

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

HUGO TAKEDA CAETANO



**Proteoma comparativo de mitocôndria: uma
análise de camundongo transgênico
hipertrigliceridêmico versus camundongo
normo trigliceridêmico**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
HUGO TAKEDA CAETANO
[Handwritten Signature]
e 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**

C116p

Caetano, Hugo Takeda

Proteoma comparativo de mitocôndria: uma análise de camundongo transgênico hipertriglicerodêmico *versus* camundongo normo trigliceridêmico / Hugo Takeda Caetano. – Campinas, SP: [s.n.], 2009.

Orientador: José Camillo Novello.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Proteômica. 2. Proteínas - Análise. 3. Mitocôndria. 4. Hipertrigliceridemia. 5. Espectrometria de massa. I. Novello, José Camillo. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Título em inglês: Comparative mitochondrial proteome: an analysis of transgenic hipertriglyceridemic mouse in contrast with normal triglyceridemic mouse.

Palavras-chave em inglês: Proteomics; Proteins – Analysis; Mitochondria; Hipertriglyceridemia; Mass spectrometry.

Área de concentração: Bioquímica.

Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular.

Banca examinadora: José Camillo Novello, Claudio Chrysostomo Werneck; Carlos Alberto Labate.

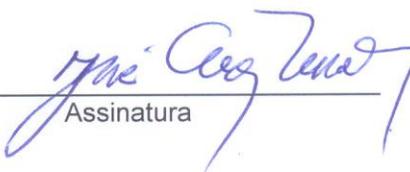
Data da defesa: 27/02/2009.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular.

Campinas, 27 de fevereiro de 2009

BANCA EXAMINADORA

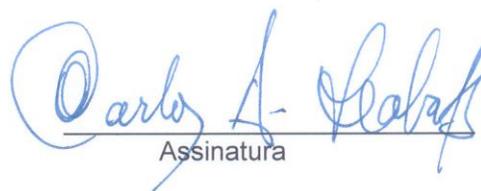
Prof. Dr. José Camillo Novello (Orientador)


Assinatura

Prof. Dr. Claudio Chrysostomo Werneck


Assinatura

Prof. Dr. Carlos Alberto Labate


Assinatura

Prof. Dr. Sérgio Marangoni

Assinatura

Prof. Dr. Marcos Nogueira Eberlin

Assinatura

*Let us fight for a world of reason,
a world where science and progress will lead to all men's happiness.*

Charles Chaplin (The Great Dictator)

Dedico esta dissertação aos meus pais,
pelo incentivo, compreensão e carinho
em todos os momentos.

Agradeço,

Ao Prof. Dr. José Camillo Novello, pela confiança, orientação e pela oportunidade de conhecer e desenvolver o trabalho acadêmico, desde a iniciação científica até hoje.

À Prof. Dra. Helena Coutinho Franco de Oliveira, ao Prof. Dr. Anibal Eugenio Vercesi e à Dra. Luciane Carla Alberici, pela colaboração e confiança ao me fornecer as amostras necessárias ao projeto.

À Prof. Dra. Fernanda Ramos Gadelha e ao Kiko, pela colaboração, sugestões e auxílio fundamental nos isolamentos das mitocôndrias.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Labate e ao Dr. Alexander de Andrade, pelo apoio e por ter permitido usar o seu laboratório para as análises das proteínas pelo Q-ToF.

Ao Prof. Dr. Claudio Chrysostomo Werneck pela amizade e ajuda durante a reta final, da qualificação à defesa.

Ao Prof. Dr. Sergio Marangoni e ao Paulinho Baldasso, pela ajuda na época de LAQUIP.

À Mestre Flavia V. Winck, minha “mentora” desde a iniciação científica, mais do que simplesmente pela orientação, paciência e ensinamentos, mas pelo exemplo ao qual procurarei sempre me espelhar como pesquisador e ser humano, além da grande amizade.

Aos grandes amigos e companheiros de trabalho no laboratório: Java, Bruno, Shin, Erich e Karina, dos mais experientes aos mais novos, aprendendo e ensinando, todos vocês igualmente tornaram mais prazeroso e divertido o trabalho em equipe.

Às ex-estagiárias técnicas Natália e Dayane, pelas alíquotas, soluções e momentos de descontração proporcionados.

À minha querida irmã Cinthia, pelo carinho e amor incondicional, pelos bons momentos de nossas vidas e pela ajuda com seu inglês infalível quando mais precisei.

À Diana, parceira de Libertadores, Brasileirões, 2.10 e cinemas, e futura comentarista de futebol da minha mesa redonda.

Aos grandes e verdadeiros amigos Dudu, Bozó e Daniel, onças que, apesar da distância, desde a graduação foram companheiros de tantas caminhadas e enormes enrascadas. Com o tempo a gente melhora...

Aos grandes amigos P.A., Filipe, Roberton, Theo, Maurício, Mineiro, Renata, Manuel, Fião, Roberto, Rose, Toby e Mel, comparsas responsáveis por elevar o nome República Milhouse ao status de mito.

Às secretárias do departamento Marina e Andréia, pela simpatia e ajuda nos serviços burocráticos.

A todos aqueles amigos, colegas e colaboradores que de alguma maneira participaram deste trabalho.

À FAPESP pelo apoio financeiro.

Muito obrigado!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	IX
LISTA DE TABELAS	X
RESUMO.....	XI
ABSTRACT.....	XII
1. INTRODUÇÃO	13
2. REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1 – HIPERTRIGLICERIDEMIA E O METABOLISMO DE LIPÍDIOS	15
2.2 - CAMUNDONGOS TRANSGÊNICOS	19
2.3 - MITOCÔNDRIA.....	20
2.4 - PROTEÔMICA.....	22
2.5 - ELETROFORESE DE DUAS DIMENSÕES EM GEL DE POLIACRILAMIDA	24
2.6 - ANÁLISE COMPARATIVA DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS.....	28
2.7 - IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	29
2.7.1 - MALDI-ToF (“Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight”).....	32
2.7.2 - Q-ToF (“Quadrupole – Time of Flight”).....	34
3 – OBJETIVOS.....	37
4 – JUSTIFICATIVA	38
5 - MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
5.1 - PREPARAÇÃO DA AMOSTRA	40
5.1.1 - Animais.....	40
5.1.2 - Isolamento das mitocôndrias.....	40
5.1.3 - Dosagem de proteínas	41
5.2 - ELETROFORESE DE DUAS DIMENSÕES (2D)	42
5.2.1 - Isoeletrofocalização (IEF).....	42
5.2.2 - Incubação das “strips”.....	42
5.2.3 - SDS PAGE – 2ª Dimensão	43
5.2.4 - Detecção das proteínas em gel de poliacrilamida.....	44
5.3 - ANÁLISE DE IMAGEM 2D.....	44
5.3.1 - Determinação do pI e da massa molecular.....	45
5.4 – IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS	46
6 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
6.1 – PREPARAÇÃO DA AMOSTRA E ELETROFORESE BIDIMENSIONAL (2D)	48
6.2 – ANÁLISE COMPUTACIONAL DE IMAGENS 2D.....	56
6.3 – IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS	62
7 – CONCLUSÕES.....	76
8 – PERSPECTIVAS.....	77
9 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
ENDEREÇOS ELETRÔNICOS CONSULTADOS:	87
ANEXO:	88

LISTA DE FIGURAS

	PÁG.
Figura 1	Vias de transporte de lipídios no plasma..... 18
Figura 2	Perfil bidimensional de um gel da 2DE..... 26
Figura 3	Espectro de massas dos peptídeos trípticos..... 30
Figura 4	Ampliação de uma das regiões do espectro da figura 3..... 31
Figura 5	Esquema da identificação de proteína por espectrometria de massas..... 32
Figura 6	Ionização realizada por MALDI..... 33
Figura 7	Ionização realizada por ESI..... 35
Figura 8	Estratégia metodológica..... 39
Figura 9	Comparação de dois perfis bidimensionais de animais controle feitos antes e depois do estabelecimento do protocolo padrão da isoeletrofocalização..... 50
Figura 10	Comparação de dois perfis bidimensionais de animais transgênicos em géis de poliacrilamida de concentração 12.5% e 11.5%..... 51
Figura 11	Comparação da sensibilidade dos métodos de coloração testados..... 53
Figura 12	Géis 2D reprodutíveis e representativos de amostra de proteínas de mitocôndria de três diferentes extrações..... 55
Figura 13	Comparação dos géis 2D através da sobreposição das imagens com detecção dos <i>spots</i> pelo software Image Master 2D elite v.3.1..... 58
Figura 14	Gel bidimensional da amostra de mitocôndria controle contendo os <i>spots</i> diferencialmente expressos indicados e numerados..... 59
Figura 15	Gel bidimensional da amostra de mitocôndria transgênica contendo os <i>spots</i> diferencialmente expressos indicados e numerados..... 60
Figura 16	Histogramas representativos de 5 dos 7 <i>spots</i> estatisticamente relevantes..... 61
Figura 17	Comparação dos espectros obtidos do mesmo <i>spot</i> submetido a dois tipos diferentes de preparação..... 64

Figura 18	Ciclo da uréia.....	68
Figura 19	Estrutura da carbamoil fosfato sintetase.....	69
Figura 20	Perfil bidimensional de amostra de animal transgênico, com as setas apontando os <i>spots</i> 33 e 40, ambos identificados como CPS, mas com mW bem distintas da proteína original.....	72

LISTA DE TABELAS

		PÁG.
Tabela 1	Proteínas identificadas por MALDI-ToF.....	66
Tabela 2	Proteínas super expressas em géis de animais controle identificadas por Q-ToF.....	67

RESUMO

A proteômica tem-se tornado ao longo dos últimos anos uma área de estudo cada vez mais essencial para o melhor entendimento dos mecanismos efetores e regulatórios das células e suas interações em sistemas biológicos.

Patologias de origem genética como a hipertrigliceridemia, que geralmente modificam o perfil lipídico com o aumento dos níveis de triglicérides e colesterol, estão fortemente relacionadas com diversas doenças cardiovasculares. Estudos com animais e humanos têm sido realizados em busca do entendimento dos mecanismos celulares e moleculares implicados nestas patologias para potenciais intervenções terapêuticas e preventivas.

Estudos em camundongos geneticamente hipertrigliceridêmicos para super expressarem a apolipoproteína C-III humana demonstraram que elevadas concentrações plasmáticas de triglicérides e ácidos graxos livres constituem uma condição metabólica que altera a funcionalidade mitocondrial. Essas mudanças no controle respiratório das mitocôndrias transgênicas representam uma adaptação atribuída a diferenças estruturais ou funcionais das membranas internas da mitocôndria transgênica. Assim, foi feito o estudo comparativo do proteoma de mitocôndria obtido destes animais transgênicos hipertrigliceridêmicos com o proteoma de camundongos controles não transgênicos. Para tanto, após o isolamento das mitocôndrias normais e transgênicas, foram utilizadas técnicas de eletroforese bidimensional (2DE) e espectrometria de massas do tipo MALDI-ToF e Q-ToF para a identificação das proteínas diferencialmente expressas. Dentre elas foram identificadas as proteínas Hidroximetilglutaril-CoA sintase, Carbamoil-fosfato sintetase e Flavoproteína transferidora de elétrons. Estas e outras proteínas podem representar interessantes alvos moleculares para o estudo da funcionalidade mitocondrial, visando futuras aplicações clínicas para o tratamento de determinadas condições patológicas como a hipertrigliceridemia.

ABSTRACT

Along the last years, Proteomics has become an area of study each more essential to the better understanding of the effective and regulatory mechanisms of the cells and their interactions inside biological systems.

Pathologies of genetic origin like the hypertriglyceridemia, that usually modify the lipid profile with the increase in the triglycerides and cholesterol levels, are strongly related to various cardiovascular diseases. Studies with animals and humans have been made in search of the understanding of cell and molecular mechanisms implied in these pathologies for potential therapeutic and preventive interventions.

Studies in genetically hypertriglyceridemic mice to overexpressing the human apolipoprotein C-III showed that high plasmatic concentrations of triglycerides and free fatty acids constitute a metabolic condition that changes the mitochondrial functionality. These changes in the breathing control of the transgenic mitochondria represent an adaptation attributed to structural or functional differences on the inner membrane of transgenic mitochondria. This way, we made the comparative study of the mitochondrial proteome obtained from these hypertriglyceridemic transgenic animals with the proteome from non-transgenic control mice. For such, after the isolation of the normal and transgenic mitochondria, we used two-dimensional gel electrophoresis (2DE) and MALDI-ToF and Q-ToF mass spectrometry techniques to identify the differentially expressed proteins. Among them we identified the proteins Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, Carbamoyl-phosphate synthase and Electron transfer flavoprotein. These and other proteins can represent interesting molecular targets for the study of the mitochondrial functionality, aiming future clinical applications for the treatment of certain pathological conditions like hypertriglyceridemia.

1. INTRODUÇÃO

Doenças cardiovasculares como aterosclerose, infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral (AVC) e doença vascular periférica são responsáveis por uma em cada três mortes no mundo, segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2003). Nos Estados Unidos o número de mortes anual ultrapassa a 2,3 milhões e no Brasil mais de 800 mil. Algumas patologias de origem genética como diabetes, obesidade, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, ou ambientais como estresse, fumo e sedentarismo, são fatores de risco para estas doenças. Estas patologias muitas vezes se inter-relacionam e geralmente modificam o perfil lipídico, aumentando os níveis de triglicérides, colesterol, LDL (lipoproteína de baixa densidade) e diminuindo os níveis de HDL (lipoproteína de alta densidade). Estudos com animais e humanos têm sido realizados em busca do entendimento dos mecanismos celulares e moleculares implicados nestas patologias para potenciais intervenções terapêuticas e preventivas.

Pesquisas em camundongos geneticamente hipertrigliceridêmicos para super expressarem a apolipoproteína C-III (apoC-III) humana demonstraram que o baixo valor do controle respiratório mitocondrial (CR, razão entre as velocidades de respiração mitocondrial nos estados III e IV) no camundongo transgênico é resultado de uma elevada velocidade de respiração de repouso (estado IV) de suas mitocôndrias. Camundongos geneticamente modificados para super expressarem a apolipoproteína C-III humana apresentam, assim, uma elevada respiração de repouso (estado IV) mitocondrial. Essa alteração na funcionalidade mitocondrial está possivelmente associada às elevadas concentrações plasmáticas de triglicérides e ácidos graxos. Por se tratar de um mecanismo adaptativo de dissipação de energia independente de proteínas desacopladoras (UCPs) (ALBERICI et al, 2003), essa alteração pode estar relacionada a uma possível expressão diferencial de proteínas mitocondriais presentes nessas organelas de camundongos transgênicos.

Considerando que a análise proteômica de um organismo permite a obtenção de uma descrição detalhada dos produtos protéicos codificados pelo seu genoma, o estudo comparativo do proteoma de camundongos controle não-transgênicos com o proteoma de camundongos transgênicos para apoC-III revela-se uma interessante forma de detecção de possíveis proteínas diferencialmente expressas. Este trabalho pode auxiliar na identificação de novos alvos moleculares envolvidos com a regulação da respiração mitocondrial em diversos estados associados à hipertrigliceridemia, como obesidade, diabetes, aterosclerose, dentre outros.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 – Hipertrigliceridemia e o metabolismo de lipídios

Diversos estudos epidemiológicos têm demonstrado que as concentrações de triglicérides e lipoproteínas ricas em triglicérides estão positivamente associadas à maior incidência de aterotrombose, representando um fator de risco independente para doenças coronarianas (MALLOY, 2001). As conseqüências patológicas da hipertrigliceridemia (HTG) incluem acentuada captação de lipoproteínas ricas em triglicérides e seus remanescentes por macrófagos, síntese aumentada de fatores pró-trombóticos, e predominância de partículas de LDL pró aterogênicas (MILLER, 2000).

A hipertrigliceridemia pode ser primária (origem genética), ou secundária a fatores ambientais ou outras patologias. As HTG de origens primárias podem ser ocasionadas por deficiência de lipoproteína lípase, por elevada síntese ou reduzido catabolismo de VLDL (lipoproteína de densidade muito baixa), resultando em acúmulo plasmático de colesterol e triglicérides. As HTG secundárias podem decorrer de fatores ambientais como álcool, dieta desequilibrada, beta-bloqueadores, seqüestradores de ácido biliar, estrógenos orais, retinóides e esteróides (MILLER, 2000), podendo modificar o sistema de síntese e transporte de lipídios, principalmente os triglicérides (TG). As HTG associadas a patologias como diabetes (GINSBERG, 2001) e síndrome metabólica X (REAVEN, 1994a), podem resultar no primeiro caso em aumento de TG e redução de HDL (lipoproteína de alta densidade)-colesterol (REAVEN, 1994a e HANSEN, 1999), e no segundo em elevados níveis plasmáticos de TG e ácidos graxos livres, podendo, portanto levar ao aumento da trigliceridemia.

O metabolismo de lipídios é controlado por um complexo sistema que envolve a interação de diversos transportadores de lipídios, proteínas de transferência plasmáticas, receptores de lipoproteínas e enzimas regulatórias de síntese e modificação de lipoproteínas.

Lipoproteínas (LP) são complexos macromoleculares que consistem em lipídios hidrofóbicos (triglicérides e ésteres de colesterol) envolvidos por uma camada de lipídios anfipáticos (fosfolipídios e colesterol livre) e de proteínas específicas, denominadas apolipoproteínas (apoLP). As LP têm função de transportar seus componentes hidrofóbicos provenientes da dieta (via exógena) ou sintetizados endogenamente (via endógena) para os tecidos através da corrente sangüínea.

O transporte de lipídios de origem alimentar (via exógena) está esquematizado na Figura 1A. Colesterol (COL) e triglicérides (TG), derivados da absorção intestinal, são complexados às apoLP no enterócito e secretados na linfa mesentérica na forma de quilomícrons (QM). Pelo ducto linfático torácico eles entram na circulação sanguínea e incorporam as apoC-II, apoC-III e apoE, vindas de transferência de outras LP circulantes. No plasma, as lipoproteínas sofrem ação da lipoproteína lípase periférica (LPL), liberando ácidos graxos livres (AGL). A LPL é uma enzima ativada pela apoC-II e hidrolisa os TG em ácidos graxos e glicerol. Os ácidos graxos liberados podem ser re-esterificados e armazenados nos adipócitos ou oxidados nos músculos e outros tecidos (GOLDBERG et al, 2001). Os AGL ligados à albumina plasmática são também captados pelo fígado e outros tecidos. Os remanescentes de QM (QM-rem) possuem grande quantidade de ésteres de colesterol (CE), pois também os recebe das HDL através ação da proteína de transferência de ésteres de colesterol (CETP). Esse rearranjo favorece a incorporação de apoE nos QM e, ao mesmo tempo, a saída de fosfolipídios (PL), colesterol livre (CL) e apoLP dos grupos C e A, que podem retornar às HDL. Os QM-rem têm meia vida curta (minutos), sendo rapidamente conduzidos ao hepatócito, onde são removidos por vias que incluem o receptor de partículas remanescentes (*LRP:LDL receptor related protein* ou receptor E). O colesterol liberado na célula hepática pode ser convertido em ácidos biliares ou ser secretado na bile sem sofrer alterações e pode ainda ser novamente secretado para a circulação sanguínea na forma de VLDL.

Pela via endógena de transporte de lipídios no fígado, AG provenientes da circulação são oxidados ou esterificados a TG e CE, os quais são secretados associados com apoB-100, apoC-II, apoC-III e apoE formando as VLDL (Figura 1B). No plasma, esta lipoproteína sofre ação da LPL, como na via exógena, liberando AGL para os tecidos extra-hepáticos. Os AG captados podem ser re-esterificados e armazenados nos adipócitos ou oxidados nos músculos e outros tecidos. Os remanescentes de VLDL, chamados IDL, têm meia vida curta (minutos a algumas horas) e são parcialmente removidos pelos hepatócitos através de dois receptores, o LRP e o receptor de LDL, também chamado de receptor B/E, que interagem com resíduos de arginina da apoB-100 e da apoE. As IDL não removidas sofrem a ação da lipoproteína lípase hepática (LLH) e perdem mais TG e PL, e são então denominadas LDL, ricas em CE. Estas constituem uma fonte de colesterol para síntese de hormônios esteróides nas gônadas e adrenal, membranas plasmáticas em tecidos em proliferação e ácidos biliares no fígado. As células que necessitam de colesterol expressam grandes quantidades de receptores de LDL e assim captam-na por endocitose.

