Rev. Neurosci.** v. 29, p. 1–35; 2006.

CAMORS, E.; MONCEAU, V.; CHARLEMAGNE, D. Annexins and Ca<sup>2+</sup> handling in the heart. **Cardiovascular Research** 65: 793– 802, 2005.

CAMPBELL, W. Evaluation and management of peripheral nerve injury. **Clinical Neurophysiology** v.119, p. 1951–1965; 2008.

CANDIANO, G.; BRUSCHI, M.; MUSANTE, L.; SANTUCCI, L.; GHIGGERI, G.M.; CARNEMOLLA B.; ORECCHIA P.; ZARDI L.; RIGHETTI P. G. Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. **Electrophoresis**, v. 25, p. 1327-1333, 2004.

CELLERINO, A.; MAFFEI, L. The action of neurotrophins in the development and plasticity of the visual cortex. **Prog. Neurobiol.** 49 1 , 53-71, 1996.

CHEN W., JI J., RU B.. Proteomic analysis of corticobasal degeneration: a case study of corticobasal degeneration at the proteome level. **J Neuropsychiatry Clin Neurosci.** Summer;17(3):364-71, 2005.

CHOI, J., LEVEY, A. I., WEINTRAUB, S. T., REES, H. D., GEARING, M., CHIN, L.-S. & LI, L. Oxidative modifications and down-regulation of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 associated with idiopathic Parkinson's and Alzheimer's diseases. **J. Biol. Chem.** 279:, 13256–13264, 2004.

CORTHALS G. L.; PATTERSON S. D.; AEBERSOLD R. Identification of Proteins by Mass Spectrometry, in **Proteome Research: 2D-PAGE and Detection Methodes**, Springer New York, pp. 197-231, 1999.

DECKWERTH TL, JOHNSON EM JR. Neurotrophic factor deprivation-induced death. **Ann N Y Acad Sci.**, **679**:121-31, 1993

DESHANE, J.; CHAVES, L.; SARIKONDA, K. V.; ISBELL, S.; WILSON, L.; KIRK, M.; GRUBBS, C.; BARNES, S.; MELETH, S.; KIM S. Proteomics Analysis of Rat Brain Protein Modulations by Grape Seed Extract. **J. Agric. Food Chem.** 52, 7872–7883, 2004.

DITZEN C, JASTORFF AM, KESSLER MS, BUNCK M, TEPLYTSKA L, ERHARDT A, KRÖMER SA, VARADARAJULU J, TARGOSZ BS, SAYAN-AYATA EF, HOLSBOER F, LANDGRAF R, TURCK CW. Protein biomarkers in a mouse model of extremes in trait anxiety. **Mol Cell Proteomics.** 2006 Oct;5(10):1914-20.

DITZEN C, VARADARAJULU J, CZIBERE L, GONIK M, TARGOSZ BS, HAMBSCH B, BETTECKEN T, KEßLER MS, FRANK E, BUNCK M, TEPLYTSKA L, ERHARDT A, HOLSBOER F, MÜLLER-MYHSOK B, LANDGRAF R, TURCK CW. Proteomic-based genotyping in a mouse model of trait anxiety exposes disease-relevant pathways. **Mol Psychiatry.** 2009 Jan 13. [Epub ahead of print].

DRINGEN R, PAWLOWSKI P.G, HIRRLINGER J. Peroxide detoxification by brain cells. **J Neurosci Res.** Jan 1-15;79(1-2):157-65, 2005.

ERAVCI M., FUXIUS S., BROEDEL O., WEIST S., KRAUSE E., STEPHANOWITZ H., SCHLUTER H., ERAVCI S., BAUMGARTNER A. The whereabouts of transmembrane proteins from rat brain synaptosomes during two-dimensional gel electrophoresis. **Proteomics.** May;8(9):1762-70, 2008.

EYRE J.A.; MILLER S.; CLOWRY G.J.; CONWAY E.A.; WATTS C. Functional corticoespinhal projections are established prenatally in the human foetus permitting involvement in the development of spinal motor centers. **Brain**, 123, 51-64, 2000.

FAZEKAS DE ST. GROTH S, WEBSTER RG, AND DATYNER A. Two new staining procedures for quantitative estimation of proteins on electrophoretic strips. **Biochim. Biophys. Acta** v. 71: 377–391, 1963.