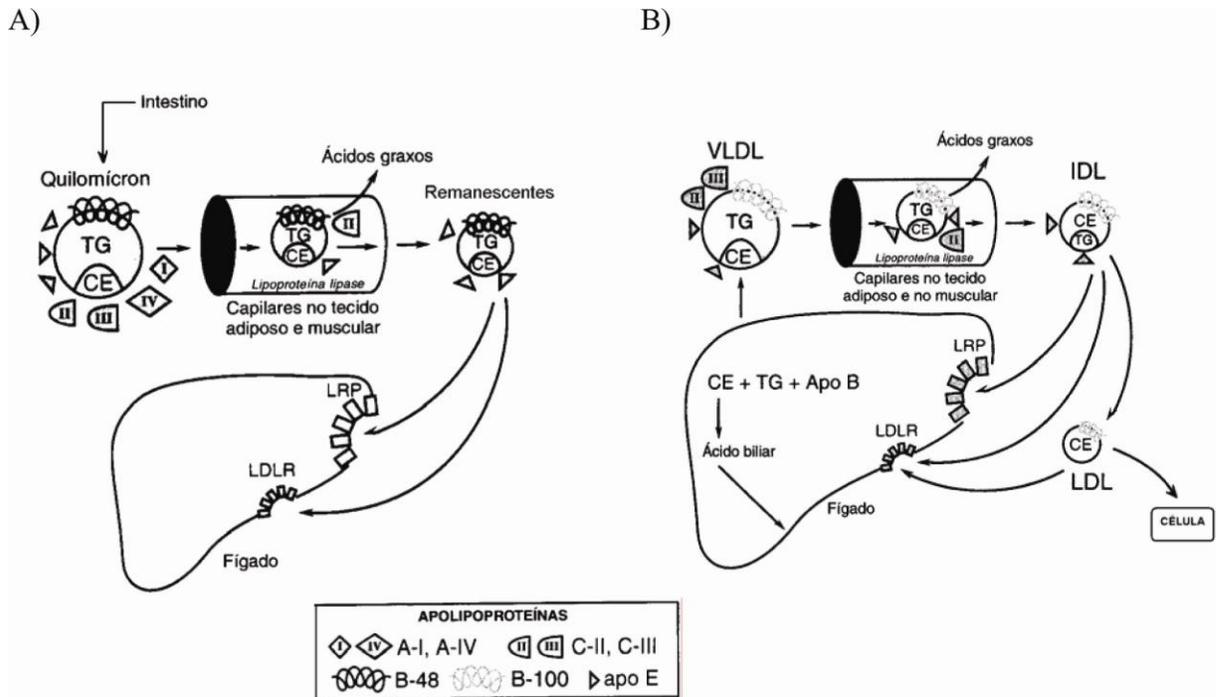


Figura 1. Vias de transporte de lipídios no plasma. A) Via exógena; B) Via endógena; TG, triglicerídeo; CE, colesterol éster; apolipoproteínas A-I, A-IV, C-II, C-III, E, B-100, B-48; LDL, lipoproteínas de baixa densidade; LDLR, receptor de LDL; LRP, proteína relacionada ao receptor de LDL; VLDL, lipoproteína de densidade muito baixa; IDL, lipoproteínas de densidade intermediária. (Adaptado de WITZTUM, 1996)

Fibratos e ácidos graxos de cadeia longa são ligantes de receptores ativados por proliferadores de peroxissomos (subtipo α), que atuam no DNA, ativando ou reprimindo a expressão de diversos genes, incluindo proteínas ligantes de ácidos graxos e enzimas oxidativas de mitocôndrias e peroxissomos. Estas drogas são utilizadas para o tratamento da hipertrigliceridemia por reduzirem a síntese de TG e aumentarem a oxidação dos AGL (STAELS et al, 1998).

Os ácidos graxos livres têm a habilidade de desacoplar a fosforilação oxidativa da respiração mitocondrial, atuando direta ou indiretamente e também de induzir a transição de permeabilidade mitocondrial (TPM). Um leve desacoplamento da fosforilação oxidativa pode representar um mecanismo de dissipar energia e/ou proteção contra estresses oxidativos.

Por outro lado, a TPM causada pela abertura de poros na membrana interna da mitocôndria, além de dissipar o gradiente eletroquímico de prótons prevenindo a produção de ATP pela fosforilação oxidativa, libera moléculas apoptogênicas e dependendo do número de mitocôndrias afetadas pode levar a célula à morte por necrose ou apoptose (KOWALTOWSKI et al, 1996).

2.2 - Camundongos transgênicos

A apolipoproteína C-III é a mais abundante apoC no plasma humano, onde está presente como uma glicoproteína de 8.8 kDa (JONG et al, 2000). Camundongos geneticamente modificados para super expressar a apoC-III humana são um bom modelo para o estudo das conseqüências da hipertrigliceridemia, sem outros fatores metabólicos relacionados, que poderiam confundir as análises.

A apoC-III é produzida em pequenas quantidades pelo fígado e intestino, secretada como constituinte das VLDL e QM (GARCIA e OLIVEIRA, 1992). A presença de mais apoC-III nas VLDL reduz a velocidade de remoção dessas lipoproteínas e seus remanescentes do compartimento plasmático por dificultar ou inibir sua interação com receptores específicos, principalmente o LRP (proteína relacionada com o receptor de lipoproteína) (AALTO-SETALA et al, 1992).

Desse modo, a meia-vida estendida dessas lipoproteínas no compartimento plasmático resulta principalmente em elevados níveis de TG, o que implica em aumento da geração de AGL pela ação da LPL (AALTO SETALA et al, 1996; ITO et al, 1990).

Por outro lado, a deficiência de apoC-III em camundongos agrava a obesidade induzida por dieta, provavelmente através de aumento da lipólise de lipoproteínas ricas em TG, aumentando a captação de ácidos graxos no tecido adiposo (DUIVENVOORDEN et al, 2005).

Em condições padrões de manutenção da colônia, os camundongos transgênicos para apoC-III não diferem dos camundongos controle com respeito a ciclo de vida, peso, curva de crescimento, função reprodutiva e comportamento. Porém, quando submetidos a dietas ricas em colesterol e ácidos graxos, os camundongos transgênicos para apoC-III desenvolvem uma aterosclerose mais severa do que os camundongos controle (HAYEK et al, 1995). A homeostase glicêmica dos animais controle e transgênicos quando submetidos à dieta balanceada não se apresenta diferente.

Em camundongos transgênicos tratados com ciprofibrato ocorre uma diminuição significativa no estado IV de respiração, e um aumento no controle respiratório mitocondrial do animal transgênico a níveis próximos aos encontrados nos animais controle. O alto escape de prótons observado no estado IV da respiração mitocondrial transgênica desaparece sob condições de fosforilação (ALBERICI et al, 2003).

2.3 - Mitocôndria

As mitocôndrias estão presentes em quase todas as células eucarióticas vegetais e animais. São as organelas responsáveis pela conversão de energia de óxido-redução para a forma de energia química necessária para os processos celulares. Este processo de conversão de energia de óxido redução em energia química, na forma de ATP, é denominado de fosforilação oxidativa e envolve uma série de complexos transportadores de elétrons e a enzima ATP sintetase localizada na membrana mitocondrial interna.

Mitocôndrias de fígado de camundongos geneticamente obesos apresentam maior conteúdo de proteína desacopladora 2 (UCP2) (CHAVIN et al., 1999), uma proteína da membrana mitocondrial interna ativada por ácidos graxos livres que dissipa o potencial eletroquímico de membrana e, desse modo, desacopla a cadeia respiratória da fosforilação oxidativa, reduzindo a concentração intracelular de ATP.

O conteúdo protéico das membranas mitocondriais varia entre 60 e 65%, e pode chegar a 75% na membrana mitocondrial interna (LEHNINGER, 1964; NICHOLLS e FERGUSON, 2002). Devido ao alto conteúdo protéico da membrana mitocondrial interna, é esperado que estas proteínas sejam um dos principais alvos das espécies reativas de oxigênio geradas pela mitocôndria. Realmente, as proteínas da membrana mitocondrial sofrem extensa oxidação em condições de estresse oxidativo mitocondrial induzido por Ca^{2+} (FAGIAN et al., 1990; VALLE et al., 1993; CASTILHO et al., 1995, 1996; KOWALTOWSKI et al 1996A, 1996B).

As alterações oxidativas das proteínas da membrana mitocondrial interna, que ocorrem na presença de Ca^{2+} , levam a uma permeabilização não específica da membrana mitocondrial interna, conhecida como transição de permeabilidade mitocondrial (TPM) (ZORATTI e SZABÒ, 1995; VERCESI et al., 1997). A TPM é caracterizada por uma permeabilização progressiva da membrana mitocondrial interna, que gradativamente se torna permeável a prótons, íons, suporte osmótico e até mesmo pequenas proteínas. A TPM induzida por ácidos graxos (AG) não é provocada somente pela diminuição do potencial elétrico de membrana mitocondrial, mas sim pela ação direta do AG no poro de transição de permeabilidade (PTP) (WIECKOSWISCK e WOJTCZAK, 1998; CHAVEZ et al., 1999). Enquanto o desacoplamento da fosforilação oxidativa representa um mecanismo de dissipação de energia (SKULACHEV, 1991), TPM é uma condição que pode levar a morte celular, tanto por necrose ou por apoptose (LEMASTERS et al., 1998).

Recentemente mostrou-se que elevadas concentrações plasmáticas de triglicérides e ácidos graxos livres constituem uma condição metabólica que altera a funcionalidade mitocondrial e foi proposto que as mudanças no controle respiratório de mitocôndria de camundongos transgênicos para apoC-III podem representar uma adaptação regulada para oxidar o excesso de ácidos graxos livres no animal transgênico. Esta adaptação não pode ser atribuída à alta atividade das UCP's que diminuiriam a razão de consumo ADP/O nas

mitocôndrias, mas deveriam ser atribuídos a outras diferenças estruturais ou funcionais das membranas internas da mitocôndria transgênica (ALBERICI et al, 2003).

Alguns estudos demonstraram que mitocôndrias isoladas de fígados e de células mononucleares de baço de camundongos hipertrigliceridêmicos apresentaram velocidades respiratórias elevadas comparadas aos camundongos controle. Mudanças no consumo de oxigênio em mitocôndrias de fígados de camundongos hipertrigliceridêmicos foram sensíveis a ATP, diazóxido e ácido 5-hidroxicarboxílico (5-HD) indicando que o consumo pode ser atribuído à atividade dos canais de K⁺ sensíveis a ATP (mitoK_{ATP}). Do mesmo modo, as mitocôndrias de animais hipertrigliceridêmicos apresentaram um maior inchamento na presença de íons K⁺, sensível aos agonistas e antagonistas do mitoK_{ATP}. O aumento da velocidade do metabolismo foi evidenciado por um aumento no consumo de oxigênio no fígado (sensível ao tratamento agudo *in vivo* pela administração de 5-HD), elevada temperatura retal e maior produção corporal de CO₂ nesses camundongos. De acordo com a velocidade metabólica elevada, a ingestão alimentar foi significativamente maior em camundongos com HTG, sem concomitante aumento de peso. Esses resultados demonstram que a hiperlipidemia primária leva ao aumento da atividade dos mitoK_{ATP} em fígados, o que pode representar uma adaptação regulada para oxidar o excesso de ácidos graxos em camundongos hipertrigliceridêmicos (ALBERICI et al, 2006).

2.4 - Proteômica

Com o advento do estudo do genoma, os genes têm sido descobertos aos milhares, incluindo muitos que codificam proteínas sem funções ainda conhecidas (hipotéticas). Diversos projetos de seqüenciamento genômico feitos nos últimos anos lançaram novas percepções sobre os mecanismos de funcionamento celular responsáveis pela regulação da fisiologia dos organismos seqüenciados. No entanto, toda essa informação ainda não é suficiente, sendo necessária a complementação desses dados genéticos com a

determinação dos níveis de expressão de proteínas e mRNA, codificados por esses genes sob diferentes condições.

A fim de descrever todo o perfil protéico codificado por esses genes de um dado organismo em determinadas condições fisiológicas ou experimentais, os pesquisadores cunharam o termo proteoma. A análise do proteoma é cada vez mais importante e informativa para a compreensão da função da seqüência genômica, pois visa o estudo das várias propriedades das proteínas como sua seqüência, atividade e estrutura. Ela permite determinar quais proteínas são condicionalmente expressas, seus níveis de expressão, sua distribuição dentro de uma célula e a ocorrência de modificações pós-traducionais. Com isso, a proteômica assume um papel cada vez maior nas pesquisas sobre os mecanismos de regulação celular de organismos tanto procarióticos quanto eucarióticos, e suas interações em sistemas biológicos (PANDEY & MANN, 2000).

As informações geradas via proteômica têm sido complementares ao seqüenciamento do DNA e mRNA por focalizar o produto do genoma que é a proteína. Tem-se observado que em muitos casos não existe uma correlação direta entre a expressão do mRNA e o nível protéico, sendo necessária sua avaliação experimental (GRIFFIN et al, 2002).

As diferentes aplicações da proteômica tornaram-se possíveis através da integração e do avanço de diferentes técnicas analíticas e da bioinformática, que permitiu gerenciar, analisar e integrar os dados.

A eletroforese bidimensional (2D-PAGE) combinada com a identificação de proteínas por espectrometria de massas continuam sendo as técnicas mais usadas em proteômica (GÖRG et al, 2004).

A taxa de produção de dados na proteômica, bem como a complexidade deste conjunto de informações, tem aumentado gradativamente à medida que novas técnicas e abordagens surgem e se desenvolvem. Ao mesmo tempo, a descoberta de diversas

modificações protéicas sob determinadas condições tem-se mostrado algo bastante promissor para se elucidar patogenias, visando o desenvolvimento de novos diagnósticos e tratamentos terapêuticos (HANASH, 2004). Dessa forma a proteômica clínica surge com o objetivo de se obter diagnósticos mais precoces e precisos, melhores estratégias terapêuticas, e melhor avaliação de prognósticos e prevenção de doenças. O objetivo final é a identificação de novos alvos terapêuticos, drogas e vacinas.

Tendo em vista a grande quantidade de descobertas relacionadas a doenças e a alta complexidade do proteoma humano, alguns esforços têm sido realizados para se melhor integrar esse conhecimento, buscando assim uma melhor compreensão do proteoma de humanos. Uma dessas iniciativas foi o advento da *Human Proteome Organization* (HUPO), uma organização criada com diversos propósitos, entre eles integrar projetos de pesquisa em larga-escala, como o estudo do proteoma do plasma humano, do cérebro e do fígado (TAYLOR et al, 2006).

2.5 - Eletroforese de duas dimensões em gel de poliacrilamida

A eletroforese em duas dimensões em gel de poliacrilamida (2DE) é uma técnica altamente sensível para o processo de separação de misturas complexas de proteínas, sendo assim um dos métodos fundamentais da proteômica. Ela é baseada na separação através do ponto isoelétrico das proteínas e sua massa molecular.

O primeiro passo é a separação das proteínas pelo seu ponto isoelétrico (pI) através da focalização isoelétrica (IEF), ou primeira dimensão da 2DE. Sob a ação de um campo elétrico é estabelecido um gradiente de pH ao longo de um gel. Dessa forma, quando uma mistura protéica é aplicada nesse gel, cada proteína irá migrar até alcançar a região de pH igual ao seu pI. O pI pode então ser definido como o valor de pH específico no qual a proteína permanece em uma posição estacionária, aonde sua carga total é zero.

O segundo passo é a solubilização das proteínas contidas no gel da primeira dimensão em tampão contendo SDS e a sua separação por eletroforese do tipo SDS-PAGE, baseada no peso molecular das proteínas. Assim, separa-se as proteínas de peso molecular idêntico que diferem no valor de seus pI, ou proteínas com valores de pI semelhantes mas que apresentam pesos moleculares distintos.

O resultado final dessas separações é um perfil de pontos ou *spots*, que são visualizados por coloração por prata ou Coomassie Blue, onde cada *spot* representa uma proteína e cujo volume é proporcional à sua quantidade. Esse perfil bidimensional (2D) segue um sistema cartesiano onde, da esquerda para a direita, observa-se um aumento do pI contido sobre o eixo X, enquanto que, de baixo para cima, sobre o eixo Y há o aumento da massa molecular. A alta resolução da 2DE resulta do fato da primeira e segunda dimensões serem baseadas em parâmetros independentes (pI e massa molecular das proteínas) (Figura 2).

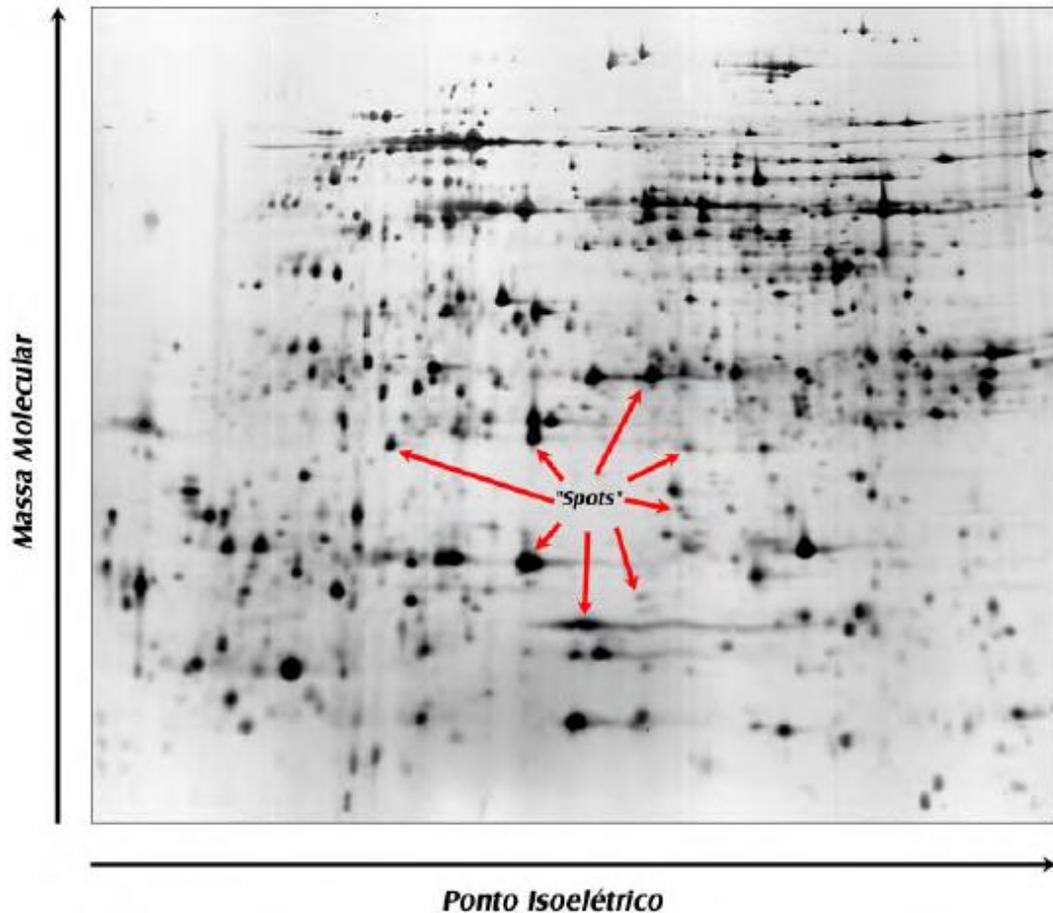


Figura 2. Perfil bidimensional de um gel da 2DE. Plano cartesiano onde os pontos representam os *spots*, que são teoricamente proteínas purificadas da célula ou tecido em questão.

Feito isso, é possível analisar as imagens dos géis 2D através de sistemas e programas de computador especializados, capazes de digitalizar essas imagens. Tais programas permitem a detecção dos *spots* e sua quantificação relativa, bem como estimativas sobre *pI* e peso molecular de cada *spot*, sendo indispensáveis para o armazenamento dos dados coletados e análises comparativas de géis 2D.

Essa análise proteômica clássica permite a separação de milhares de proteínas simultaneamente, possibilitando a verificação de alterações dos níveis de expressão das proteínas envolvidas com um determinado fenômeno biológico. Estas informações

adicionam uma visão ampla a respeito de mudanças e conjuntos de proteínas que podem estar atuando em um determinado evento biológico. Através da 2DE é possível ainda visualizar algumas modificações pós-traducionais através da mobilidade eletroforética alterada de alguns conjuntos de proteínas.

A técnica da 2DE ainda aparece como uma das técnicas disponíveis mais poderosas e amplamente utilizadas em estudos relacionados à análise quantitativa de misturas complexas de proteínas expressas entre duas ou mais amostras (WESTERMEIER, 1997), apesar das conhecidas limitações que apresenta, tais como a exclusão de proteínas muito pequenas (< 6000 Da), muito grandes (250000 Da), muito ácidas ($pI < 3.5$), muito básicas ($PI > 9$) e muito hidrofóbicas (GYGI et al, 2000).

Porém, uma das mais severas limitações dos estudos de proteoma utilizando a eletroforese bidimensional ainda é a dificuldade de detecção de proteínas de baixa abundância, o que pode reduzir as chances de identificação de proteínas regulatórias, geralmente pouco expressas, e que em muitos casos são consideradas como a parte mais interessante do estudo de um proteoma (HAMDAN & RIGHETTI, 2003).

Ao longo dos anos, a técnica da eletroforese bidimensional foi sofrendo gradativos avanços a fim de contornar essas limitações, dentre os quais a introdução dos géis com gradientes de pH imobilizados para a IEF, em substituição aos sistemas de pH formados por anfólitos carreadores. Além disso, outro grande obstáculo freqüentemente enfrentado, em especial nas separações de proteínas de membranas, tem sido as dificuldades na solubilização dessas moléculas para as etapas da eletroforese em função de sua natureza hidrofóbica, o que compromete a separação e a resolução final da 2DE. Porém, com o progresso na área proteômica nos últimos anos novos reagentes têm sido introduzidos para o aperfeiçoamento na preparação das amostras, nas solubilizações das proteínas de membrana, entre eles agentes caotrópicos, detergentes e agentes redutores, além de novas

estratégias para o processo de separação com o objetivo de minimizar a perda de proteínas e a baixa resolução da segunda dimensão (MARTINS DE SOUZA et al, 2008).

As proteínas separadas por 2DE podem ser detectadas por diversos métodos colorimétricos, fluorescentes ou radiográficos pré ou pós-eletroforese (PATTON, 2002 e MILLER et al, 2006).

2.6 - Análise comparativa da expressão de proteínas

Qualquer que seja a forma de detecção, a imagem do gel é posteriormente digitalizada para que seja feita a análise quantitativa das proteínas detectadas através de programas computacionais específicos para análises de perfis 2D. Tais programas contém algoritmos capazes de detectar os *spots*, quantificar os *spots* através de seu volume relativo, eliminar possíveis artefatos que não sejam propriamente proteínas e calibrar o pI e a massa molecular (MW) dos géis de acordo com a faixa de pI e porosidade do gel utilizada.

Nestes softwares ainda é possível comparar diferentes amostras de um mesmo tipo celular em diferentes condições, através da sobreposição dos perfis 2D: os *spots* correspondentes nos diferentes géis são detectados e seus volumes comparados a fim de se estabelecer uma relação da expressão de cada uma das proteínas detectadas. Este processo de comparação dos volumes dos *spots* é conhecido como análise densitométrica.

Assim, a análise comparativa nos permite identificar variações quantitativas da expressão de proteínas, bem como variações qualitativas, avaliando-se aqueles genes que supostamente estão sendo diferencialmente expressos.

Na proteômica quantitativa uma abordagem clássica é a detecção dos *spots* presentes nos géis bidimensionais e a comparação dos volumes dos *spots* entre as diferentes amostras biológicas (MARENGO et al, 2005). A técnica da 2DE é capaz de visualizar mais de 500 *spots* de proteínas em um único gel, para posterior quantificação através da análise computacional de imagens. Entretanto, pelo fato da 2DE ser uma técnica

que consome muito tempo, em geral poucas réplicas são produzidas nesses experimentos. A fim de se conseguir uma análise de expressão diferencial confiável das proteínas, são feitas análises estatísticas sobre todo o conjunto de dados obtidos. O objetivo é identificar os *spots* cuja diferença de volume entre as duas amostras seja significativa para um valor pré-definido ($\alpha = 5\%$, o tipo de grau de admissão geralmente usado na biologia). Para isso, o teste t de Student tem sido o teste estatístico mais empregado em mais de 60% dos estudos recentes (MEUNIER et al, 2005).

2.7 - Identificação de proteínas

O passo seguinte após a separação das proteínas pela 2DE e a detecção dos *spots* é uma análise mais detalhada de cada *spot*. Depois de determinados o pI e o peso molecular observados de todos os *spots* outras técnicas de análise podem ser empregadas, dentre as quais se destaca atualmente a espectrometria de massas, que visa dentre muitos objetivos a identificação de proteínas.

A análise dos *spots* detectados é realizada de forma que a proteína contida em cada *spot* extraído do gel 2D é submetida a um processo de digestão “in gel” com tripsina, obtendo-se assim todos os seus peptídeos. Após o processo de digestão, os peptídeos são extraídos do gel e contaminantes residuais como detergentes, sais, corantes e outros, são removidos para evitar interferência com a análise por “mass spectrometry” (MS).

No espectrômetro, os peptídeos são ionizados, separados segundo suas razões massa/carga (m/z) e então detectados. Em diferentes tipos de espectrômetros de massa os processos de ionização e separação ocorrem por diferentes princípios físicos. Todos os instrumentos geram espectros de massa que são tipicamente representados como um gráfico de duas dimensões contendo valores de m/z no eixo x e intensidade relativas no eixo y (Figura 3).

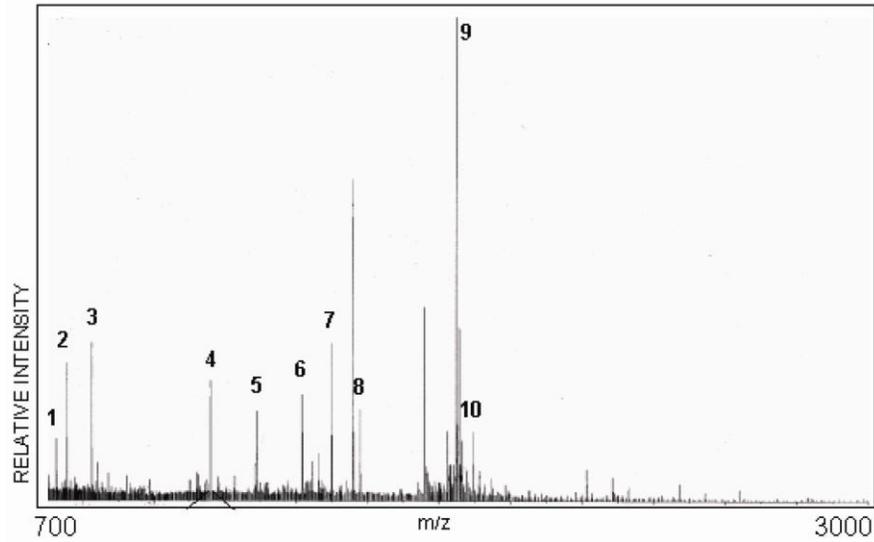


Figura 3. Espectro de massas dos peptídeos trípticos. Cada um dos picos numerados representa um peptídeo.

Nos espectros gerados em instrumentos de alta resolução, cada peptídeo aparece como um conjunto de isótopos (Figura 4), conseqüência do fato de que 1.1% dos carbonos naturalmente existente são o isotopicamente pesado ^{13}C . Como os peptídeos contêm grandes quantidades de átomos de carbono, fração significativa dos peptídeos irão conter ^{13}C (e um valor de massa aumentado em 1 unidade de massa comparado ao íon contendo apenas ^{12}C), ou dois ^{13}C (e um valor de massa aumentado em 2 unidades de massa comparado ao íon contendo apenas ^{12}C), e assim por diante. A escala do eixo x do espectro é definida pelo usuário e tipicamente ajustado entre 500 e 3000 Da, a região de massa mais utilizada para análise de peptídeos por MS (AEBERSOLD & GOODLETT, 2001; CORTHALS et al, 1999).

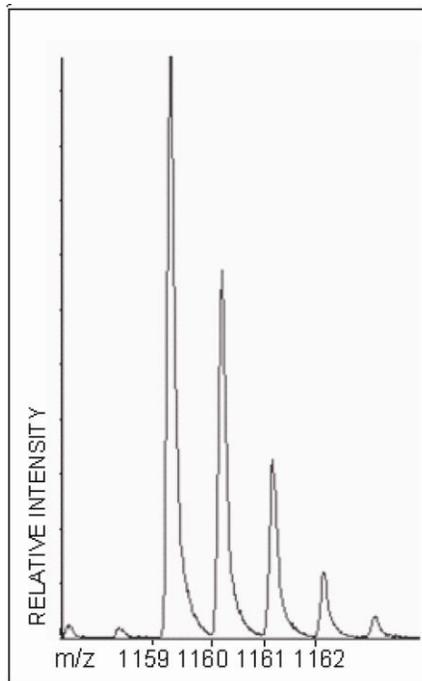


Figura 4. Ampliação de uma das regiões do espectro da figura 3 mostrando o conjunto de isótopos de um dos picos de peptídeo.

Várias moléculas podem ser analisadas no mesmo experimento, ou seja, peptídeos provenientes da digestão trípica de um *spot* são analisados simultaneamente (Figura 5).

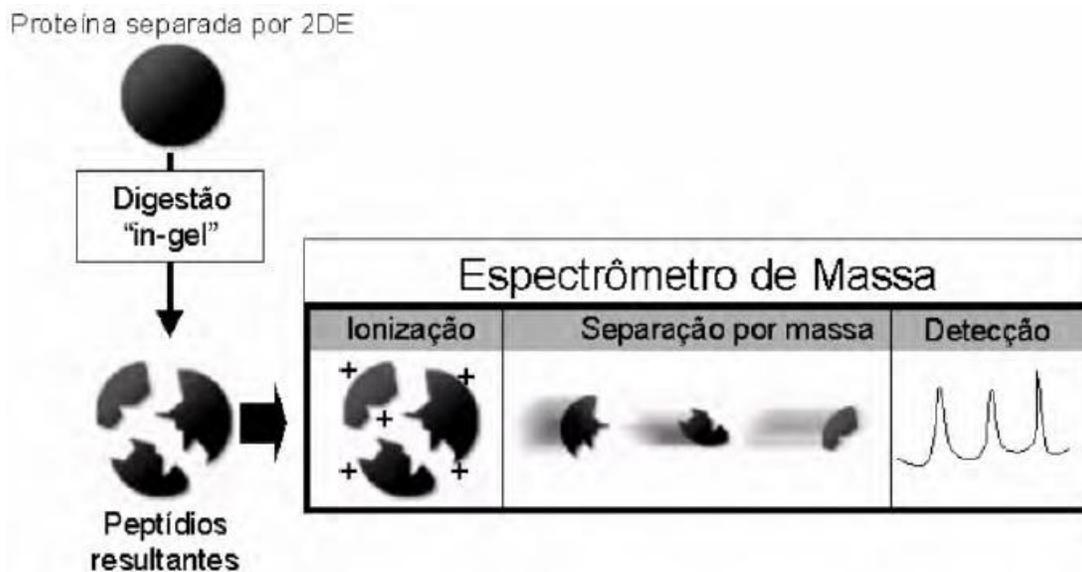


Figura 5. Esquema da identificação de proteína por espectrometria de massas.

2.7.1 - MALDI-ToF (“Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight”)

Em um espectrômetro de massas do tipo MALDI-ToF (“Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight”), a amostra a ser analisada é misturada a um solvente contendo um material capaz de absorver luz no comprimento de onda do laser e dissipá-la termicamente. Esse material é chamado de matriz. A matriz absorve e transfere a energia do laser, causando a vaporização da matriz, que simultaneamente lança a amostra ionizada (íon) na fase gasosa (HILLENKAMP et al, 1991).

A matriz e a amostra são aplicadas em uma placa de metal e após a evaporação do solvente, as moléculas da amostra cristalizam-se junto com a matriz. Esses cristais são então bombardeados, com um feixe de raio laser ionizando as moléculas (Figura 6).

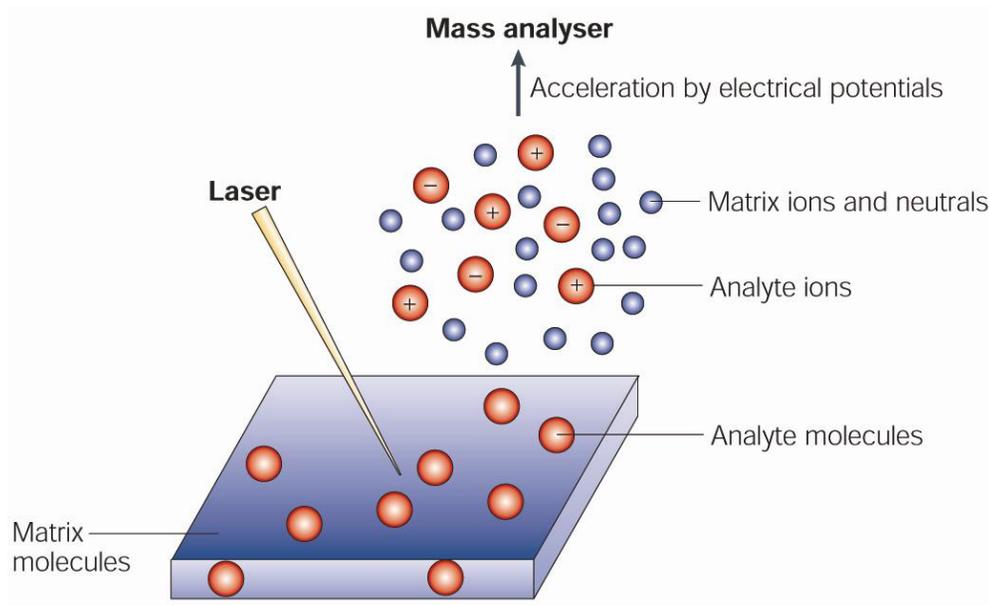


Figura 6. Ionização realizada por MALDI (STEEN & MANN, 2004)

Tradicionalmente, o analisador conjugado com o MALDI tem sido o ToF (*Time of Flight*). A amostra é aplicada sobre uma superfície carregada, de forma que haja um forte campo elétrico para forçar a sua entrada rapidamente, com diferentes velocidades, de acordo com a relação massa sobre carga (m/z) (MANN et al., 2001; WYSOCKI et al., 2005). A obtenção das massas dos peptídeos é resultado da medição do “tempo de voo” dos diferentes íons desde a fonte de ionização até o detector. Estabelece-se então uma relação da massa com o tempo que a molécula leva para atravessar o tubo. O detector é a parte do espectrômetro de massas que vai colher os dados analisados e passar isso para o programa computacional do aparelho.

Dessa forma, cada *spot*, representado por uma mistura de peptídeos resultará em um *pool* de massas (dados experimentais). Os valores das massas dos peptídeos são correlacionados com dados pré-existent em bancos de dados de seqüências, geralmente de seqüências de proteínas, cDNA, DNA genômico ou “expressed sequence tags” (EST),

através de um software que encontra a correlação das massas obtidas experimentalmente com as massas teóricas dos bancos de dados. Dessa forma podemos, através da semelhança entre as massas, inferir qual proteína contém os peptídeos analisados e conseqüentemente encontrar qual a ORF (“open reading frame”) nas seqüências genômicas está relacionada à proteína analisada. Esta técnica, chamada “Peptide Mass Finger-printing” (PMF), é uma ferramenta a ser aplicada para análise de proteínas de organismos que já tenham seu genoma seqüenciado. O aparelho utilizado para PMF é geralmente o MALDI-ToF MS (CORTHALS et al, 1999; AEBERSOLD & GOODLETT, 2001).

2.7.2 - Q-ToF (“Quadrupole – Time of Flight”)

Dependendo do organismo em questão, a complexidade do genoma pode gerar proteínas que contenham peptídeos semelhantes, dificultando sua identificação precisa por PMF, visto que essa “impressão digital” pode ser encontrada em mais de uma proteína. Isso eventualmente acontece nas análises do proteoma de mamíferos para algumas proteínas. Nestes casos, mais dados da proteína são necessários para a sua identificação inequívoca. Assim, equipamentos mais sofisticados foram desenvolvidos e os espectrômetros de massas híbridos (conhecidos como MS/MS), que contém mais de um analisador em série, tornaram-se máquinas poderosas na resolução de dados das moléculas analisadas. Estes espectrômetros permitem selecionar no espectro de massas peptídeos para que estes sejam fragmentados numa câmara de colisão. Os fragmentos, dos mais diferentes tamanhos, desde o peptídeo até um simples aminoácido têm as massas medidas e então a seqüência de aminoácidos do peptídeo é resolvida, gerando um dado muito mais robusto à identificação da proteína (GEVAERT et al, 2000).

Um equipamento muito utilizado em estudos de proteoma e que se encaixa bem de acordo com as necessidades de estudos como o que desenvolvemos é o Q-ToF, aonde os espectros podem ser adquiridos em modo MS/MS. Na primeira análise ocorre a obtenção do

PMF e na segunda análise é medida a massa de fragmentos dos peptídeos selecionados, gerando a seqüência de aminoácidos destes.

Diferentemente dos espectrômetros de massa do tipo MALDI-ToF, no Q-ToF a ionização das moléculas de peptídeos ocorre por eletronebulização (ESI – *electrospray ionization*).

Na análise por ESI a amostra de peptídeos é dissolvida em um solvente volátil. O ESI encontra-se prontamente acoplado a um sistema de separação por cromatografia líquida. A amostra então passa por um estreito tubo capilar metálico, ao qual é aplicada uma voltagem, sendo gerado um aerossol de analito e solvente. Com a evaporação do solvente originam-se íons, sob pressão atmosférica. Os íons são subseqüentemente submetidos a alto vácuo, acelerados através de um campo elétrico para o analisador de massas do espectrômetro e separados de acordo com sua razão m/z (Figura 7).

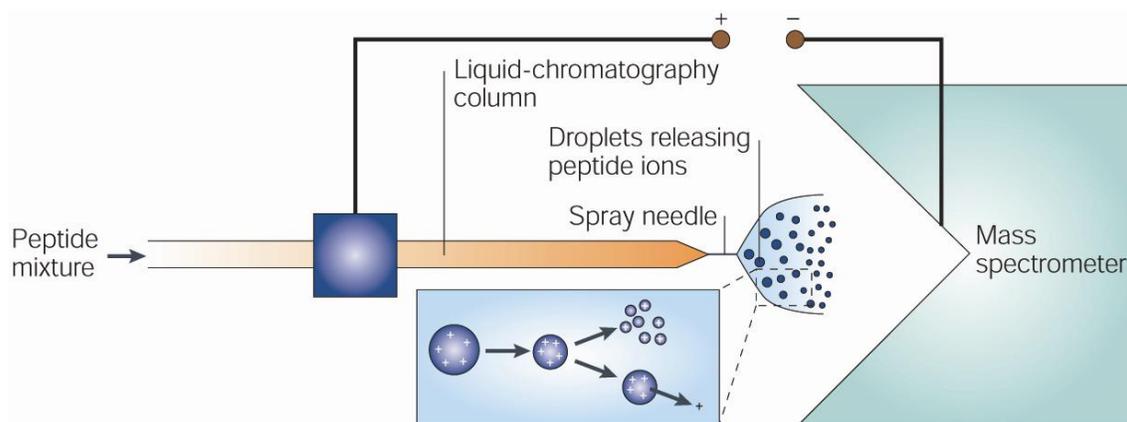


Figura 7. Ionização realizada por ESI (STEEN & MANN, 2004)

Seu analisador chamado de quadrupolo/ToF encontra-se acoplado ao sistema de ESI. Basicamente o Q-ToF é capaz de gerar espectros de fragmentos de íons através de

determinados íons precursores selecionados. Assim, íons que possuem certa relação m/z são selecionados em um primeiro analisador de massas, fragmentados em uma célula de colisão e as massas do fragmento de íon são “lidas” por um analisador do tipo ToF. Dessa forma, os peptídeos são fragmentados e à medida que eles passam pelas câmaras de colisão de íons, as seqüências das proteínas são obtidas (CHERNUSHEVICH et al, 2001; AEBERSOLD & MANN, 2003).

O desenvolvimento de analisadores de massa em seqüência (*tandem*) levou a um grande aumento na resolução e sensibilidade do método, tornando-o uma ferramenta obrigatória nas análises estruturais e químicas de peptídeos e proteínas. Os espectrômetros de massas atuais permitem selecionar uma só molécula ionizada, fragmentá-la e através da análise das massas dos fragmentos conhecer a estrutura da molécula original, permitindo determinar, por exemplo, a seqüência de aminoácidos de um peptídeo ou uma alteração química específica em algum resíduo de aminoácido (PATTERSON & AEBERSOLD, 2003 e STEEN & MANN, 2004).

Diversos laboratórios têm adotado o uso do MALDI e do ESI em suas estratégias de identificação e seqüenciamento de proteínas. Por usarem princípios de ionização diferentes e possuírem distintas limitações, o uso dos dois métodos tem levado a um maior número de moléculas identificadas, além de aumentar a rapidez e a confiabilidade das análises. Normalmente o MALDI-ToF-MS é usado primeiramente para determinar a massa da proteína e após a sua digestão com tripsina, seus peptídeos são separados, normalmente por cromatografia líquida acoplada diretamente no espectrômetro de massas (ESI-ToF-MS/MS) e seqüenciadas (GIORGIANNI, 2003).

3 – OBJETIVOS

- ❖ Confecção de mapas 2D comparativos do proteoma de camundongos transgênicos para apoC-III e do proteoma de camundongos não transgênicos controle.
- ❖ Identificação de proteínas diferencialmente expressas por espectrometria de massas do tipo MALDI-ToF e Q-ToF que possam estar envolvidas na regulação da respiração mitocondrial do estado IV encontrada em camundongos transgênicos hipertrigliceridêmicos.