FLOYD R.A. Neuroinflammatory processes are important in neurodegenerative diseases: an hypothesis to explain the increased formation of reactive oxygen and nitrogen species as major factors involved in neurodegenerative disease development. **Free Radic Biol Med.** May;26(9-10):1346-55, 1999.

FOURNIER A.E., MCKERRACHER L. Tubulin expression and axonal transport in injured and regenerating neurons in the adult mammalian central nervous system. **Biochem Cell Biol.** Sep-Oct;73(9-10):659-64, 1995.

FRIEDMAN B, KLEINFELD D, IP NY, VERGE VM, MOULTON R, BOLAND P, ZLOTCHENKO E, LINDSAY RM, LIU L. BDNF and NT-4/5 exert neurotrophic influences on injured adult spinal motor neurons. **J. Neurosci.**, **15(2)**:1044-56, 1995.

FU SY, GORDON T. The cellular and molecular basis of peripheral nerve regeneration. **Mol Neurobiol**, v. 14:67–116, 1997.

FUNAKOSHI H, FRISEN J, BARBANY G, TIMMUSK T, ZACHRISSON O, VERGE VM, PERSSON H. Differential expression of mRNAs for neurotrophins and their receptors after axotomy of the sciatic nerve. **J. Cell Biol.**, **123(2)**:455-65, 1993.

GAŁECKA E, JACEWICZ R, MROWICKA M, FLORKOWSKI A, GAŁECKI P. Antioxidative enzymes--structure, properties, functions. **Pol Merkur Lekarski.** 2008 Sep;25(147):266-8.

HAYES J.D. FLANAGAN J.U. JOWSEY I.R. Glutathione Transferases. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** 45:51–88, 2005.

GORDON N. Apoptosis (programmed cell death) and other reasons for elimination of neurons and axons. **Brain Dev.**, **17(1)**:73-7, 1995.

GREENSMITH L.; NG P.; MOHAGHEGH P.; VRBOVÁ G. Reducing transmitter release from nerve terminals influences motoneuron survival in developing rats. 357 **Neuroscience** Vol. 97, No. 2, pp. 357–362, 2000

GREENSMITH L, VRBOVA G. Motoneurone survival: a functional approach. **Trends Neurosci.**, **19(11)**:450-5, 1996.

GROSS, J. Mass Spectrometry – A Text Book. 1 ed. Heidelberg, Springer, 2004. 518p.

GYGI SP, CORTHALS GL, ZHANG Y, ROCHON Y, AEBERSOLD R. Evaluation of twodimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2000 Ago 15;97(17):9390-5.

HEGDE N.A. AND DIANTONIO, A. Ubiquitin and the synapse. **Nature Reviews Neuroscience** (3): 854-861 2002.

HENSCH T. K. Critical period plasticity in local cortical circuits. **Nature Reviews, Neuroscience**. v.6, p 877-888, 2005.

HENZEL WJ, BILLECI TM, STULTS JT, WONG SC, GRIMLEY C, WATANABE C. Identifying proteins from two-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence databases. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 1993 Jun 1;90(11):5011-5015.

HOFFMAN P.N., POLLOCK S.C., STRIPH G.G. Altered gene expression after optic nerve transection: reduced neurofilament expression as a general response to axonal injury. **Exp Neurol**. Jan;119(1):32-6, 1993.

HOFFMANN, E., STROOBANT, V. **Mass Spectrometry – Principles and Applications**. 3 ed. West Sussex, John Wiley & Sons, 2007. 489p.

HUSI H. & GRANT S.G.N.. Proteomics of the nervous system. **Trends in Neuroscience** Vol 24, no 5, p. 259 -266 , 2001.

James, P., Quadroni, M., Carafoli, E., Gonnet G. Protein identification by mass profile fingerprinting. **Biochem. Biophys. Res. Commun**. 1993, 195, 58-64.

JESSELL T.M. Neuronal specification in the spinal cord: inductive signals and transcriptional codes. **Nat Rev Genet** 1: 20–29, 2000.

JOHNSON EM Jr, DECKWERTH TL. Molecular mechanisms of developmental neuronal death. **Annu. Rev. Neurosci.**, 16:31-46, 1993.

JUNG E, HELLER M, SANCHEZ JC, *et al*. Proteomics meets cell biology: the establishment of subcellular proteomes. **Electrophoresis**. 2000 Oct;21(16):3369-77. Review.

KAETZEL, M.A. & DEDMAN, J.R. Annexin VI regulation of cardiac function. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 322: 1171–1177, 2004.

KANG, K.S.; SO, H.H.; MOON, Y.S.; KIM, C.H. Proteomic analysis of injured spinal cord tissue proteins using 2-DE and MALDI-TOF MS. **Proteomics** 6, 2797–281, 2006.

KARAS M, HILLENKAMP F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons". **Anal. Chem.** 1988, 60 (20): 2299-301.

KASHIHARA Y, KUNO M, MIYATA Y. Cell death of axotomized motoneurons in neonatal rats, and its prevention by peripheral reinnervation **J. Physiol.**, **386**:135-48, 1987.

KELLER-PECK, C. R.; FENG, G.; SANES, J. R.; YAN, Q.; LICHTMAN, J. W.; SNIDER, W. D. Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor Administration in Postnatal Life Results in Motor Unit Enlargement and Continuous Synaptic Remodeling at the Neuromuscular Junction. **The Journal of Neuroscience**. 21 (16):6136–6146, 2001.

KIM, S. I.; VOSHOL, H.; OOSTRUM, J. V.; HASTINGS, T. G.; CASCIO, M.; GLUCKSMAN, M. J. Neuroproteomics: Expression Profiling of the Brain's Proteomes in Health and Disease. **Neurochemical Research**, Vol. 29, No. 6, 1317–31, 2004.

KIM, Y.; KANG, K.; KIM, I.; LEE, Y. J.; OH, C.; RYOO, J.; JEONG, E.; AHN, K. Molecular Mechanisms of MHC Class I-Antigen Processing: Redox Considerations. **ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING**: 11(4):907-36. 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* 1975, 26, 231-243.

KLOSE J, NOCK C, HERRMANN M, *et al.* Genetic analysis of the mouse brain proteome. **Nat Genet.** 2002 Apr;30(4):385-93.

KORSCHING S. The neurotrophic factor concept: a reexamination. **J. Neurosci.**, **13(7)**:2739-2748, 1993.

KRONSBELN HC, JASTORFF AM, MACCARRONE G, STALLA G, WURST W, HOLSBOER F, TURCK CW, DEUSSING JM. CRHR1-dependent effects on protein expression and posttranslational modification in AtT-20 cells. **Mol Cell Endocrinol.** 2008 Sep 24;292(1-2):1-10.

KULBATSKI I., COOK D.J., TATOR C.H. Calcium entry through L-type calcium channels is essential for neurite regeneration in cultured sympathetic neurons. **J Neurotrauma** 21:357–374, 2004.

KUNO M., Target dependence of motoneuronal survival: the current status. **J. Neurosci. Res.**, **9**, 155-172, 1990.

LEE Y.S., RAM K., SINDHU R.K., LIN C.Y., ASHKAN EHDAIE A.,VAZIRI N.D. Effects Of Nerve Graft On Nitric Oxide Synthase, Nad(P)H Oxidase, And Antioxidant Enzymes In Chronic Spinal Cord Injury. **Free Radical Biology & Medicine**, Vol. 36, No. 3, Pp. 330 – 339, 2004.

LEVI-MONTALCINI R. The nerve growth factor 35 years later. **Science** 237:1154 –1162, 1987.

LEVI-MONTALCINI R. From Turin to Stockholm via St. Louis and Rio de Janeiro. **Science.**, **287(5454):**809, 2000.

LOCATE, S.; COLVER, J.; GAWLER, D.J.; WALKER, J.H. Annexin A6 at the cardiac myocyte sarcolemma e Evidence for self-association and binding to actin. **Cell Biology International**, 32:1388 - 1396, 2008.

LOMBARDINO A.J., LI X.C., HERTEL M., NOTTEBOHM F. Replaceable neurons and neurodegenerative disease share depressed UCHL1 levels. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 102(22):8036-41, 2005.

LÓPEZ, J. L. Two-dimensional electrophoresis in proteome expression analysis. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.**; 849(1-2):190-202, 2007

LOWRIE MB, LAVALETTE D, DAVIES CE. Time course of motoneurone death after neonatal sciatic nerve crush in the rat. **Dev. Neurosci.**, **16(5-6):**279-84, 1994.

LOWRIE MB, LAWSON SJ. Cell death of spinal interneurons. **Prog. Neurobiol.**, **61(6):**543-55, 2000.

LOWRIE MB, VRBOVA G. Dependence of postnatal motoneurons on their targets: review and hypothesis. **Trends Neurosci.**, **15 (03):** 80-84, 1992.