4 – JUSTIFICATIVA

Algumas patologias de origem genética como a hipertrigliceridemia, que provocam o aumento dos níveis de triglicérides e ácidos graxos, estão relacionadas com diversas doenças cardiovasculares. Camundongos geneticamente modificados para super expressarem a apolipoproteína C-III humana apresentam uma elevada respiração de repouso (estado IV) mitocondrial. Essa alteração na funcionalidade mitocondrial está possivelmente associada às elevadas concentrações plasmáticas de triglicérides e ácidos graxos e pode estar relacionada a uma possível expressão diferencial de proteínas mitocondriais presentes nessas organelas de camundongos transgênicos.

Considerando que a análise proteômica de um organismo permite a obtenção de uma descrição detalhada dos produtos protéicos codificados pelo seu genoma, o estudo comparativo do proteoma de camundongos controle não-transgênicos com o proteoma de camundongos transgênicos para apoC-III (Figura 8) pode ser uma interessante forma de detecção de possíveis proteínas diferencialmente expressas, trabalho que poderá auxiliar na identificação de novos alvos moleculares envolvidos com a regulação da respiração mitocondrial em diversos estados associados à hipertrigliceridemia, como obesidade, diabetes, aterosclerose, dentre outros.

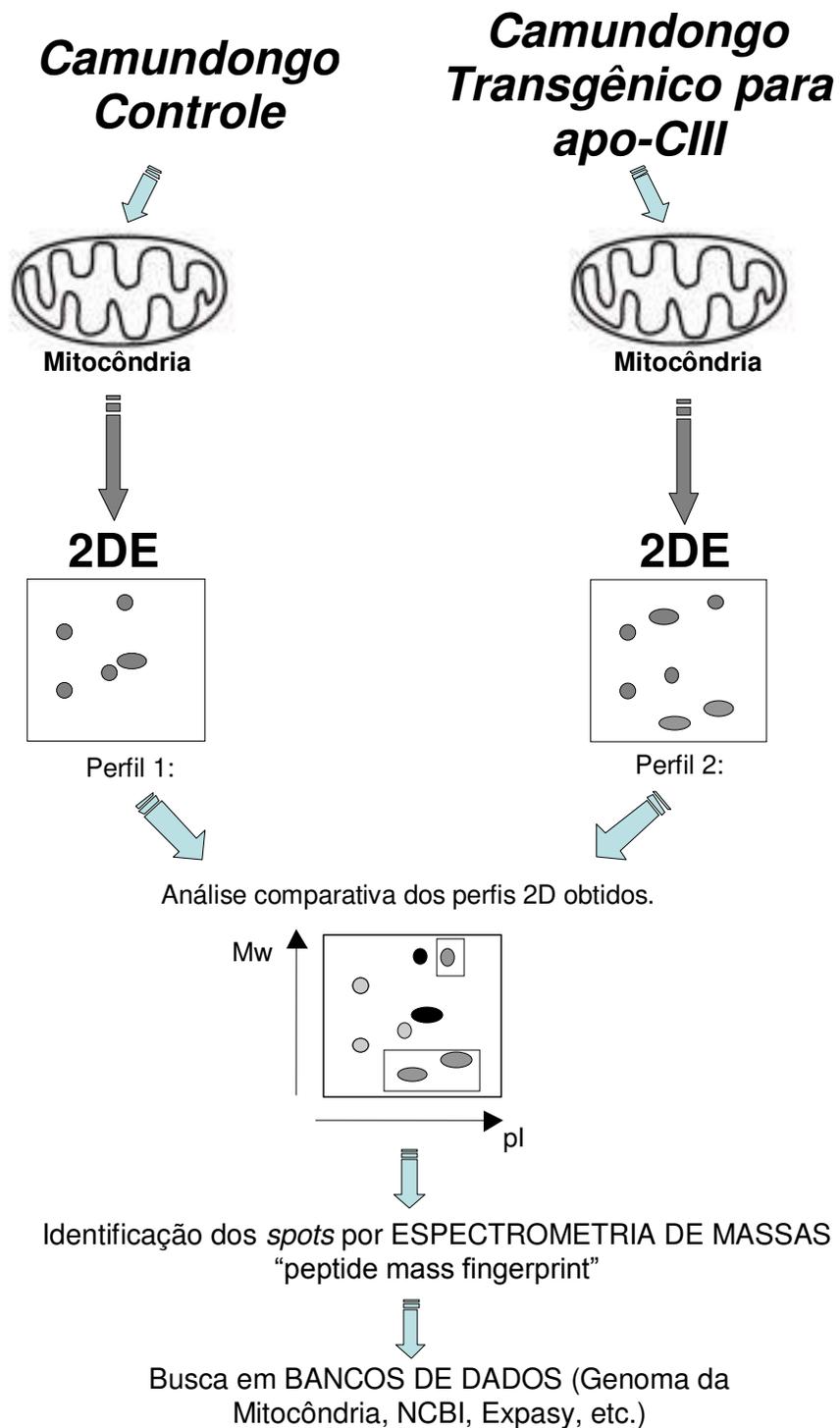


Figura 8. Estratégia metodológica: análise comparativa dos proteomas dos animais controles *versus* animais transgênicos para apoC-III humana.

5 - MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 - Preparação da amostra

5.1.1 - Animais

Camundongos transgênicos para apolipoproteína C-III humana foram originalmente doados pelo Dr. Alan R. Tall em 1996 (Columbia University, NY), e sua colônia foi mantida pelo biotério do laboratório da Prof^a Helena C.F. Oliveira no Depto. de Fisiologia e Biofísica do IB, UNICAMP (CQB 069/98). Os experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal IB/UNICAMP. Os camundongos tiveram acesso à dieta padrão (Nuvital CR1, PR, Brasil) e água a vontade. Foram criados e mantidos em sala climatizada em $22 \pm 2^\circ\text{C}$ com ciclo claro-escuro de 12 horas. Fêmeas transgênicas para apoC-III e irmãs não-transgênicas (controles) de 4 meses de idade foram utilizados neste estudo.

5.1.2 - Isolamento das mitocôndrias

As mitocôndrias de camundongos transgênicos para a apoC-III e de camundongos controle foram isoladas no Laboratório do Prof. Anibal E. Vercesi – Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental (NMCE) – UNICAMP.

As mitocôndrias foram isoladas de fígado de camundongos adultos utilizando-se a técnica de centrifugação diferencial, segundo SCHNEIDER e HOGEBOM (1950), após jejum de 16hs. O fígado, retirado após a morte do animal por deslocamento cervical, foi lavado em solução contendo 250 mM sacarose, 10 mM HEPES pH 7.2, 0.5 mM EGTA e inibidores de proteases [Coquetel de inibidores de protease III Calbiochem (1 mM AEBSF, 0.8 μM aprotinina, 50 μM bestanina, 15 μM E-64, 20 μM leupeptina, 10 μM pepstatina A), 20 μM Inibidores de proteassoma I Calbiochem, 20 μM Lactacystin e 20 μM MG-132] em uma concentração de aproximadamente 50 mg de proteína por ml, picado com tesoura e homogeneizado em homogeneizador Potter-Elvehjem. O material foi centrifugado durante 10

minutos a 387 x g, sendo o sobrenadante coletado e centrifugado durante 10 minutos a 3964 x g. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensa em 250 mM sacarose, 10 mM HEPES pH 7.2, 0.3 mM EGTA e inibidores de proteases nas mesmas concentrações anteriores. Essa fração correspondente às mitocôndrias isoladas foi colocada em tubos contendo gradientes descontínuos de Percoll (7%, 19%, 52% e 62%), sendo centrifugadas durante 12 minutos a 84792 x g (TURKO et al, 2003). A fração mitocondrial purificada foi retirada utilizando-se uma pipeta Pasteur e ressuspensa em solução de 250 mM sacarose, 10 mM HEPES pH 7.2 e inibidores de proteases nas mesmas concentrações anteriores, dessa vez isenta de EGTA.

As amostras de mitocôndrias isoladas na presença de inibidores de proteases e de proteassoma foram fracionadas e congeladas a -80°C , sendo mantidas no Laboratório de Proteômica do Prof. José Camillo Novello – Depto. de Bioquímica – IB - UNICAMP.

5.1.3 - Dosagem de proteínas

A concentração das proteínas mitocondriais do camundongo controle e do camundongo transgênico hipertrigliceridêmico foi determinada pelo método de biureto. O princípio do método baseia-se na determinação da concentração de ligações peptídicas através da medida da absorvância do complexo cobre-nitrogênio. Este complexo absorve em comprimento de onda de 540 nm. A absorvância é considerada diretamente proporcional à concentração de proteína na solução analisada, onde uma solução de BSA (albumina de soro bovina) a 2 % foi utilizada para a série de diluições para determinação da curva padrão.

Aproximadamente 500 ug de proteínas foram então diluídos no tampão de lise (1 % SDS, 20 mM Tris-HCl pH 8.8, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF, 100 mM DTT) em uma proporção 1:1 (v/v), sendo homogeneizadas com auxílio de micro-seringas.

5.2 - Eletroforese de duas dimensões (2D)

As proteínas de mitocôndria dos camundongos controles e dos hipertrigliceridêmicos foram submetidas à eletroforese bidimensional a fim de separá-las de acordo com o seu ponto isoelétrico (pI) e peso molecular.

5.2.1 - Isoeletrofocalização (IEF)

Na isoeletrofocalização, uma quantidade pré-estabelecida de proteínas (500 ug) foi separada, utilizando-se géis de poliacrilamida desidratados pré-feitos de gradiente fixo não linear com faixa de pH 3 a 10 (Amersham Biosciences (GE Healthcare), Chalfont St. Giles, United Kingdom) utilizando-se equipamento IPGphor (Amersham Biosciences (GE Healthcare), Chalfont St. Giles, United Kingdom) (TAYLOR & COORSEN, 2006).

Para a solubilização das amostras de proteínas nessa primeira etapa foi utilizado tampão SB1D [7 M Uréia, 2 M Tiouréia, 4 % CHAPS, 70 mM DTT, 2 % anfólitos (v/v), 0.001 % azul de bromofenol] completando o volume para 350 ul. As amostras foram homogeneizadas em *vortex* por 1 minuto e incubadas por 1 hora a temperatura ambiente, sendo posteriormente centrifugadas em temperatura ambiente a 15777 x g por 2 minutos e o sobrenadante foi utilizado na IEF.

Os parâmetros elétricos para esta corrida foram: rehidratação por 12hs, 500 V durante 1h, 4500 V durante 4h e 8000 V até acumularem-se 60 kVh totais de corrida. A IEF transcorreu sob refrigeração constante de 20°C e amperagem máxima de 50 uA por gel ou “strip”. Após a IEF as “strips” foram armazenadas a -80°C para uso posterior.

5.2.2 - Incubação das “strips”

Para a separação das proteínas de acordo com seus respectivos pesos moleculares é necessário que as mesmas sejam incubadas em tampões cujo reagente principal é o

detergente sódio dodecil sulfato (SDS) que atuará solvatando as moléculas protéicas atribuindo-as carga total negativa.

Neste passo as “strips” provenientes da IEF foram incubadas no tampão 1 (50 mM Tris-HCl pH 8.8, 6 M Uréia, 30 % Glicerol, 2 % SDS, 2 % DTT) por 8 minutos (posteriormente 12 min.) e no tampão 2 (50 mM Tris-HCl pH 8.8, 6 M Uréia, 30 % Glicerol, 2 % SDS, 2.5 % Iodoacetamida) por 12 minutos. Em seguida foram acrescentados 200 ul de tampão Tris-HCl pH 6.8 em cada “strip” por mais 2 minutos. Subseqüentemente a este passo as “strips” foram submetidas à segunda dimensão da 2D.

5.2.3 - SDS PAGE – 2ª Dimensão

Na segunda dimensão da 2D há a separação das proteínas de acordo com a massa molecular apresentada por cada molécula de proteína.

Neste passo foram confeccionados géis de poliacrilamida de concentração de 11.5 % [11.5 % solução acrilamida (30 % acrilamida: 0.8 % bis-acrilamida), 0.04 % PSA, 0.05 % TEMED, 0.37M Tris-HCl pH 8.8] de dimensões 15 cm x 16 cm x 1.5 mm, os quais serviram de matriz para a separação das proteínas contidas nas “strips” provenientes da 1ª dimensão da 2D.

Sobre os géis da 2ª dimensão foram colocados aproximadamente 2 ml de agarose 0.5 % aquecida a 80°C e sobre ela a “strip” proveniente da incubação com tampão contendo SDS.

As corridas foram realizadas no aparato para eletroforese modelo SE-600 (Hoefler, Holliston, MA, United States) sob refrigeração constante de 20 °C e com uso de tampão de corrida (14.42 % glicina, 1 % SDS, 3 % Tris).

5.2.4 - Detecção das proteínas em gel de poliacrilamida

Para a detecção das proteínas os géis 2D foram lavados com água deionizada por 5 min após o término da corrida eletroforética e colocados diretamente em solução corante contendo 40 % metanol, 10 % ácido acético, 0.2 % Coomassie B. Blue R-250, onde permaneceram *overnight*. Em seguida, foram descorados com trocas sucessivas de solução descorante composta de 40 % metanol e 10 % ácido acético.

Posteriormente, durante o desenvolvimento do projeto outro método de coloração para detecção das proteínas foi testado e utilizado, o método de coloração de Coomassie B. Blue G-250 coloidal (CANDIANO et al, 2004). Após o término da 2D os géis foram colocados diretamente em uma solução fixadora (30 % etanol, 2 % ácido fosfórico) por no mínimo 5 horas sob agitação constante. Em seguida, os géis foram lavados em três trocas sucessivas de H₂O durante 1 hora e colocados na solução corante (10 % sulfato de amônio, 10 % ácido fosfórico, 0.12 % Coomassie B. Blue G-250, 20 % metanol) durante três dias ou mais. Posteriormente os géis foram novamente lavados em três trocas sucessivas de H₂O durante 1 hora em outro recipiente limpo, até a nítida visualização dos *spots* nos géis.

5.3 - Análise de imagem 2D

Utilizando-se o “scanner” Sharp Scanner JX-330 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) específico para digitalização de imagens de géis e membranas de blotting, as imagens dos géis foram adquiridas e digitalizadas, em resolução de 300 dpi e sendo armazenadas em formato TIF (8 bits).

O densitômetro detecta e registra a densidade óptica de toda a imagem do gel, o que permite a análise diferencial da expressão das proteínas através da diferença de intensidade apresentada pelos *spots*.

Todos os géis obtidos foram submetidos a ajustes de imagem para melhor visualização dos *spots* e redução da interferência do “background” na quantificação dos

spots. Este procedimento permite maior precisão na identificação do volume total e relativo dos *spots*, auxiliando nas análises comparativas entre géis de diferentes amostras.

Estas imagens processadas foram usadas para a análise e determinação dos pesos moleculares (mW) e pontos isoelétricos (pI) aparentes dos *spots* contidos nos géis com o uso do software Image Master 2D elite versão 3.1 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden).

A quantificação dos *spots* foi realizada analisando-se o volume (área x intensidade) de cada *spot* e normalizando-se os valores encontrados de volume de cada *spot* dividido pela soma do volume de todos os *spots* contidos no gel, gerando assim uma relação de percentagem de cada *spot* em relação à totalidade. Dessa forma foi possível compararmos os diferentes géis e verificar as diferenças de expressão de proteínas através da análise das imagens dos géis.

Por fim, os *spots* diferencialmente expressos foram detectados e analisados utilizando-se o programa Melanie versão 5.02 (Geneva Bioinformatics (GeneBio) S.A., Swiss Institute of Bioinformatics, Geneva, Switzerland). Neste programa, três géis 2D de cada condição foram agrupados e os *spots* foram automaticamente detectados. Os valores obtidos da densidade óptica foram normalizados e os *spots* comparados. Automaticamente, foi criado um gel virtual ou sintético que possibilitou as análises estatísticas comparativas entre os dois grupos de géis (Teste-T) e as análises quantitativas, permitindo o reconhecimento dos *spots* diferencialmente expressos.

5.3.1 - Determinação do pI e da massa molecular

Para a utilização do software Image Master 2D elite versão 3.1 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) foi necessário que nos géis 2D fossem corridos padrões de amostras de proteínas com peso molecular conhecido que serviram de referência para a calibração do peso molecular das proteínas. Para a calibração do pI das

proteínas foi necessário realizar a análise do pI de algumas proteínas através de cálculos que correlacionam a distância de migração das proteínas na primeira dimensão com o pI apresentado e o uso de padrões de proteínas com pI conhecido.

Através do software Image Master 2D elite versão 3.1 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) foi realizada a calibração do pI e da mW dos *spots*. Com a utilização de proteínas com peso molecular e pI conhecidos foi possível a criação de um sistema cartesiano de pontos no qual através do método de La Grange o software realizou o ajuste dos pontos deste sistema cartesiano e conseguiu através das interpolações das coordenadas dos pontos referentes a cada *spot* obter os valores de pI e peso molecular observados. Dessa forma foi possível prever o pI e a mW aparente de todos os *spots* detectados nos géis.

5.4 – Identificação de proteínas por espectrometria de massas

Para a identificação de proteínas, os *spots* detectados nos géis bidimensionais foram extraídos do gel 2D e digeridos para a obtenção de seus peptídeos. Esta mistura de peptídeos é passível de ser analisada em um espectrômetro de massas, onde cada *spot* resultará em um *pool* de massas ou *Peptide mass fingerprint* (dados experimentais).

As proteínas detectadas nos géis foram recortadas e processadas para a identificação por MS de acordo o protocolo modificado de Schevechenko (1996). Os peptídeos trípticos obtidos após a digestão *In-gel* das proteínas foram então analisados em um espectrômetro de massas modelo Voyager DE-PRO MALDI-ToF (Applied Biosystems, Foster City, CA, United States) (Laboratório de Proteômica – UNICAMP). Foram também realizadas identificações e seqüenciamento das proteínas utilizando-se um espectrômetro de massas Q-ToF-Ultima API (ESI-MS/MS *quadrupole orthogonal time-of-flight*) (Waters-Micromass, Milford, MA, United States) acoplado a um sistema *on-line* de HPLC capilar,

CapIC (Waters, Milford, MA, United States) em colaboração com o Prof. Dr. Carlos Alberto Labate do Laboratório Max Feffer de Genética de Plantas – ESALQ-USP.

Quando submetidos ao MALDI-ToF, os peptídeos foram previamente purificados em colunas ZipTip C18 (Millipore) para eluição direta na placa de amostras com a solução de matriz (2 % ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico, 60 % acetonitrila e 0.1 % TFA). A matriz é uma espécie química capaz de ionizar a amostra perante um agente ionizador.

Para calibração interna e externa dos espectros de massas foram utilizadas misturas de calibrantes (massas (Da): 904.4681, 1296.6853 e 1570.6774 – Applied Biosystems, Foster City, CA, United States).

Para identificação das proteínas por “peptide mass fingerprint”, as massas dos picos monoisotópicos dos peptídeos com intensidade maior que 2 % obtidos da digestão trípica foram analisadas contra o banco de dados de proteínas do SwissProt (<http://www.expasy.ch>) utilizando o programa MS-FIT (UCSF; <http://prospector.ucsf.edu/>) e o programa Aldente: Peptide Mass Fingerprinting Tool (ExpASy; <http://expasy.org/tools/aldente/>), sendo limitado a 4 o número mínimo de peptídeos necessários para obtenção de “matching” no banco de dados.

Quando analisadas por Q-ToF, a separação dos peptídeos foi realizada usando-se uma pré-coluna C18 (Sentry Guard Column C18 Waters, Milford, MA, United States) seguida por uma coluna de fase reversa C18 (Symmetry C18 Waters, Milford, MA, United States). Os espectros de massas foram analisados e processados usando o programa ProteinLynx versão 2.1 (Waters-Micromass, Milford, MA, United States), As proteínas foram identificadas através de busca em bancos de dados utilizando o software MASCOT (<http://www.matrixscience.co.uk/>) a partir da seqüência de dois ou mais peptídeos.

Através da análise dos espectros de massas em associação com os dados de pI e mW estimados pela análise da imagem dos géis bidimensionais foi possível a identificação inequívoca das proteínas (AEBERSOLD & MANN, 2003; JOHNSON et al, 2005).

6 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 – Preparação da amostra e Eletroforese Bidimensional (2D)

Durante a primeira metade do período de desenvolvimento deste projeto foram realizadas as atividades de padronização das condições de preparo das amostras, isoeletrofocalização das proteínas e concentração do gel SDS-PAGE, com intuito de atingirmos a melhor reprodutibilidade dos perfis 2D de proteínas e garantir a redução de possíveis interferentes ou contaminantes das amostras.

Tendo em vista os objetivos do projeto inicialmente traçados, conseguiu-se chegar a um protocolo ideal com relação a todas as etapas da extração das proteínas mitocondriais e da Eletroforese Bidimensional (2D). Isso pôde ser comprovado pela reprodutibilidade dos mapas 2D obtidos em todas as extrações de amostra feitas, com o auxílio das análises de imagem realizadas.