MACHADO A. B. M., **Neuroanatomia Funcional**. Cap. 4, 2ª Edição, 2000

MAMONE G., ADDEO F., CHIANESE L., DI LUCCIA A., DE MARTINO A., NAPPO A., FORMISANO A., DE VIVO P., FERRANTI P. Characterization of wheat gliadin proteins by combined two-dimensional gel electrophoresis and tandem mass spectrometry. **Proteomics**. 5(11):2859-65, 2005.

MAMYRIN, BA. Time-of-flight mass spectrometry (concepts, achievements, and prospects). **Int J Mass Spec**. 2001 206 (3):251-266.

MANN M. & PANDEY A. Use of mass spectrometry-derived data to annotate nucleotide and protein sequence databases. **Trends Biochem Sci**, 26(1):54-61, Jan 2001.

MARENCO, E.; ROBOTTI, E.; ANTONUCCI, F.; CECCONI, D.; CAMPOSTRINI, N.; RIGHETTI, P.R. Numerical approaches for quantitative analysis of two-dimensional maps: A review of commercial software and home-made systems. **Proteomics**, Feb;5(3):654-66, 2005.

MARNETT L.J., RIGGINS J.N., WEST J.D. Endogenous generation of reactive oxidants and electrophiles and their reactions with DNA and protein. **J. Clin. Invest**. 111:583–93, 2003.

Strange R.C. Spiteri M.A. Ramachandran S. Fryer A.A. Glutathione-S-transferase family of enzymes. **Mutation Research**. 482 (2001) 21–26, 2003.

MARTINS-DE-SOUZA, D. Determinação do perfil de expressão gênica e proteômica em tecido cerebral de pacientes esquizofrênicos. 2008. 236p. **Tese (Doutorado)** – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

MARTINS-DE-SOUZA D., MENEZES DE OLIVEIRA B., DOS SANTOS FARIAS A, HORIUCHI RS., CREPALDI DOMINGUES C., DE PAULA E., MARANGONI S., GATTAZ WF., DIAS-NETO E., CAMILLO NOVELLO J., The use of ASB-14 in combination with CHAPS is the Best for solubilization of human brain proteins for two-dimensional gel electrophoresis. **Brief. Funct. Genomic Proteomic**. 2007 Mar;6(1):70-5

MARTINS-DE-SOUZA D, GATTAZ WF, SCHMITT A, MACCARRONE G, HUNYADI-GULYÁS E, EBERLIN MN, SOUZA GH, MARANGONI S, NOVELLO JC, TURCK CW, DIAS-NETO E. Proteomic analysis of dorsolateral prefrontal cortex indicates the involvement of cytoskeleton, oligodendrocyte, energy metabolism and new potential markers in schizophrenia. **J Psychiatr Res**. 2008 Dec 23.

MARTINS-DE-SOUZA D, GATTAZ WF, SCHMITT A, NOVELLO JC, MARANGONI S, TURCK CW, DIAS-NETO E. Proteome analysis of schizophrenia patients Wernicke's area reveals an energy metabolism dysregulation. **BMC Psychiatry**. 2009 Apr 30;9(1):17.

MENEZES, B.O. Caracterização estrutural e funcional de proteínas através de espectrometria de massas MALDI-TOF. 2009. 108p. Tese (Doutorado) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

MEDZIHRADSKY KF, CAMPBELL JM, BALDWIN MA, FALICK AM, JUHASZ P, VESTAL ML, BURLINGAME AL. The characteristics of peptide collision-induced dissociation using a high-performance MALDI-TOF/TOF tandem mass spectrometer. **Anal Chem**. 2000 Feb 1;72(3):552-8.

MUKOYAMA M., YAMAZAKI K., KIKUCHI T., TOMITA T. Neuropathology of gracile axonal dystrophy (GAD) mouse. An animal model of central distal axonopathy in primary sensory neurons. **Acta Neuropathol**. 79(3):294-9, 1989.

NACIFF, J.M.; KAETZEL, M.A.; BEHBEHANI, M.M.; DEDMAN, J.R. Differential expression of annexins I-VI in the rat dorsal root ganglia and spinal cord. **The Journal of Comparative Neurology**. 6;368(3):356-70, 1996.

NEE, K. E. & LEE, J. C. Biophysical Characterization of Proteins in the Post-genomic Era of Proteomics. **Molecular & Cellular Proteomics** v.1, .6 415, 2002.

NEHRT, A.; RODGERS, R.; SHAPIRO, S.; BORGENS, R.; SHI, R. The Critical Role Of Voltage-Dependent Calcium Channel In Axonal Repair Following Mechanical Trauma. **Neuroscience**. 146:1504–1512, 2007.

NESVIZHSKII, A.I.; AEBERSOLD, R. Interpretation of shotgun proteomic data: the protein inference problem. **Mol Cell Proteomics**. Oct;4(10):1419-40, 2005

NEUHAUS O, ARCHELOS JJ, HARTUNG HP. Immunomodulation in multiple sclerosis: from immunosuppression to neuroprotection. **Trends Pharmacol. Sci.**, 24(3):131-8, 2003.

O'DONOVAN, M.J The origin of spontaneous activity in developing networks of the vertebrate nervous system. **Curr. Opin. Neurobiol**. 9, 94–104, 1999.

O'FARREL P. H. High resolution two dimensional electrophoresis of proteins. **The journal of Biological Chemistry**. v. 250, no 10, p. 4007 – 4021, 1975.

OHNO, T. & SAKURAI, M. Critical period for activity-dependent elimination of corticospinal synapses in vitro. **Neuroscience**, v.132, p. 917-922, 2005.



OAKLEY A.J. Glutathione transferases: new functions. **Current Opinion in Structural Biology**, 15:716–723, 2005.

OLD, W.M.; ARENDT, K.M.; WOLF L.A.; PIERCE K.G.; MENDOZA A.; SEVINSKY J.R.; RESING K.A.; AND AHN N.G. Comparison of label free methods for quantifying human proteins by shotgun proteomics. **MCP Papers in Press**. Published on June 23, Manuscript M500084-MCP200, 2005.

OLIVEIRA AL, RISLING M, DECKNER M, LINDHOLM T, LANGONE F, CULLHEIM S. Neonatal sciatic nerve transection induces TUNEL labeling of neurons in the rat spinal cord and DRG. **Neuroreport**, 8(13):2837-40, 1997.

OLIVEIRA AL, RISLING M, NEGRO A, LANGONE F, CULLHEIM S. Apoptosis of spinal interneurons induced by sciatic nerve axotomy in the neonatal rat is counteracted by nerve growth factor and ciliary neurotrophic factor. **J. Comp. Neurol.**, 447(4):381-93, 2002.

ONG, S. E.; PANDEY, A. An evaluation of the use of two-dimensional gel electrophoresis in proteomics. **Biomol Eng.** 18(5):195-205, 2001.

OPPENHEIM, R. W. Cell death during development of the nervous system. **Ann. Rev. Neurosci.**, 14, 453-501, 1991.

PASTORELLI, R.; CARPI, D.; CAMPAGNA, R.; AIROLDI, L. *et al.* Differential expression profiling of the hepatic proteome in a rat model of dioxin resistance. **MOLECULAR & CELLULAR PROTEOMICS**. 5(5): 882-94. 2006.

PANDEY A. & MANN M. Proteomics to study genes and genomes. **Nature**. Jun 15; 405 (6788):837-46, 2000.

PAPPIN D.J.; HOJRUP P.; BLEASBY A.J. Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. **Curr Biol**. Jun 1;3(6):327-32, 1993.

PETTMANN B, HENDERSON CE. Neuronal cell death. **Neuron**, 20(4):633-47, 1998.

PIZZORUSSO, T & MAFFEI, L. Plasticity in the developing visual system. **Curr. Opin. Neurol.** 9, 122-125, 1996.

POLAND J, RABILLOUD T, SINHA P. IN: WALKER, J.M. (Ed.), **The Proteomics Handbook**, Humana Press, Totowa 2005.

POMPELLA A, VISVIKIS A, PAOLICCHI A, DE TATA V, CASINI A.F. "The changing faces of glutathione, a cellular protagonist". **Biochem Pharmacol.** 66 (8): 1499–503, 2003.

PRADAT PF. Treatment of peripheral neuropathies with neurotrophic factors: animal models and clinical trials **Rev. Neurol.**, **159(2)**:147-61, 2003.

RABILLOUD, T. Silver staining of 2-D electrophoresis gels. **Methods Mol. Biol.** 1999, 112, 297-305.

RABILLOUD, T. Mechanisms of protein silver staining in polyacrylamide gels: a 10-year synthesis. **Electrophoresis** 1990, 11, 785-794.