Uma das preocupações iniciais do trabalho foi a de não somente encontrar as melhores condições para a separação das proteínas totais, mas também ao mesmo tempo de definir parâmetros que permitissem a máxima resolução possível das proteínas menos abundantes, representadas pelos *spots* de menor tamanho. Durante o período inicial de padronizações da 2DE foram testadas diferentes condições para as etapas de isoeletrofocalização das proteínas, SDS-PAGE e coloração de géis.

Na isoeletrofocalização, em geral, as condições de separação das proteínas devem ser ajustadas de acordo com a natureza e composição da amostra analisada. Linhas e arrastes horizontais dos *spots* no gel, por exemplo, podem ser devido a vários fatores, dentre eles o tempo de focalização, que não deve ser muito curto nem muito longo, fazendo com que as proteínas não se estabilizem nos seus respectivos pls. Nos primeiros experimentos diversos arrastes horizontais foram provocados devido ao excesso de tempo de focalização, especialmente nas regiões mais básicas dos géis (à direita do gel) (Figura 9-A). Isso é

consequência da ocorrência de eletroendosmose da água e da migração das proteínas para além do seu *pI*. Dessa forma, inicialmente foi necessário encontrar o tempo de focalização ideal para as amostras consideradas, representado pela voltagem final acumulada durante a IEF. Essa ficou estabelecida depois de alguns testes como sendo por volta de 60 kVh totais.

Simultaneamente, para se eliminar os arrastes verticais foram feitas algumas modificações em relação ao protocolo inicial de incubação das “strips” em tampões de equilíbrio contendo SDS, mudando-se o tempo de incubação das “strips” no tampão 1, que contém DTT, de 8 min, originalmente previstos, para 12 min. O DTT é um agente redutor responsável por romper quaisquer pontes dissulfeto presentes nas proteínas. Um tempo de incubação insuficiente em tampão contendo SDS e DTT faz com que muitas das proteínas não tenham as moléculas de SDS devidamente incorporadas a elas. Isso provoca diferentes graus de separação de uma determinada proteína ao longo do gel pela sua massa molecular, ocasionando o arraste vertical desta proteína.

Decidiu-se também por aumentar a quantidade de proteínas a ser aplicada nos experimentos, de 400 µg inicialmente planejados para 500 µg de proteínas mitocondriais totais, a fim de se conseguir melhor visualizar as proteínas de baixa abundância e devido à necessidade de termos uma quantidade razoável de proteína no gel para obter uma boa identificação por MS mais adiante. Todas essas alterações foram realizadas com a finalidade de se aprimorar a resolução final dos perfis bidimensionais das amostras, estando representadas na figura 9 através da comparação de dois géis feitos antes (Figura 9-A) e depois (Figura 9-B) do estabelecimento do melhor protocolo padrão da isoeletrofocalização.

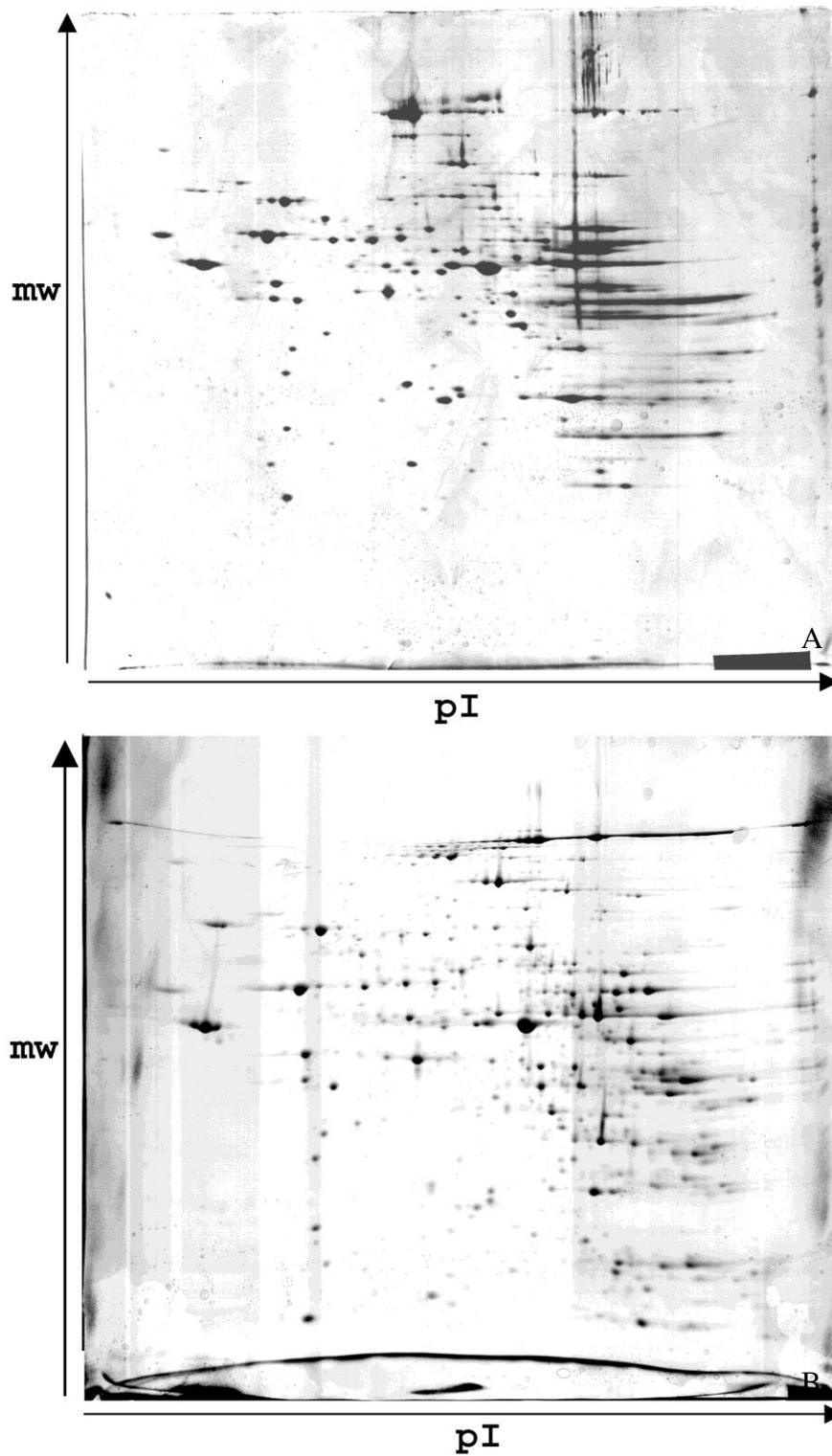


Figura 9. (A) Perfil bidimensional de proteínas da amostra de mitocôndria controle: 400 μg de proteínas foram aplicadas. O tempo de incubação para o tampão 1 foi de 8 min, e a voltagem acumulada de 97 kVh totais. (B) Perfil bidimensional de proteínas da amostra de mitocôndria controle: 500 μg de proteínas foram aplicadas. O tempo de incubação para o tampão 1 foi de 12 min, e a voltagem acumulada de 60 kVh totais.

Após a padronização do protocolo da IEF, o próximo passo foi padronizar a etapa da 2DE, em especial na escolha da melhor concentração do gel SDS-PAGE. Assim, foram confeccionados géis bidimensionais de poliacrilamida nas concentrações de 11.5 % e 12.5 % para a escolha da malha de gel que mais se adequasse à separação das proteínas das amostras. Dessa forma, foi possível comparar o perfil 2D de uma mesma amostra em géis de concentrações diferentes, corridas sob as mesmas condições eletroforéticas, a fim de se estabelecer as melhores condições para a separação das proteínas, caracterizada por uma melhor distribuição dos *spots* ao longo do gel.

Como se pode observar na figura 10 foi possível obter a melhor distribuição dos *spots*, representada pela disposição mais uniforme dos *spots* por toda a área do gel, no mapa 2D de concentração 11.5 % (figura 10-B), ficando assim estabelecida como a concentração a ser utilizada na confecção do restante dos géis, em virtude da melhor separação das proteínas observada para as amostras.

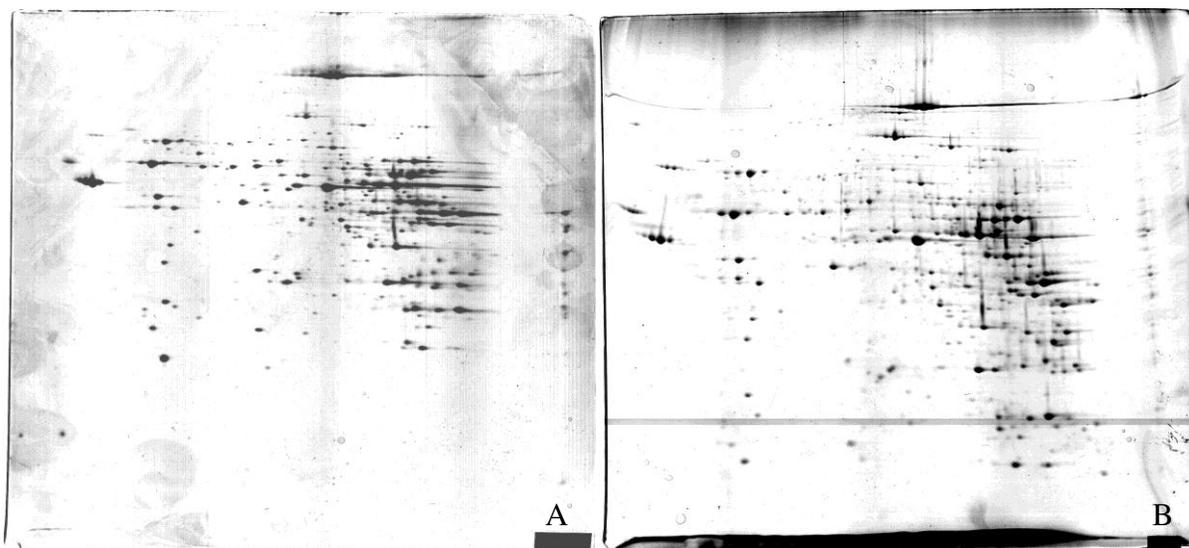


Figura 10. (A) Perfil bidimensional de proteínas de uma amostra de mitocôndria de animal transgênico em gel de poliacrilamida de concentração 12.5 %. (B) Perfil bidimensional de proteínas da mesma amostra de animal transgênico em gel de poliacrilamida de concentração 11.5 %.

O próximo passo foi a escolha do método de detecção (coloração) mais adequado a fim de se detectar com maior eficácia as proteínas nos géis, em especial, as proteínas de menor abundância. Trata-se de um importante determinante da sensibilidade e da qualidade da quantificação.

Os métodos mais comuns utilizados são colorimétricos reversíveis pós-eletroforese, dentre eles a coloração com Coomassie brilliant blue (CBB) ou nitrato de prata (Ag). Ambos têm inúmeros protocolos descritos e são simples, de baixo custo e compatíveis com a espectrometria de massas para análises subseqüentes.

A coloração por Ag é o método colorimétrico mais sensível existente (1-10 ng/spot), porém de difícil quantificação visto que a intensidade da coloração é saturável, depende do tempo de revelação, e 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).

A coloração com CBB (FAZEKAS de ST. GROTH et al, 1963) é o método colorimétrico pós-eletroforese mais confiável para quantificação dos spots já que apresenta linearidade quantitativa na faixa de concentração de proteína de 10-100 ng/spot (POLAND et al, 2005). O corante coomassie (R ou G) liga-se às proteínas por interação eletrostática ou hidrofóbica em meio ácido. Entretanto, a sensibilidade é 5 a 50 vezes mais baixa que a coloração por Ag se usado um protocolo de CBB simples (utilizando como corante o Coomassie-R250).

Assim, seria necessária uma técnica de coloração mais sensível que o método de Coomassie B. Blue tradicional, que se aproximasse da sensibilidade da coloração por nitrato de prata, mas que mantivesse a propriedade da detecção quantitativa que o método de CBB simples possui, mais apropriado para análises diferenciais do proteoma. E que, além disso, também fosse compatível com espectrometria de massas do tipo MALDI-ToF e Q-ToF.

A solução encontrada foi o método de coloração de Coomassie B. Blue coloidal, também chamado de “Blue Silver” devido a sua alta sensibilidade que pode chegar até 1 ng de proteína/*spot*, próxima da técnica do nitrato de prata convencional (CANDIANO et al, 2004). Dessa maneira, o estabelecimento do método de coloração por Coomassie B. Blue coloidal, mais sensível, mostrou-se mais adequado para a análise das proteínas de baixa expressão, comprovada pela eficácia do experimento em suas sucessivas repetições, comparando-se com a técnica da coloração por Coomassie Blue tradicional (Figura 11).

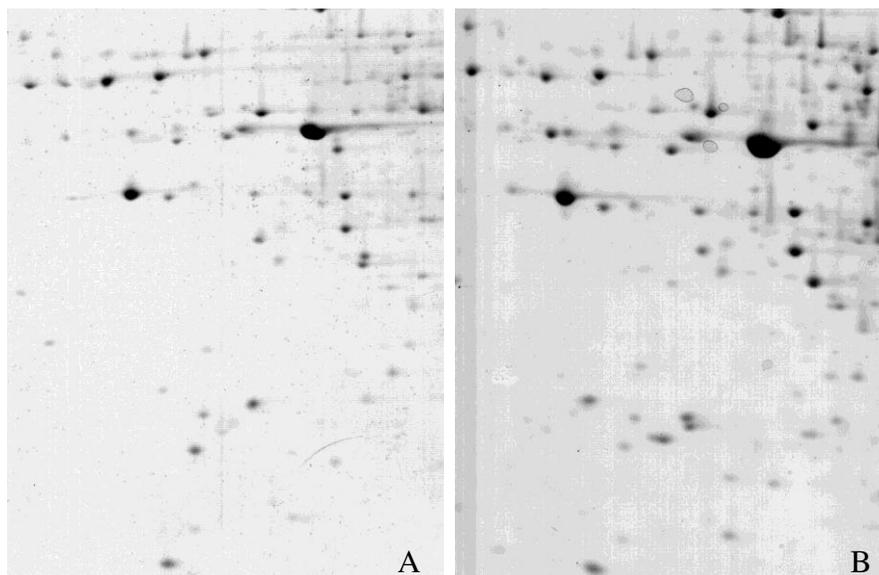


Figura 11. Comparação da sensibilidade dos métodos de coloração testados (A = Coomassie B. Blue tradicional, B = Coomassie B. Blue coloidal ou “Blue Silver”). As duas figuras correspondentes mostram as regiões aumentadas dos mapas 2D de uma mesma amostra controle corrida em dois géis diferentes. Nos dois casos a quantidade de proteína aplicada foi a mesma (500 µg).

Conseqüentemente, todos os experimentos apresentaram uma boa reprodutibilidade com relação à resolução dos *spots*. Assim, foi possível a confecção de mapas 2D reprodutíveis comparativos do proteoma de camundongos transgênicos para apoC-III e do

proteoma de camundongos não transgênicos controle, alcançando um dos objetivos iniciais do trabalho.

Após a padronização das condições da 2DE para as amostras de mitocôndria, foram feitos testes de reprodutibilidade dos géis a fim de encontrarmos os melhores géis e mais representativos de nossas amostras. Nesta etapa foram confeccionados mais de trinta géis para se atingir o grau de reprodutibilidade alcançado nos resultados finais. Este é um ponto fundamental a ser considerado em proteômica: a necessidade de grandes quantidades de amostra para a confecção dos géis bidimensionais, o que torna o alcance de uma boa reprodutibilidade extremamente laboriosa e custosa para estudos comparativos.

A confecção dos géis bidimensionais das duas amostras foi realizada em triplicata e três géis de cada animal diferente foram comparados. Na figura 12 estão indicados os melhores géis resultantes de três processos de extração de mitocôndria de seis animais diferentes.

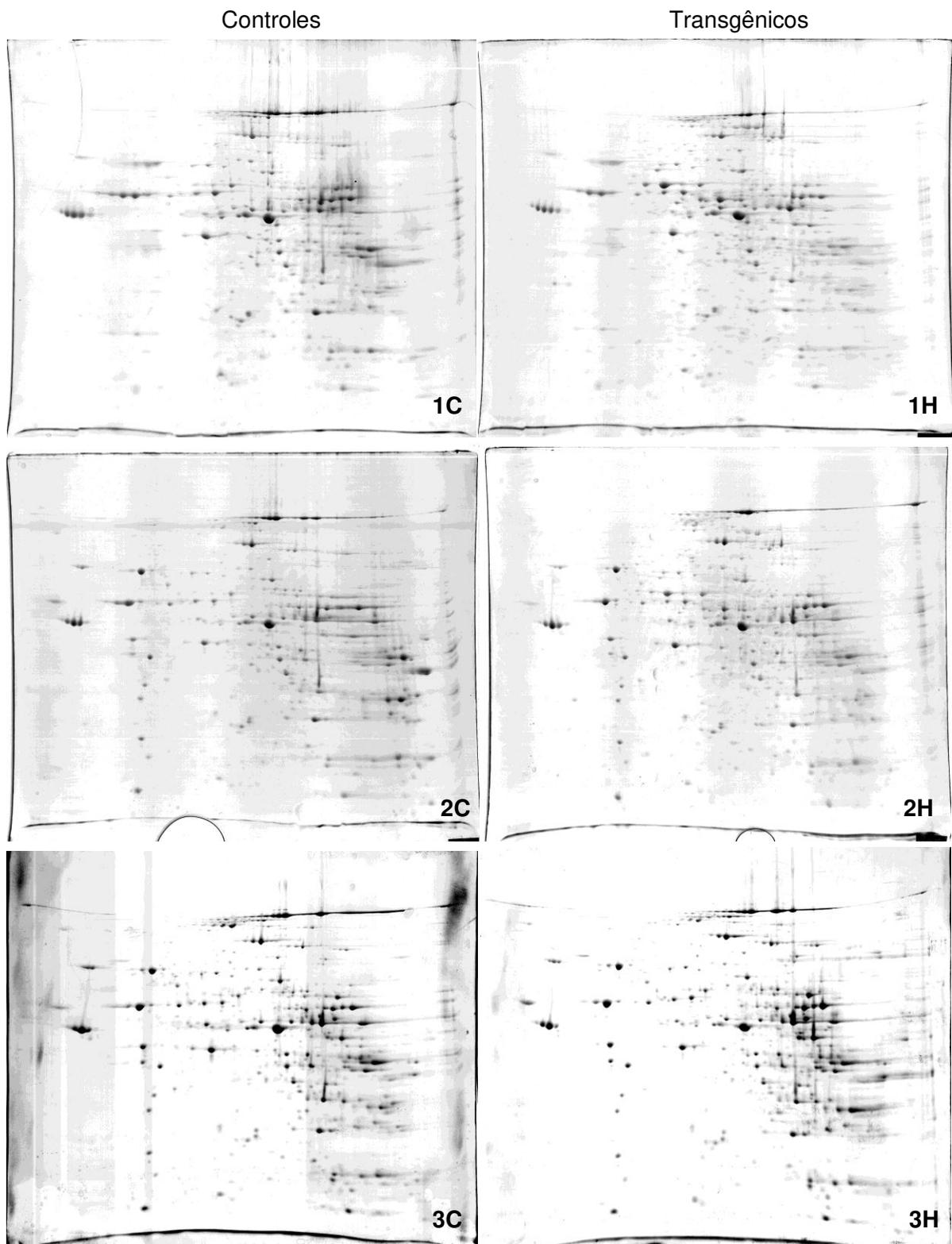


Figura 12. Géis 2D reprodutíveis de amostra de proteínas de mitocôndria das três diferentes extrações. Géis 1C, 2C e 3C foram obtidos de três diferentes extrações de mitocôndria de animais controle. Géis 1H, 2H e 3H foram obtidos de três diferentes extrações de mitocôndria de animais transgênicos hipertrigliceridêmicos.

6.2 – Análise computacional de imagens 2D

Tendo alcançado uma boa reprodutibilidade na etapa de confecção dos géis bidimensionais, a próxima etapa inerente ao estudo comparativo foi a posterior detecção dos *spots* diferencialmente expressos através da análise computacional das imagens dos géis digitalizados.

A 2DE tem como característica mais marcante a sua grande capacidade de separar simultaneamente centenas de proteínas para subsequente comparação quantitativa e identificação. Para isso, há a necessidade de se analisar quantitativamente uma coleção numerosa de géis bidimensionais a fim de se detectar diferenças de expressão protéica entre as amostras. Em face dessa grande quantidade de dados, a escolha e o uso adequado do software para análises computacionais das imagens dos géis tornam-se de extrema importância (MARENGO et al, 2005).

Sendo assim, foram testados e analisados dois diferentes softwares de análise de imagens: Image Master 2D elite versão 3.1 (Amershan Biosciences) e Melanie versão 5.02 (Geneva Bioinformatics (GeneBio) S.A., Swiss Institute of Bioinformatics, Geneva, Switzerland).