REZENDE, A.C.S. Estudo comparativo da ação neurotrófica do CNTF e Tat-CNTF sobre motoneurônios de ratos neonatos após axotomia periférica. **Tese de Mestrado.** 2005.

RICHARDSON P.M., LU X. Inflammation and axonal regeneration. **J. Neurol.** (242):57–60, 1994.

ROBINSON LR. Traumatic injury to peripheral nerves. **Muscle Nerve**; 23:863–73, 2000.

ROBINSON LR. Traumatic injury to peripheral nerves. **Suppl Clin Neurophysiol**; 57:173–86, 2004.

SALEHI A, DELCROIX JD, MOBLEY WC. Traffic at the intersection of neurotrophic factor signaling and neurodegeneration. **Trends Neurosci.**, **26(2)**:73-80, 2003.

SALI A, GLAESER R, EARNEST T, BAUMEISTER W. From words to literature in structural proteomics. **Nature.** 2003 Mar 13;422(6928):216-25.

SANES & LICHTMAN. Development of the vertebrate neuromuscular junction. **Annu. Rev. Neurosci.** 1999. 22:389–442, 1999.

SCHMALBRUCH H. Motoneuron death after sciatic nerve section in newborn rats. **J Comp. Neurol.**, **224**:252-258, 1984.

SCHMALBRUCH H. The number of neurons in dorsal root ganglia L4-L6 of the rat. **Anat. Rec.**, **219(3)**:315-22, 1987a.

SCHMALBRUCH H. Loss of sensory neurons after sciatic nerve section in the rat. **Anat. Rec.**, **219(3)**:323-9, 1987b.

SCHMALBRUCH H. The effect of peripheral nerve injury on immature motor and sensory neurons and on muscle fibres. Possible relation to the histogenesis of Werdnig-Hoffmann disease. **Rev. Neurol.** 144(11):721-9, 1988.

SCHMALBRUCH H. Growth and denervation response of skeletal muscle fibers of newborn rats. **Muscle Nerve**, 13(5):421-32, 1990.

SENDTNER M., KREUTZBERG GW, THOENEN H. Ciliary neurotrophic factor prevents the degeneration of motor neurons after axotomy. **Nature**. 345:4401, 1990.

SENDTNER M, HOLTMANN B, KOLBECK R, THOENEN H, BARDE YA. Brain-derived neurotrophic factor prevents the death of motoneurons in newborn rats after nerve section. **Nature**. 360(6406):757-9, 1992a.

SENDTNER M, PEI G, BECK M, SCHWEIZER U, WIESE S. Developmental motoneuron cell death and neurotrophic factors. **Cell Tissue Res**. 301(1):71-84, 2000.

SENDTNER M, SCHMALBRUCH H, STOCKLI KA, CARROLL P, KREUTZBERG GW, THOENEN H. Ciliary neurotrophic factor prevents degeneration of motor neurons in mouse mutant progressive motor neuronopathy. **Nature**. 358(6386):502-4, 1992b.

SHARMA N., MARZO S.J., JONES K.J., FOECKING E.M. Electrical stimulation and testosterone differentially enhance expression of regeneration-associated genes. **Exp Neurol**. May 7, 2009.

SHEVECHENKO, A.; WILM, M.; VORM, O.; MANN, M. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. **Anal Chem**, 68: 850-58, 1996.

SHINITI, R. O. H. Análise Proteômica Da Região Lombar Da Medula Espinhal De Ratos Durante O Período Pós-Natal. **Dissertação de Mestrado**. Unicamp, 2008.

SINGH O.V., YASTER M., XU J.T., GUAN Y., GUAN X., *et al*. Proteome of synaptosome-associated proteins in spinal cord dorsal horn after peripheral nerve injury. **Proteomics**. (9), 1241–1253, 2009.

SITEK B, SCHEIBE B, JUNG K, SCHRAMM A, STUEHLER K. Difference Gel Electrophoresis (DIGE): the Next Generation of Two-Dimensional Gel Electrophoresis for Clinical Research. In: Marcus K,

Stuehler K, van Hall A, Hamacher M et al. (Eds.), **Proteomics in Drug Research**, Wiley-VCH, Weinheim 2006, pp. 33–55.

SIUZDAK G. The emergence of mass spectrometry in biochemical research. Proc. **Nati. Acad. Sci. USA** Vol. 91, pp. 11290-11297, November 1994.