O programa Image Master 2D elite não possui ferramentas para análises estatísticas dos *spots* diferencialmente expressos. No entanto, ele e suas versões mais recentes, como o Image Master 2D versão Platinum ainda são um dos softwares mais utilizados para análise de géis bidimensionais em estudos proteômicos (LIU et al, 2005).

O software Melanie é um programa desenvolvido e continuamente atualizado pelo Swiss Institute of Bioinformatics. Ele é comercializado sob o nome de ImageMaster 2D Platinum pela GE Healthcare em colaboração com a GeneBio (VOORDIJK et al, 2003). Sendo assim, ambas as interfaces são muito semelhantes. Considerando isso e tendo em vista a similaridade entre os dois programas, a presença de ferramentas de análises

estatísticas além de outras ferramentas mais completas e atualizadas por parte do software Melanie, optou-se pelo seu uso para a maior parte das análises.

Os perfis bidimensionais do proteoma mitocondrial de camundongo transgênico hipertrigliceridêmico e do proteoma mitocondrial de camundongo controle quando comparados revelaram, desde o início, um alto nível de similaridades entre as duas amostras no que diz respeito ao perfil dos *spots* totais. Foram observadas poucas alterações diferenciais, com exclusividade sobre os *spots* de menor tamanho. Esses *spots* representam o conjunto de proteínas que podem ser classificadas como proteínas de baixa abundância, que são expressas em baixa quantidade relativa no proteoma do tecido, da célula ou da organela analisada.

Com as análises computacionais foi possível a comparação dos géis (Figura 13) e as análises sobre as alterações na intensidade dos *spots*, utilizando-se determinados recursos dos softwares como a normalização da intensidade dos géis e a criação de um gel sintético para cada uma das condições.

Após a detecção automática, foi realizada uma edição manual com correção, adição e remoção dos *spots*, porém sempre mantendo uma intervenção humana mínima durante a análise. Os géis das amostras de mitocôndria de animais controle apresentaram uma média de número de *spots* igual a 411, com desvio padrão (DP) igual a 10. Os géis das amostras de mitocôndria de animais transgênicos apresentaram média de número de *spots* igual a 398 e DP igual a 14. Se considerarmos tais valores, perceberemos que ocorreu apenas uma pequena alteração do número de *spots* totais entre as duas condições analisadas.

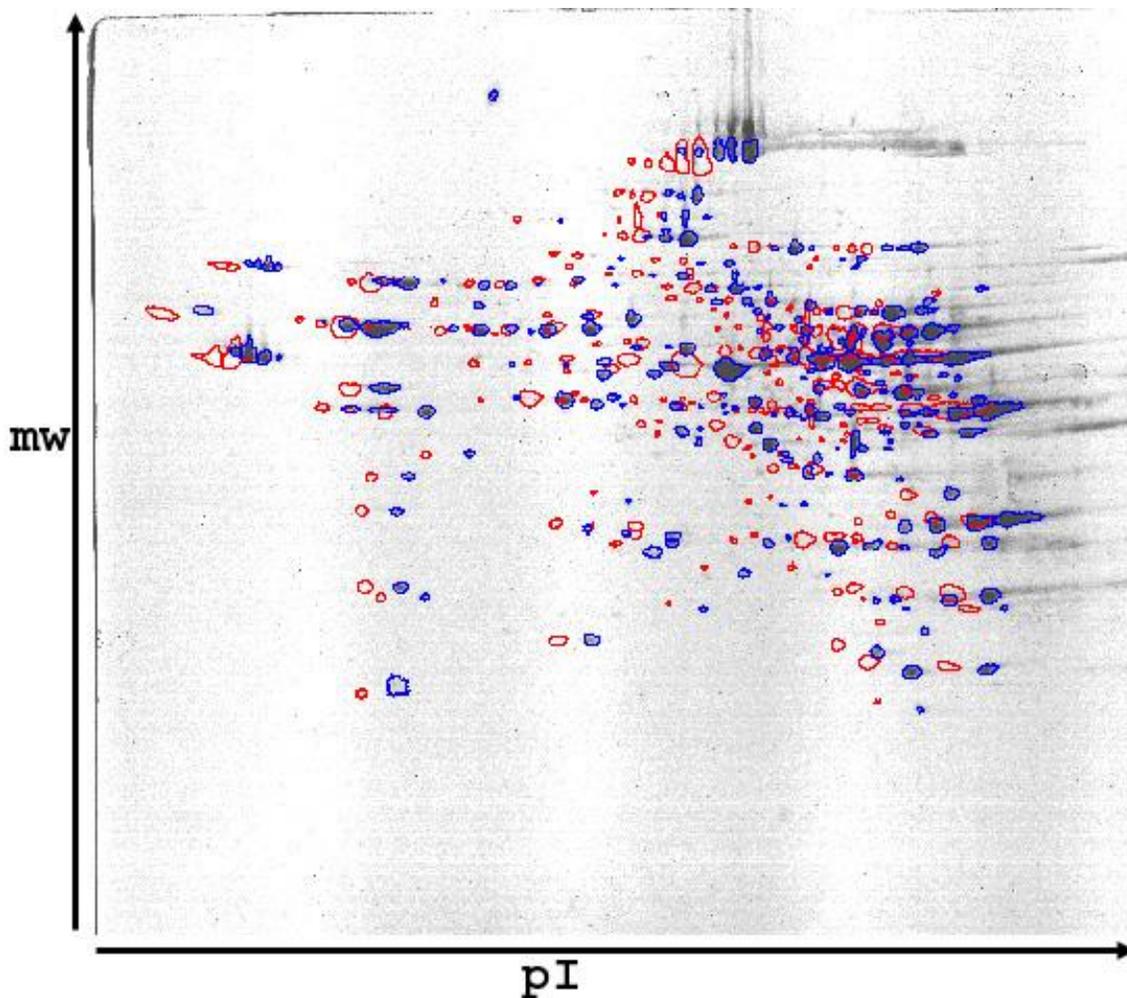


Figura 13. Comparação dos géis 2D através da sobreposição das imagens com detecção dos *spots* pelo software Image Master 2D elite v.3.1. Cada *spot* detectado é circundado por uma linha. Os *spots* vermelhos são referentes ao gel da amostra da mitocôndria controle. Os *spots* azuis são referentes ao gel da amostra hipertrigliceridêmica.

Utilizando a ferramenta de análise estatística presente no próprio programa Melanie, foram realizadas as análises estatísticas através de teste t, a fim de se detectar os *spots* com variação estatística significativa ($p < 0.05$). Dessa forma, pelas análises qualitativas e quantitativas foi possível detectar quais *spots* de uma condição estavam com seus níveis de intensidade aumentados pelo menos 2 vezes em relação ao mesmo *spot* de outra condição.

Nestas primeiras análises, do total de *spots* analisados e comparados, 7 *spots* foram considerados como estatisticamente relevantes, apresentando alterações de intensidade. Dentre eles, 2 *spots* estavam no mínimo 2 vezes mais abundantes no grupo de géis de amostras de animais controle (Figura 14) e 5 *spots* estavam no mínimo 2 vezes mais abundantes nos géis de animais transgênicos hipertrigliceridêmicos (Figura 15).

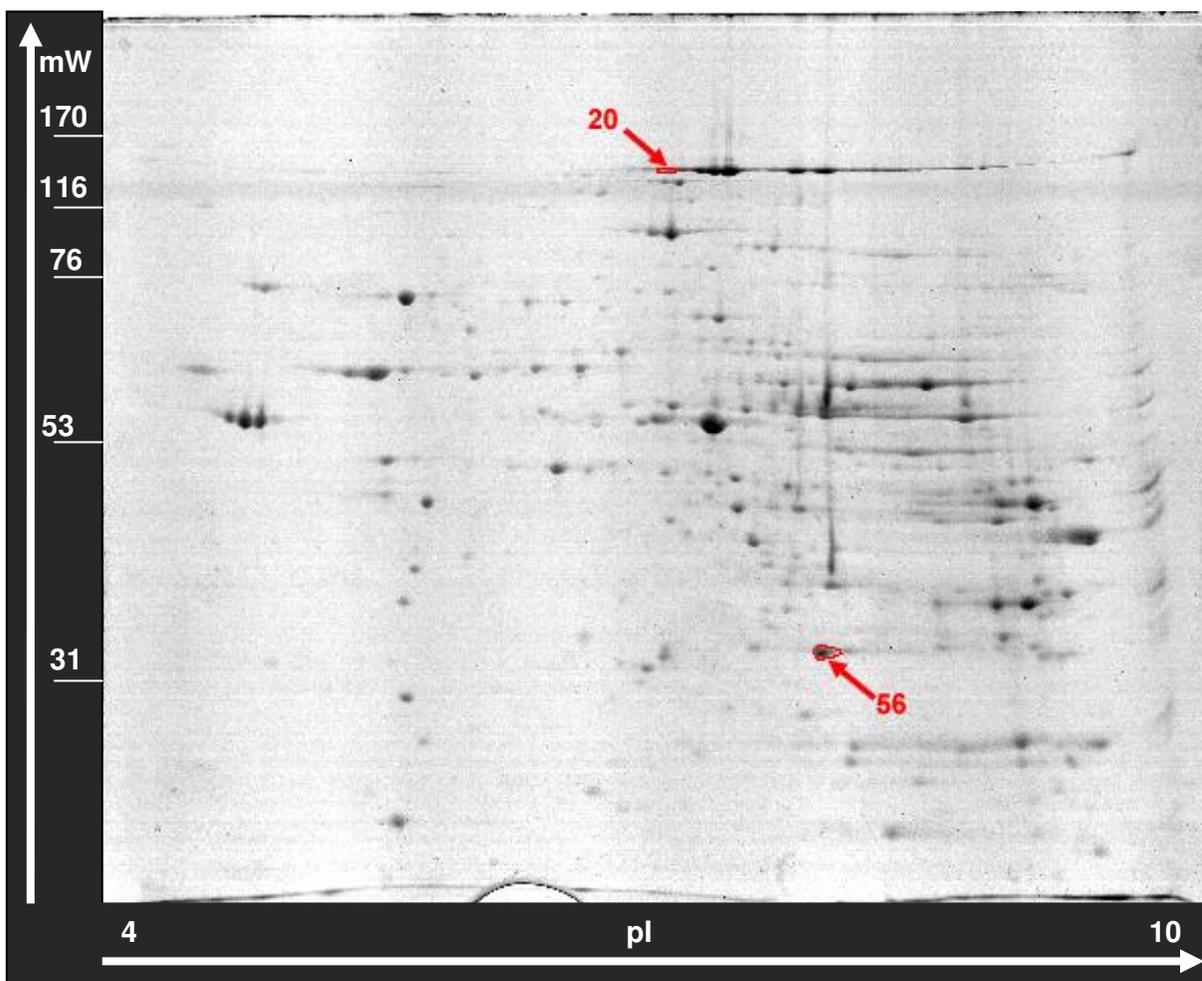


Figura 14. Gel bidimensional da amostra de mitocôndria controle contendo os *spots* diferencialmente expressos indicados e numerados (*spots* 20 e 56). A análise foi feita utilizando o software Melanie versão 5.02.

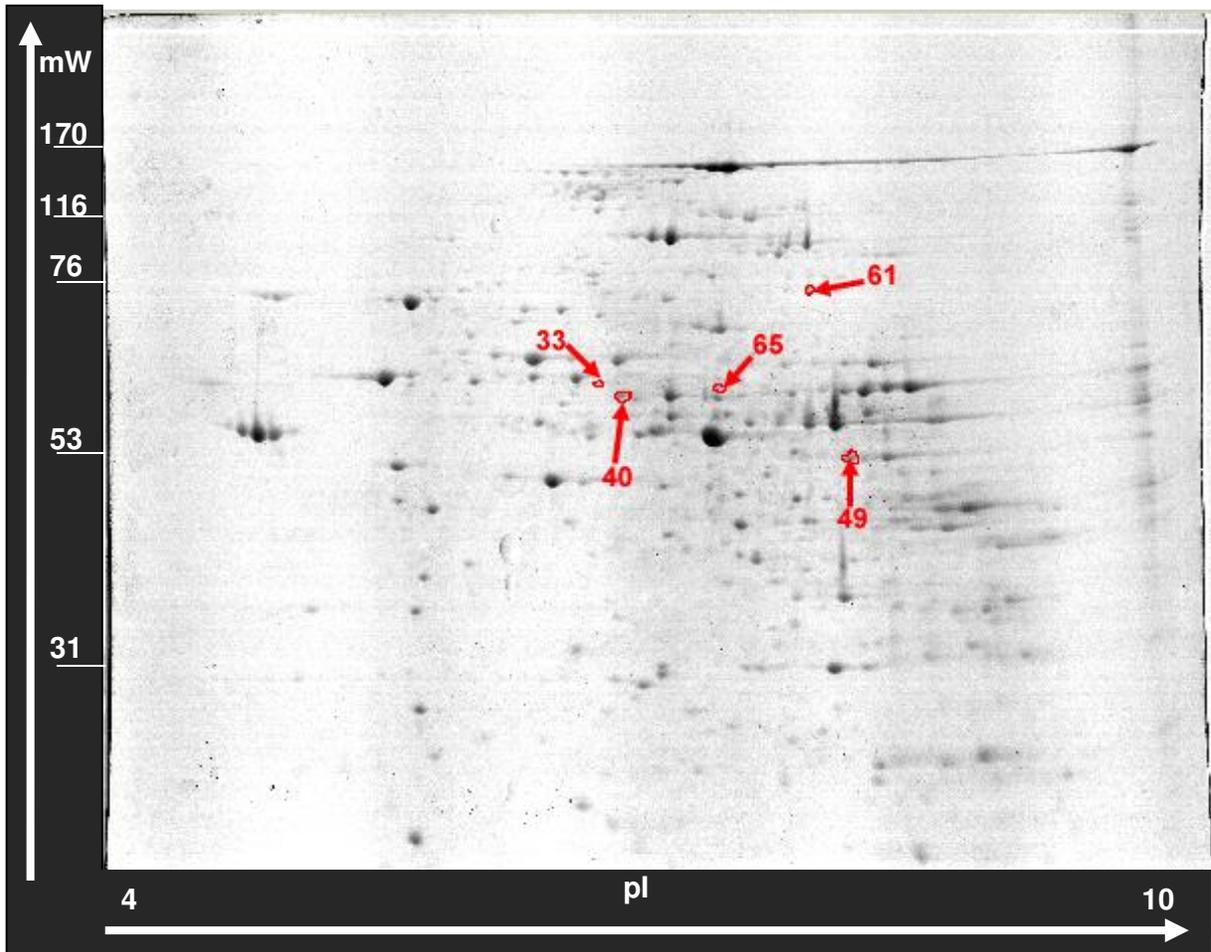


Figura 15. Gel bidimensional da amostra de mitocôndria transgênica contendo os *spots* diferencialmente expressos indicados e numerados (spots 33, 40, 49, 61 e 65). A análise foi feita utilizando o software Melanie versão 5.02.

As análises estatísticas dos *spots* diferencialmente expressos detectados com seus respectivos histogramas de variação de volumes estão representadas na figura 16. Nela, cada um dos histogramas representa as análises estatísticas de cada um dos *spots* diferencialmente expressos, com as variações dos volumes relativos dos *spots* entre os géis. Nos histogramas de cada um dos *spots* (56, 49, 40, 33 e 20), os géis de amostras controle estão representados pelas letras e, f, g, h. Os géis de amostras transgênicas estão representados por a, b, c, d. As barras verticais laranjas correspondem aos valores de volume dos *spots*, a linha horizontal azul representa a tendência central e as linhas vermelhas delimitam os limites extremos, que são definidos por [Valor central – Valor de dispersão, Valor central + Valor de dispersão].

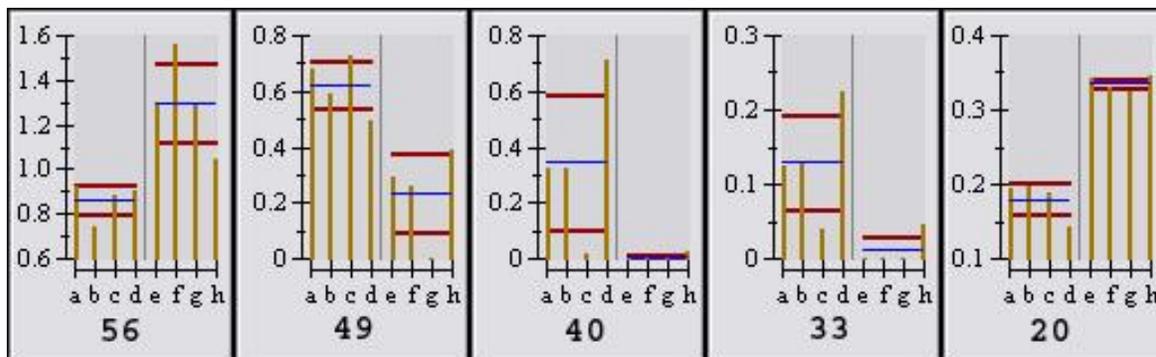


Figura 16. Histogramas representativos de 5 dos 7 *spots* estatisticamente relevantes. Cada um dos histogramas mostra os volumes relativos de cada um dos *spots* (56, 49, 40, 33 e 20) nos géis de amostras controle (e, f, g, h) e nos géis de amostras transgênicas (a, b, c, d),

É importante destacar que o sucesso da análise de imagem depende fundamentalmente da qualidade e reprodutibilidade dos perfis 2D a serem comparados,

principalmente nos géis onde métodos colorimétricos pós-eletroforese como CBB coloidal são aplicados.

6.3 – Identificação de proteínas por espectrometria de massas

Os *spots* diferencialmente expressos selecionados foram posteriormente identificados utilizando-se espectrometria de massas do tipo MALDI-ToF e Q-ToF, onde as massas dos peptídeos obtidos da digestão tríptica foram analisadas e comparadas com banco de dados.

Uma das mais severas limitações dos estudos de proteoma utilizando a eletroforese bidimensional ainda é a dificuldade de detecção de proteínas de baixa abundância por MS, por causa do reduzido número de cópias dessas proteínas presentes no gel. Isso pode reduzir a chance da identificação de proteínas regulatórias, geralmente pouco expressas, e que em muitos casos são consideradas como a parte mais interessante do estudo de um proteoma. Tendo isso em mente, a busca por métodos e estratégias de extração, digestão e obtenção dos peptídeos pouco abundantes para quantificação e identificação inequívoca das proteínas por MS foi um dos maiores desafios do projeto.

Para a identificação das proteínas diferencialmente expressas por espectrometria de massas, tanto do tipo MALDI-ToF quanto Q-ToF, foram realizadas algumas modificações nos protocolos iniciais. Pelo fato dos *spots* pequenos apresentarem poucas cópias de sua respectiva proteína presentes no gel, diversos testes preliminares para identificação por MS foram realizados.

Os peptídeos, previamente purificados em colunas ZipTip C18 (Millipore), ao invés de serem eluídos diretamente na placa de MALDI com a solução de matriz (2 % alfa-ciano, 60 % acetonitrila e 0.1 % TFA), sofreram uma etapa de preparação adicional em relação ao protocolo modificado de Schevechenko (1996), a fim de se concentrar uma maior quantidade de peptídeos na placa de MALDI. Após a purificação e coleta dos peptídeos em colunas

ZipTip, os peptídeos foram eluídos com 20 μ l de uma solução de 60 % acetonitrila e 0.1 % TFA em um eppendorf separado. Esse volume foi secado em SpeedVac (Savant AES) até 2 μ l, sendo então essa quantidade de peptídeos presentes de forma mais concentrada aplicada sobre 1 μ l da solução de matriz ainda líquida na superfície da placa. Assim, uma maior quantidade de cópias purificadas dos peptídeos de cada amostra pôde ser detectada. Os resultados exibidos na Figura 17 mostram que quanto maior a concentração dos peptídeos, maior é a intensidade do sinal dos espectros de massas obtidos, aumentando assim a confiabilidade dos resultados. Essa metodologia adotada na digestão e eluição demonstrou ser eficiente através dos testes preliminares realizados, aumentando a probabilidade de identificação das proteínas.

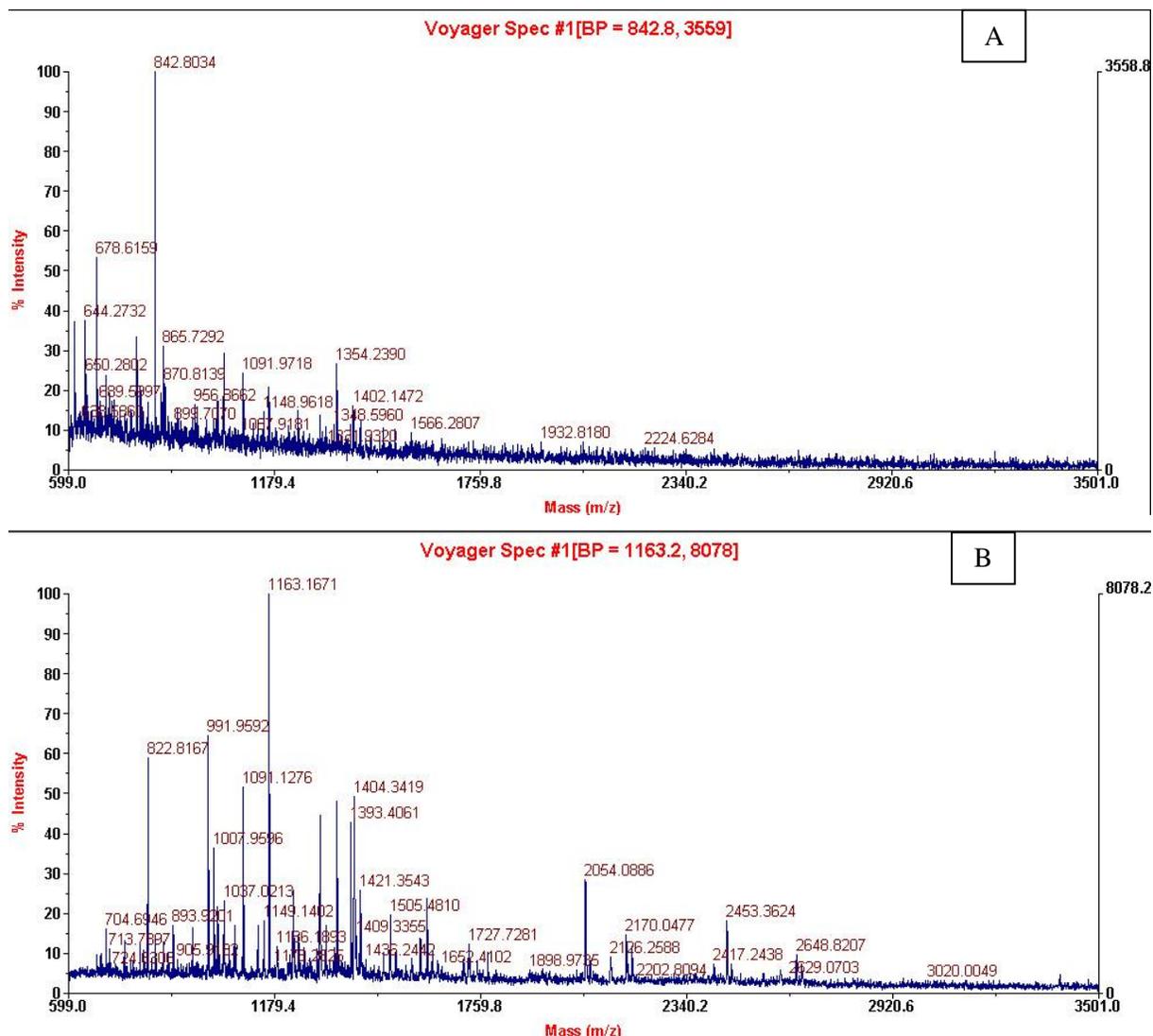


Figura 17. Comparação dos espectros obtidos do mesmo *spot* submetido a dois tipos diferentes de preparação. O espectro A contém as massas dos peptídeos eluídos diretamente na placa de MALDI com a solução de matriz. O espectro B contém as massas dos peptídeos purificados e mais concentrados através do método modificado de preparação.

Dentre todas as proteínas diferencialmente expressas, três proteínas super-expressas nos animais transgênicos (*spots* 33, 40 e 49) e duas proteínas super-expressas nos animais controle (*spots* 20 e 56) puderam ser analisadas por espectrometria de massas e validadas com o uso de banco de dados.

A tabela 1 lista as proteínas mitocondriais diferencialmente expressas identificadas em cada uma das condições estudadas utilizando-se o MALDI-ToF, juntamente com o número do respectivo *spot*, valores de massa molecular, pI, *score* e outros dados. A tabela 2 lista as proteínas mitocondriais diferencialmente expressas identificadas utilizando-se o Q-ToF.

Nas análises dos *spots* utilizando-se o MALDI-ToF, picos monoisotópicos dos espectros de massas com intensidade entre 2 % e 4 % foram submetidos à busca no banco de dados SwissProt (<http://www.expasy.ch>) pelo software Aldente, considerando tolerância em massa de 100 ppm para erros de calibração externa e tolerância máxima de 25 ppm para erros de calibração interna. Para a calibração externa e interna dos espectros de massas foi utilizado o kit Peptide Sequazyme (Applied Biosystems, Foster City, CA, United States) que contém peptídeos com massas conhecidas. Nas buscas no programa Aldent foi mantida a faixa de maior abrangência de pI (0 a 14) e mW (0 a 250 kDa) e foram consideradas variáveis as modificações de carbamidometilação e metilação.

Somente um dos sete *spots* conseguiu ser identificado utilizando-se o espectrômetro de massas do tipo Q-ToF, em razão da baixa quantidade de peptídeos presentes. Apesar da otimização dos protocolos em busca de uma maior concentração dos peptídeos nas amostras, muitos deles acabaram sendo perdidos durante as passagens pelas colunas de cromatografia líquida acoplada. Neste sistema, os peptídeos são eluídos através da variação do gradiente de tampões contendo acetonitrila e ácido fórmico em diferentes concentrações. Durante a corrida de fluxo muitos peptídeos acabaram retidos nas colunas, o que diminui muitas vezes a quantidade de peptídeos aplicada.

Tabela 1. Proteínas identificadas por MALDI-ToF.

No. spot	Proteína	No. de acesso	Mowse Score	mW (Da)*	pI *	Cobertura (%) *	Média de erro (ppm)
<i>Proteínas super expressas em géis de animais hipertrigliceridêmicos</i>							
33	Carbamoyl-phosphate synthase	Q8C196	14.7	164 619	6.5	8	-83
40	Carbamoyl-phosphate synthase	Q8C196	6.25e+7	164 619	6.5	16	-34.7
49	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase	P54869	51679	56 823	8.6	22.4	50.4
<i>Proteínas super expressas em géis de animais controle</i>							
20	Carbamoyl-phosphate synthase	Q8C196	1.58e+10	164 619	6.5	15.5	-9.22
56	Electron transfer flavoprotein subunit alpha	Q99LC5	2.21e+8	35 010	8.6	37.2	1.85

***pI**: ponto isoelétrico predito pelo programa Aldente (teórico); **mW**: peso molecular predito pelo programa Aldente (teórico); **Cobertura**: porcentagem da seqüência da proteína que foi identificada.

Tabela 2. Proteínas super expressas em géis de animais controle identificadas por Q-ToF.

No. spot	Proteína	MASCOT Score *	No. de Hits	MW (Da)*	MS/MS Sequence
20	Carbamoyl-phosphate synthase	232	19	165.711	K.SLFHYR.Q K.ETLIDLGTK.A K.APMFSWPR.L K.VPAIYGVDR.M K.FVHDNYVIR.R K.IALGIPLPEIK.N K.TAHIVLEDGK.M R.SIFSAVLDELK.V R.VSQEHPVVLTK.F K.TLGVDFIDVATK.V K.TLGVDFIDVATK.V R.GQNQPVLNITNR.Q K.AFAMTNQILVER.S K.GLNSDSVTEETLR.K K.IAPSFAMESMEDALK.A K.IEFEGQSVDVDPNK.Q R.DGSIDLVINLPNNNTK.F R.LPTLEQPIIPSDYVAIK.A K.RLPTLEQPIIPSDYVAIK.A

* **MASCOT Score:** refere-se à somatória dos valores de *ion score* dos peptídeos detectados para a proteína identificada, considerando um p-value<0.05; **mW:** peso molecular predito pelo programa Mascot (teórico).

Carbamoyl-phosphate synthase

Entre as proteínas identificadas, Carbamoil-fosfato sintetase esteve representada por mais de um *spot*. A presença de múltiplos *spots* de uma mesma proteína no gel pode indicar a presença de modificações pós-traducionais, ocorrência de variações alélicas de uma mesma proteína, variação isoenzimática ou eventos provenientes do *splicing* alternativo (GION et al, 2005).

A carbamoil-fosfato sintetase I (CPS I) é a enzima taxa-limitante que catalisa a primeira etapa comprometida do ciclo da uréia (Figura 18), que representa o sistema primário para remoção de nitrogênio não aproveitado produzido pelo metabolismo de proteínas. A expressão de CPS I é limitada a altos níveis no fígado e a pequenas

quantidades na mucosa intestinal. A CPS I é compartimentalizada dentro da mitocôndria embora seja codificada genomicamente. A CPS I madura é uma proteína monomérica de 160 kDa que catalisa a conversão de amônia e bicarbonato em carbamoil fosfato (CP) com gasto de 2 moléculas de ATP. A análise da estrutura da carbamoil-fosfato sintetase revela dois domínios homólogos, cada um dos quais catalisa uma etapa dependente de ATP. Apresenta ainda três centros ativos diferentes (Figura 19).

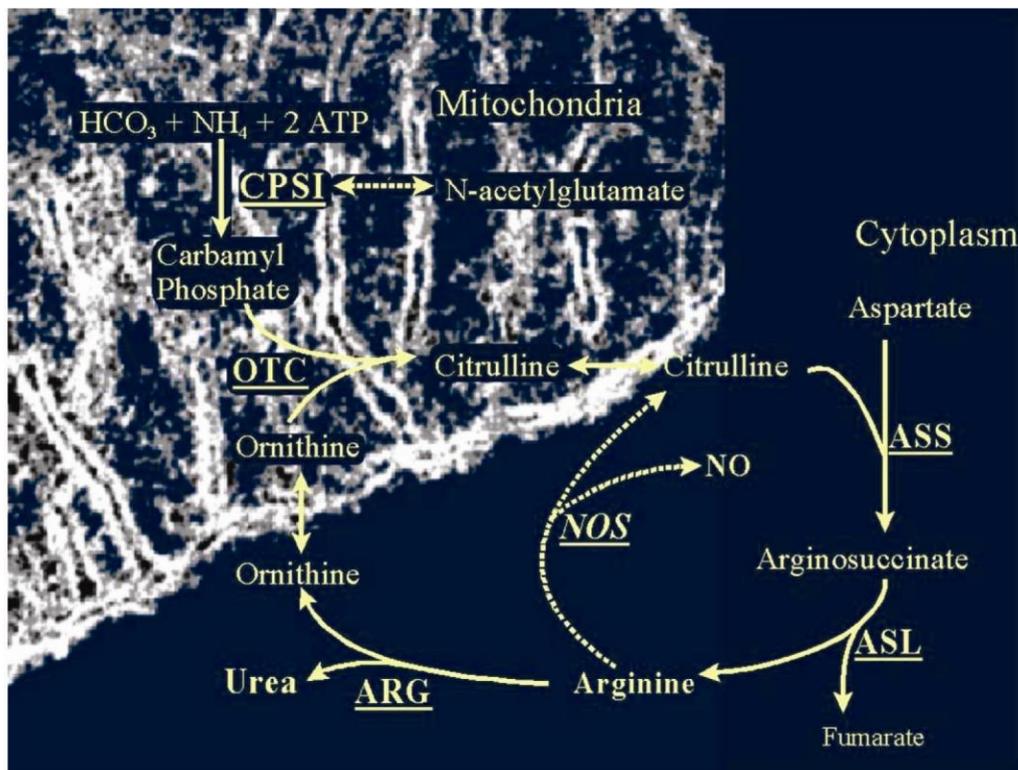


Figura 18. Ciclo da uréia, mostrando a via metabólica na qual a CPS I está inserida (SUMMAR et al, 2004).

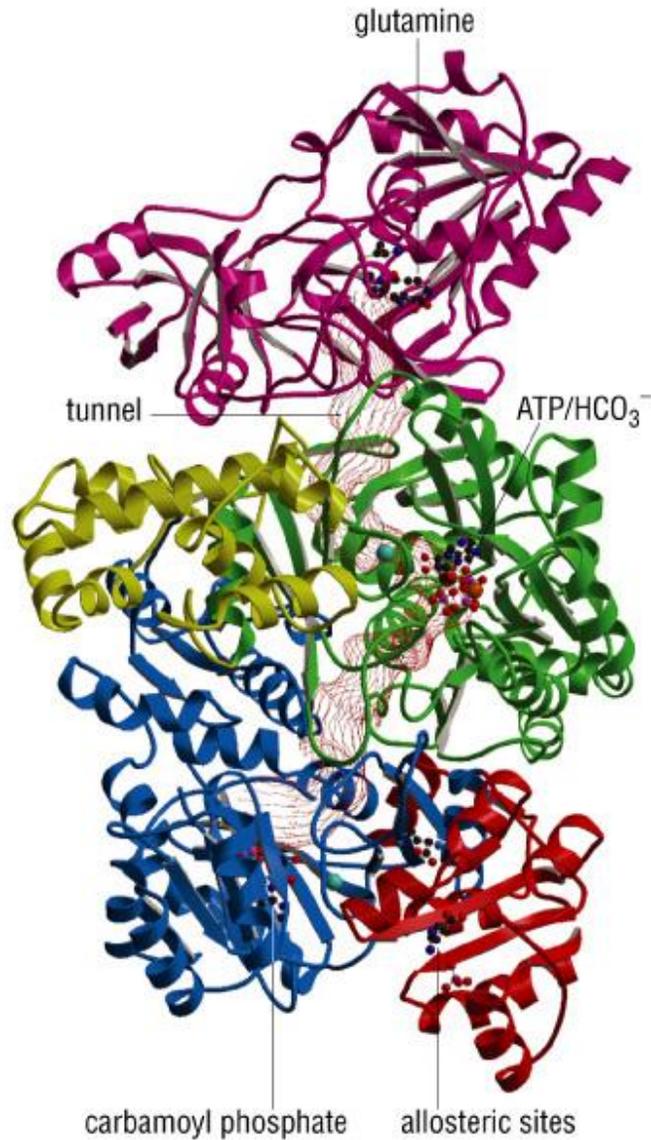


Figura 19. Estrutura da carbamoil fosfato sintetase. É possível observar centros ativos para três reações. Ela é constituída de duas cadeias. A cadeia menor (roxa) contém um local para a hidrólise de glutamina, gerando amônia. A maior inclui dois domínios de captura de ATP (verde e azul). Em um deles (verde), o bicarbonato (HCO₃⁻) é fosforilado a carboxi-fosfato, que então reage com amônia, gerando ácido carbâmico. No outro domínio de captura de ATP (azul), o ácido carbâmico é fosforilado, produzindo carbamoil fosfato.

A deficiência hepática de CPS I compromete a capacidade do fígado de remover o nitrogênio não aproveitado, resultando em hiperamonemia severa. Modificações pós-traducionais são geralmente desconhecidas, além da clivagem dos primeiros 38 resíduos após sua entrada na mitocôndria (SUMMAR et al, 2004).

Estudos pré-clínicos indicam que o alto consumo de frutose está associado com o desenvolvimento de certas síndromes metabólicas, como intolerância a glicose, hiperinsulinemia, hipertrigliceridemia, e resistência a insulina (JURGENS et al, 2005 e TAGHIBIGLOU et al, 2000). Seguindo essa linha, estudos recentes demonstraram que a CPS I está entre as proteínas hepáticas que se encontram sub-expressas em condições de aumento do consumo de frutose, correlacionando com o aumento na infiltração de ácidos graxos no fígado (ZHANG et al, 2008). No entanto, ainda existem poucas informações a respeito da regulação da expressão de CPS I em fígados.

Existem evidências experimentais de que a TPM pode ser um evento essencial em mecanismos de morte celular tanto por apoptose como por necrose (LEMASTERS et al, 1998). O aumento sustentado da concentração de Ca^{2+} citosólico e intramitocondrial pode induzir a TPM. Na morte celular necrótica, o aumento do Ca^{2+} citosólico ocorre por falência dos mecanismos de regulação intracelular da concentração do cátion e a TPM generalizada leva à depleção de ATP seguida de morte celular. No caso da morte por apoptose, a TPM seria um evento localizado a sítios de aumento regulado de Ca^{2+} e a produção do ATP, necessário para este tipo de morte celular, seria preservada às custas de mitocôndrias não atingidas. A abertura do poro de TPM facilitaria a liberação de fatores pró-apoptóticos mitocondriais. A presença destes fatores no citosol leva a ativação de proteases denominadas caspases, que promovem a morte “limpa”. Desta forma, experimentos sugerem que os animais hipertrigliceridêmicos são mais susceptíveis à TPM que pode levar a morte celular, seja por necrose ou apoptose, em situações que aumentam os níveis intracelulares de Ca^{2+} , ou na presença de agentes pró-oxidantes.

As caspases são ativadas em resposta a múltiplos estímulos apoptóticos, sendo responsáveis pela degradação de proteínas-chave, tanto estruturais quanto regulatórias, durante a apoptose. Diversos alvos moleculares são conhecidos como sendo substratos para as caspases, incluindo enzimas de reparação de DNA, proteínas estruturais, proteína quinases, e componentes de transdução de sinais ou de eventos regulatórios do ciclo celular. Acredita-se que a proteólise de proteínas estruturais e envolvidas em funções básicas da célula seja necessária para o desmonte da célula, ao passo que outras proteínas podem ser usadas como alvo para prevenir a replicação de células deterioradas (NICHOLSON & THORNBERRY, 1997).

Um dos substratos para as caspases é o CAD (carbamoyl phosphate synthetase II/aspartate transcarbamoylase/dihydroorotase), um complexo protéico multi-enzimático de 240 kDa, necessário para a síntese de nucleotídeos pirimidina e crescimento celular. Este complexo compreende três atividades enzimáticas diferentes. A etapa limitante de sua via de funcionamento é catalisada pela carbamoil-fosfato sintetase II (CPS II). Estudos demonstraram que ocorre um rápido declínio na atividade de CPS II durante apoptose, havendo uma proteólise seletiva de CAD paralela a perda de atividade de CPS II, correlacionadas com a ativação de caspase-3. Dois sítios de clivagem de caspase-3 foram identificados dentro do domínio CPS II de CAD, o que poderia explicar a perda de atividade CPS II durante apoptose (HUANG et al, 2002). Concomitantes com a perda da atividade de CAD foram observadas reduções significativas de pirimidinas celulares nas células apoptóticas. Deste modo, este estudo de HUANG sugere que a seletiva inativação de CAD e o desacoplamento da via biossintética de pirimidina podem ser importantes fatores para o processo de apoptose.

Isso poderia explicar nos animais transgênicos a presença dos *spots* 33 e 40 (Figura 15) que pertencem à mesma proteína CPS I, pois eles podem ser fragmentos da proteína inteira. Os *spots* 33 e 40 apresentam uma massa molecular aparente e aproximada (63 kDa

e 58 kDa, respectivamente) bem diferente da massa molecular da CPS I inteira, de 165 kDa, como pode ser visto na figura 20.

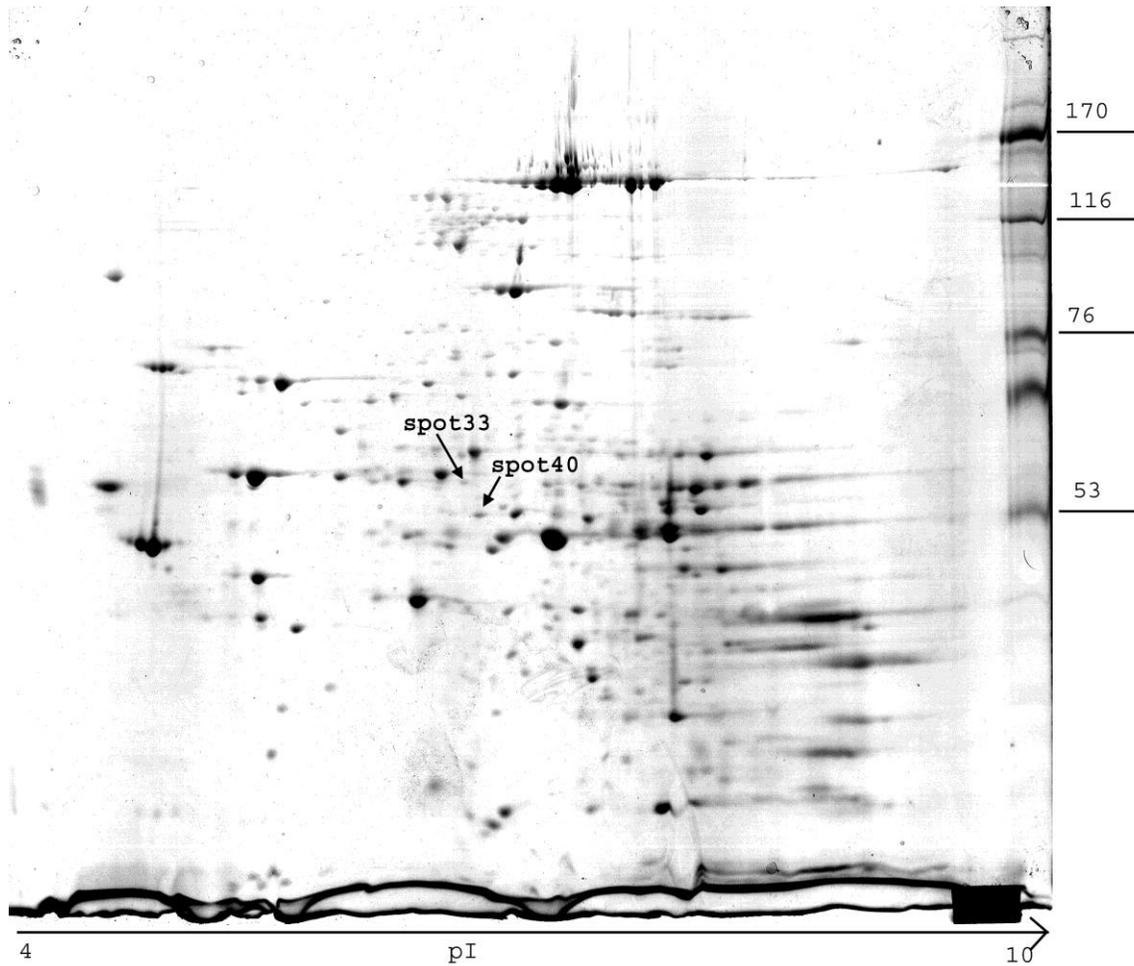


Figura 20. Perfil bidimensional de amostra de animal transgênico, com as setas apontando os *spots* 33 e 40, ambos identificados como CPS, mas com mW bem distintas da proteína original (mW=165 kDa).