TANAKA T, KURAMITSU Y, FUJIMOTO M, NAITO S, OKA M, NAKAMURA K. Downregulation of two isoforms of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1 correlates with high metastatic potentials of human SN12C renal cell carcinoma cell clones. **Electrophoresis**. 29(12):2651-9, 2008.

TANIUCHI M., CLARK H.B., JOHNSON JR E.M. Induction of nerve growth factor receptor in Schwann cells after axotomy. **Proc Natl Acad Sci USA**. 83:4094–8, 1986.

THIEDE B, HÖHENWARTER W, KRAH A, MATTOW J, SCHMID M, SCHMIDT F, JUNGBLUT PR. Peptide mass fingerprinting. **Methods**. 2005 Mar;35(3):237-47.

UETZ P, GIOT L, CAGNEY G, MANSFIELD TA, JUDSON RS, KNIGHT JR, LOCKSHON D, NARAYAN V, SRINIVASAN M, POCHART P, QURESHI-EMILI A, LI Y, GODWIN B, CONOVER D, KALBFLEISCH T, VIJAYADAMODAR G, YANG M, JOHNSTON M, FIELDS S, ROTHBERG JM. A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. **Nature**. 2000 Feb 10;403(6770):623-7.

WANG, W., XU, J.; KIRSCH, T. Annexin-mediated Ca<sup>2+</sup> Influx Regulates Growth Plate Chondrocyte Maturation and Apoptosis. **The Journal of Biological chemistry**. 279(6):3762-69, 2002.

WHITESIDE G, DOYLE CA, HUNT SP, MUNGLANI R. Differential time course of neuronal and glial apoptosis in neonatal rat dorsal root ganglia after sciatic nerve axotomy. **Eur. J. Neurosci.**, 10(11):3400-8, 1998.

WILKINS, M.R.; GASTEIGER, E.; GOOLEY, A.A.; HERBERT, B.R.; MOLLOY, M.P.; BINZ, P.A.; OU, K.; SANCHEZ, J.C.; BAIROCH, A.; WILLIAMS, K.L.; HOCHSTRASSER, D.F. High-throughput mass spectrometric discovery of protein post-translational modifications. **J Mol Biol**. Jun 11;289(3):645-57, 1999.

WILKINS MR, PASQUALI C, APPEL RD, OU K, GOLAZ O, SANCHEZ JC, YAN JX, GOOLEY AA, HUGHES G, HUMPHERY-SMITH I, WILLIAMS KL, HOCHSTRASSER DF. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and aminoacid analysis. **Biotechnology (NY)**. 1996 Jan;14(1):61-5.

WILKINS MR, SANCHEZ JC, GOOLEY AA, APPEL RD, HUMPHERY-SMITH I, HOCHSTRASSER DF, WILLIAMS KL. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. **Biotechnol Genet Eng Rev.** 1995;13:19-50.

WILKINS, M. R.; WILLIAMS, K. L.; APPEL, R. D.; HOSCHSTRASSE, D. F. **Proteome Research: New frontiers in Functional Genomics – Principles and Practice.** Berlin: Springer Verlag, p. 243, 1997.

WILKINSON B. & GILBERT H.F. Protein disulfide isomerase. **Biochimica et Biophysica acta.** 1699: 35-44, 2004.

WYSOCKI V. H.; RESINGB K. A.; ZHANGA Q.; CHENGA G. Mass spectrometry of peptides and proteins. **Methods.**;35(3):211-22, Mar 2005.

YAN Q, ELLIOTT J, SNIDER WD. Brain-derived neurotrophic factor rescues spinal motor neurons from axotomy-induced cell death. **Nature**, **360(6406)**:753-5, 1992.

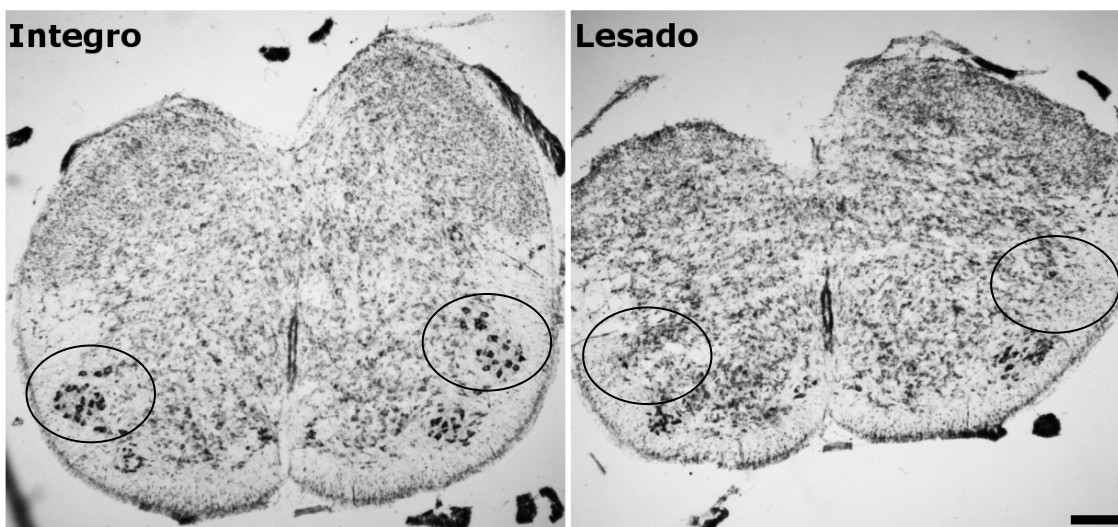
ZOCHODNE DW, LEVY D. Nitric oxide in damage, disease and repair of the peripheral nervous system. **Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)** 2005;51:255–67.

ZHU, H.; BILGIN M.; SNYDER M., **Annu. Rev. Biochem.** 72: 783-812, 2003.

## **Apêndice:**

Ensaio histológico comparativo entre a medula de *Rattus norvegicus* íntegro com o axotomizado periféricamente da mesma idade

**Anexo 1.** Corte coronal da medula de rato Wistar, corado com Cresil Violeta, obtido 5 dias após axotomia realizada na idade P2. Como controle foi utilizado um animal íntegro de mesma idade. Notar redução no número de motoneurônios na região indicada na imagem. Barra = 200  $\mu\text{m}$ .



Observa-se, neste ensaio, a redução de motoneurônios na medula espinhal de ratos Wistar que foram lesados periféricamente no período pós-natal. Acredita-se que a causa dessa morte é a necessidade dessas células imaturas do neonato em receber estímulos neurotróficos enviados da região inervada para que ocorra formação completa dos motoneurônios (Kashihara *et al.*, 1987; Kuno, 1990; Sendtner *et al.*, 1990; Lowrie e Vrbová, 1992; Sendtner *et al.*, 1992a,b; Yan *et al.*, 1993; Funakoshi *et al.*, 1993; Friedman *et al.*, 1995; Greensmith e Vrbová, 1996; Lowrie e Lawson, 2000; Oliveira *et al.*, 2002; Rezende, 2005). Dessa forma, ao realizar a axotomia bilateral, os músculos foram completamente isolados das células nervosas e acarretou em uma degeneração das células dos motoneurônios, como se pode observar no Anexo 1.

**Anexo 2:** Declaração da autorização concedida pela Comissão de ética em experimentação animal/IB/UNICAMP.

**DECLARAÇÃO**

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação/tese de Mestrado intitulada **Proteoma Comparativo da Medula Espinhal lombar de ratos submetidos à lesão nervosa periférica durante o período pós-natal:**


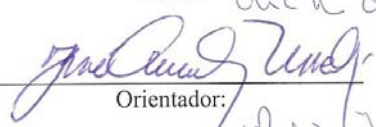
( ) não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

( ) está inserido no **Projeto CIBio/IB/UNICAMP** (Protocolo nº \_\_\_\_\_), intitulado \_\_\_\_\_;

( x ) tem autorização da **Comissão de Ética em Experimentação Animal/IB/UNICAMP** (Protocolo nº: 1853-1;


( ) tem autorização do **Comitê de Ética para Pesquisa com Seres Humanos/FCM/UNICAMP** (Protocolo nº \_\_\_\_\_);

( ) tem autorização de comissão de bioética ou biossegurança externa à UNICAMP.  
Especificar: \_\_\_\_\_

  
\_\_\_\_\_  
Aluno: Eriche de Castro Dias  
  
\_\_\_\_\_  
Orientador: Prof. Dr. José Amílto Taveira

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido ( ) Indeferido

  
\_\_\_\_\_  
Nome:  
Função: Profa. Dra. ANAMARIA A. GUARALDO  
Presidente  
Comissão de Ética na Experimentação Animal  
CEEA/IB - UNICAMP