Considerando que os animais hipertrigliceridêmicos são mais susceptíveis a TPM e conseqüentemente a ativação de caspases, a partir disso é possível a ocorrência de uma

diminuição no metabolismo de pirimidinas, devido à atuação proteolítica de algumas dessas enzimas sobre moléculas de carbamoil fosfato sintetase.

Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase

A proteína Hidroximetilglutaril-CoA sintase foi uma das proteínas encontradas super expressas nas mitocôndrias de camundongos transgênicos. Essa enzima é responsável pela condensação do acetil-CoA com acetoacil-CoA para formar HMG-CoA (hidroximetilglutaril-CoA), que é substrato para Hidroximetilglutaril-CoA redutase.

O conjunto de reações que inicia a formação de corpos cetônicos, começa com a formação de HMG-CoA mitocondrial a partir de acetil-CoA e acetoacil-CoA. A super expressão de HMG-CoA sintase pode ser entendida por causa do excesso de acetil-CoA vindos da via da β -oxidação de ácidos graxos no camundongo transgênico. A consequência disso é o aumento da via de produção de “corpos cetônicos” (acetoacetato), que só são formados a partir da acetil-CoA quando há a predominância de degradação de lipídeos.

A Hidroximetilglutaril-CoA sintase está envolvida na via biossintética do colesterol no fígado (ACIMOVIC et al, 2008). Colesterol que juntamente às triglicérides são complexados as apolipoproteínas no fígado, formando as VLDL (lipoproteínas de densidade muito baixa).

Electron transfer flavoprotein subunit alpha

A coenzima Q é o ponto de convergência de elétrons provenientes de NADH (Complexo I) e succinato (Complexo II). Adicionalmente, existem outras vias de transferência de elétrons também convergentes para a coenzima Q. Nestas vias, o substrato é oxidado por uma desidrogenase, que é uma flavoproteína, com redução de FAD a FADH₂; os elétrons, depois de passarem por compostos intermediários, são entregues à coenzima Q. Exemplos deste tipo de substrato são encontrados no metabolismo de triacilgliceróis. Um

deles, o glicerol 3-fosfato, origina diidroxiacetona fosfato, por ação da glicerol 3-fosfato desidrogenase, localizada na face externa da membrana interna da mitocôndria. Os elétrons do substrato passam para o FAD e um centro Fe-S associados à enzima e, em seguida, para a coenzima Q. Outra via que reduz CoQ inicia-se com a oxidação de acil-CoA (primeira reação da β -oxidação de ácidos graxos), catalisada pela acil-CoA desidrogenase, cuja coenzima, FAD, é reduzida. Os elétrons do FADH₂ são transferidos, pela ETF (flavoproteína transferidora de elétrons), para outra flavoproteína, que contém um centro Fe-S, a ubiquinona óxido-redutase, que, finalmente, doa o par de elétrons para a coenzima Q.

Havendo um aumento no metabolismo de triacilgliceróis, a transferência de elétrons pelo FAD torna-se aumentada pela via do glicerol 3-fosfato. Dessa forma, para contrabalancear, a outra via de transferência de elétrons pelo FAD, a via da ETF, pode estar diminuída. Esse aumento no metabolismo de triacilgliceróis é algo esperado nos camundongos hipertrigliceridêmicos.

O proteoma mitocondrial tem sido objeto de vários estudos recentes à medida que proteínas presentes na mitocôndria têm sido vastamente elucidadas (FORNER et al, 2006 e McDONALD et al, 2003). Aproximadamente mais de 650 proteínas mitocondriais já foram identificadas. Até mesmo proteínas transitórias originadas de outras organelas (núcleo e citoplasma) e que passam pela mitocôndria encontram-se potencialmente bem caracterizadas (SMITH et al, 2008). É possível encontrar proteínas mitocondriais envolvidas em diversos quadros clínicos como doença de Parkinson, diabetes, disfunção do fígado e envelhecimento (BAILEY et al, 2005 e KANSKI et al, 2005).

Estudos proteômicos de animais que representam modelos para determinados tipos de doenças, como é o caso do presente estudo, reservam um grande potencial. As informações obtidas neste projeto são fundamentais para que se criem fortes precedentes para o avanço funcional da pesquisa em animais modelo para posteriores e possíveis

estudos em humanos. Foram assim identificados alvos interessantes para posteriores estudos sobre possíveis mecanismos fisiológicos que estejam envolvidos com a regulação da respiração mitocondrial em diversos estados associados à hipertrigliceridemia.

Os avanços na proteômica e suas aplicações clínicas têm conduzido os pesquisadores à exploração e descoberta de novos biomarcadores em busca de diagnósticos mais precoces, à interrogação de componentes chaves das vias de sinalização celular, à caracterização de interações entre proteínas, do proteoma de organelas, à identificação de modificações pós-traducionais e perfis da localização subcelular (PANDEY & MANN, 2000) (NAKAMURA et al, 2004).

A aplicação de dados de estudos proteômicos em estudos clínicos é atualmente uma das principais áreas da proteômica. A proteômica clínica trata da aplicação das tecnologias proteômicas na descoberta de modificações que ocorrem nas células, tecidos e órgãos sobre determinadas condições patológicas. Considerando os altos custos experimentais e em face da grande quantidade de dados gerados, torna-se imperativo um maior esforço com o intuito de se integrar cada vez mais a comunidade científica, desde biomédicos até pesquisadores das áreas da genômica, da transcriptômica e da proteômica (MATHIVANAN & PANDEY, 2008).

7 – CONCLUSÕES

- Foram observadas mínimas alterações diferenciais entre o proteoma de mitocôndria obtido de animais transgênicos hipertrigliceridêmicos e o proteoma de camundongos controles não transgênicos no que diz respeito ao número de *spots* diferencialmente expressos.
- A separação das proteínas das amostras controle e transgênicas por eletroforese bidimensional revelou diferenças de expressão exclusivamente sobre *spots* de baixa abundância.
- Na maioria dos estudos clínicos diversos biomarcadores são expressos em baixa quantidade pelo organismo.
- A proteína Hidroximetilglutaril-CoA sintase é mais abundante em extratos protéicos de mitocôndria de camundongos transgênicos para a proteína apoC-III (hipertrigliceridêmicos) em comparação a extratos de proteína mitocondrial de camundongos normo trigliceridêmicos.
- A combinação da eletroforese bidimensional e espectrometria de massas possibilitam uma separação reprodutível e identificação das proteínas mitocondriais diferencialmente expressas em camundongos.
- A utilização de técnicas de análise proteômica, bem como de seus avanços, ainda permitem amplas possibilidades para a investigação de novos alvos moleculares envolvidos em determinados tipos de doença, visando diagnósticos mais precoces e o desenvolvimento de tratamentos clínicos.

8 – PERSPECTIVAS

O estudo inédito do proteoma sub-celular de mitocôndria em camundongos hipertrigliceridêmicos revelou interessantes alvos moleculares, possivelmente envolvidos no metabolismo de lipídios.

Entretanto, embora sejam de fundamental importância, somente as informações parciais sobre a função das proteínas não nos contextualizam em uma visão fisiológica dinâmica dos processos celulares (DE KEERSMAECKER et al, 2006). Assim, o desenvolvimento de novos trabalhos que envolvam análises mais abrangentes das alterações de expressão de proteínas observadas em mitocôndrias de animais hipertrigliceridêmicos devem ser realizados.

Para complementar as informações sobre a função das proteínas detectadas no presente trabalho e a fim de identificar possíveis novos alvos moleculares envolvidos com a regulação da respiração mitocondrial em camundongos hipertrigliceridêmicos, estudos posteriores com o emprego de novas metodologias como, por exemplo, a análise de transcriptoma ou a produção de anticorpos com o objetivo de se rastrear tais proteínas em humanos, são necessários. Se tais estudos forem empregados, talvez possamos compreender melhor as questões fisiológicas e moleculares que possibilitem fundamentar e suportar a expressão diferencial das proteínas observadas. Com isso, talvez consigamos avançar nas análises e interpretações sobre os mecanismos envolvidos na funcionalidade mitocondrial dos camundongos hipertrigliceridêmicos.

9 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AALTO-SETALA, K.; FISHER E. A.; CHEN X.; CHAJEK-SHAUL T.; HAYEK T.; ZECHNER, R. et al. Mechanism of hypertriglyceridemia in human apolipoprotein (apo) CIII transgenic mice. Diminished very low density lipoprotein fractional catabolic rate associated with increased apo CIII and reduced apo E on the particles. **J Clin Invest**, 90:1889-900, 1992.

AALTO-SETALA K.; WEINSTOCK P. H.; BISGAIER, C. L.; WU, L.; SMITH, J. D.; BRESLOW, J. L. Further characterization of the metabolic properties of triglyceride-rich lipoproteins from human and mouse apoC-III transgenic mice. **J Lipid Res**, 37:1802-11, 1996.

ACIMOVIC, J.; FINK, M.; POMPON, D.; BJORKHEM, I.; HIRAYAMA, J.; SASSONE-CORSI, P.; GOLICNIK, M.; ROZMAN, D. CREM modulates the circadian expression of CYP51, HMGCR and cholesterologenesis in the liver. **Biochem Biophys Res Commun**. Nov 7;376(1):206-10. Epub 2008 Sep 4, 2008.

AEBERSOLD, R.; GOODLETT, D.R. Mass spectrometry in proteomics. **Chem Rev**. Feb; 101(2):269-95, 2001.

AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature**, 422: 198-207, 2003.

ALBERICI L.C., OLIVEIRA H.C.F., BIGHETTI E.J.B., FARIA E.C.DE, DE GASPARI G.R., SOUZA C.T., VERGESI A.E.. Hypertriglyceridemia increases mitochondrial resting respiration and susceptibility to permeability transition. **J Bioenerg Biomembr** ,Oct;35(5):451-7, 2003.

ALBERICI L.C.; OLIVEIRA, H.C.F.; PATRÍCIO, P.R.; KOWALTOWSKI, A.J.; VERGESI, A.E. Hyperlipidemic mice presented enhanced catabolism and higher mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel activity. **Gastroenterology**, Oct;131(4):1228-34. Epub 2006 Jul 24, 2006.

BAILEY, S.M.; LANDAR, A.; DARLEY-USMAR, V. Mitochondrial proteomics in free radical research. **Free Radic Biol Med**. Jan 15;38(2):175-88, 2005.

BREMER, J. The biochemistry of hypo- and hyperlipidemic fatty acid derivatives: metabolism and metabolic effects. **Prog Lipid Res**, 40:231-68, 2001.

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**, 25: 1327-33, 2004.

CASTILHO, R. F.; KOWALTOWSKI, A. J.; MEINICKE, A. R.; BECHARA, E. J. H.; VERCESI, A.E. Permeabilization of the inner mitochondrial membrane by Ca^{2+} ions is stimulated by *t*-butyl hydroperoxide and mediated by reactive oxygen species generated by mitochondria. **Free Radical Biol Med**, 18: 479-486, 1995.

CASTILHO, R. F.; KOWALTOWSKI, A. J.; VERCESI, A.E. The irreversibility of inner mitochondrial membrane permeabilization by Ca^{2+} plus prooxidants is determined by the extent of membrane protein thiol cross-linking. **J. Bioenerg. Biomembr**, 28: 523-529, 1996.

CHAVEZ, E.; ZAZUETA, C.; GARCIA, N. Carboxyatractyloside increases the effect of oleate on mitochondrial permeability transition. **FEBS Lett**, 445:189-91, 1999.

CHAVIN, K.D.; YANG, S.; LIN, H.Z.; CHATHAM, J.; CHACKO, V.P.; HOEK, J.B.; et al. Obesity induces expression of uncoupling protein-2 in hepatocytes and promotes liver ATP depletion. **J Biol Chem**, 274(9):5692-700, 1999.

CHERNUSHEVICH, I.V.; LOBODA, A.V.; THOMSON, B.A. An introduction to quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. **J Mass Spectrom**. Aug;36(8):849-65, 2001.

CORTHALS, G.L.; GYGI, S.P.; PATTERSON, S.D.; AEBERSOLD, R. Identification of proteins by mass spectrometry. In *Proteome research: 2D-gel electrophoresis and detection methods* (ed. T. Rabilloud), pp. 197-231. Springer, New York, 1999.

DE KEERSMAECKER, S.C.J.; THLJS, I.M.V.; VANDERLEYDEN, J.; MARCHAL, K. Integration of omics data: how well does it work for bacteria? **Molecular Microbiology**, v. 62, n.5, p.1239-1250, 2006.

DUIVENVOORDEN, I; TEUSINK, B; RENSEN, P.C; ROMIJN, J.A; HAVEKES, L.M; VOSHOL, P.J. Apolipoprotein C3 deficiency results in diet-induced obesity and aggravated insulin resistance in mice. **Diabetes**, 54(3):664-71, 2005.

FAGIAN, M. M.; PEREIRA DA SILVA, L.; MARTINS, I. S.; VERCESI, A. E. Membrane protein thiol cross-linking associated by Ca²⁺ plus prooxidants. **J Biol Chem**, 265: 19955-19960, 1990.

FAZEKAS DE ST. GROTH, S.; WEBSTER, R.G.; DATYNER, A. Two new staining procedures for quantitative estimation of proteins on electrophoretic strips. **Biochim. Biophys. Acta**, 71:377-391, 1963.

FORNER, F.; FOSTER, L.J.; CAMPANARO, S.; VALLE, G.; MANN, M. Quantitative proteomic comparison of rat mitochondria from muscle, heart, and liver. **Mol Cell Proteomics**. Apr;5(4):608-19, 2006. Epub Jan 14, 2006.

GARCIA-RUIZ, C.; COLELL, A.; MARI, M.; MORALES, A.; FERNANDEZ-CHECA, J. C. Direct effect of ceramide on the mitochondrial electron transport chain leads to generation of reactive oxygen species. Role of mitochondrial glutathione. **J Biol Chem**, 272: 11369-77, 1997.

GEVAERT, K.; VANDEKERCKHOVE, J. Protein identification methods in proteomics. **Electrophoresis**. Apr;21(6):1145-54, 2000.

GINSBERG, H. N.; ILLINGWORTH, D. R. Postprandial dyslipidemia: an atherogenic disorder common in patients with diabetes mellitus. **Am J Cardiol**, 88:9H-15H, 2001.

GION J.M.; LALANNE C.; LE PROVOST G.; FERRY-DUMAZET H.; PAIVA J.; CHAUMEIL P.; FRIGERIO J.M.. BRACH J.; BARRÉ A.; DE DARUVAR A.. CLAVEROL S.; BONNEU M.;

SOMMERER N.; NEGRONI L.; PLOMION C. The Proteome of maritime pine wood forming tissue. **Proteomics**. Sep;5(14):3731-51, 2005.

GIORGIANNI, S.B. Proteoma analysis by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry: strengths and limitations. **Trends in analytical chemistry**, Amsterdam, v.22, n.5, p.273-281, 2003.

GÖRG, A.; WEISS, W.; DUNN, M.J. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. **Proteomics**. Dec;4(12):3665-85, 2004. Review. Erratum in: **Proteomics**. Feb;5(3):826-7, 2005.

GRIFFIN, T.J.; GYGI, S.P.; IDEKER, T.; RIST, B.; ENG, J.; HOOD, L.; AEBERSOLD, R. Complementary profiling of gene expression at the transcriptome and proteome levels in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol Cell Proteomics**. Apr;1(4):323-33, 2002.

GYGI, S.P.; CORTHALS, G.L.; ZHANG, Y.; ROCHON, Y.; AEBERSOLD, R. Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 97(17): 9390-5, 2000.

HAMDAN, M.; RIGHETTI, P.G. Assessment of protein expression by means of 2-D gel electrophoresis with and without mass spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews**, 22: 272-84, 2003.

HANASH, S. HUPO initiatives relevant to clinical proteomics. **Mol Cell Proteomics**. Apr;3(4):298-301. Epub 2004 Jan 27, 2004.

HANSEN, B. C. The metabolic syndrome X. **Ann N Y Acad Sci**, 892:1-24, 1999.

HILLENKAMP, F.; KARAS, R.C.; BEAVIS, B.T.C. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers. **Analytical chemistry**, Washington, v. 63, p.1193-1203, 1991.

HUANG, M.; KOZLOWSKI, P.; COLLINS, M.; WANG, Y.; HAYSTEAD, T.A.; GRAVES, L.M. Caspase-dependent cleavage of carbamoyl phosphate synthetase II during apoptosis. **Mol Pharmacol.** Mar;61(3):569-77, 2002.

ITO, Y.; AZROLAN, N.; O'CONNELL, A.; WALSH, A.; BRESLOW, J. L. Hypertriglyceridemia as a result of human apo CIII gene expression in transgenic mice. **Science**, 249: 790-3, 1990.

JOHNSON, R.S.; DAVIS, M.T.; TAYLOR, J.A.; PATTERSON, S.D. Informatics for protein identification by mass spectrometry. **Methods**, 35(5): 223-236, 2005.

JONG, M.C.; HAVEKES, L.M. Insights into apolipoprotein C metabolism from transgenic and gene-targeted mice. **Int J Tissue React.** ;22(2-3):59-66, 2000.

JURGENS, H.; HAASS, W.; CASTANEDA, T.R.; SCHÜRMAN, A.; KEOBNICK, C.; DOMBROWSKI, F.; OTTO, B.; NAWROCKI, A.R.; SCHERER, P.E.; SPRANGER, J.; RISTOW, M.; JOOST, H.G.; HAVEL, P.J.; TSCHÖP, M.H. Consuming fructose-sweetened beverages increases body adiposity in mice. **Obes Res.** Jul;13(7):1146-56, 2005.

KANSKI, J.; BEHRING, A.; PELLING, J.; SCHÖNEICH, C. Proteomic identification of 3-nitrotyrosine-containing rat cardiac proteins: effects of biological aging. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** Jan;288(1):H371-81, 2005. Epub Sep 2, 2004.

KOWALTOWSKI A. J.; CASTILHO R. F.; GRIJALBA M. T.; BECHARA E.J.; VERCESI A. E. Effect of inorganic phosphate concentration on the nature of inner mitochondrial membrane alterations mediated by Ca²⁺ ions. A proposed model for phosphate-stimulated lipid peroxidation. **J Biol Chem**, 271: 2929-34, 1996A.

KOWALTOWSKI, A. J.; CASTILHO, R. F.; VERCESI, A. E. Opening of the mitochondrial permeability transition pore by uncoupling or inorganic phosphate in the presence of Ca²⁺ is dependent on mitochondrial-generated reactive oxygen species. **FEBS Lett**, 378: 150-152, 1996B.

LEHNINGER, A. L. The mitochondrion: molecular basis of structure and function. W. A. Benjamin, Inc. New York, USA, 1964.

LEMASTERS, J. J.; NIEMINEN, A. L.; QIAN, T.; TROST, L. C.; ELMORE, S. P.; NISHIMURA, Y. et al. The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. **Biochim Biophys Acta**, 1366: 177-196, 1998.

MALLOY, M.J.; KANE, J.P. A risk factor for atherosclerosis: triglyceride-rich lipoproteins. **Adv Intern Med**, 47: 111-136, 2001.

MANN, M.; HENDRICKSON, R.C.; PANDEY, A. Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. **Annu Rev Biochem.**;70:437-73, 2001.

MARENGO, 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.

MARTINS DE SOUZA, D.; OLIVEIRA, B.M.; CASTRO-DIAS, E.; WINCK, F.V.; HORIUCHI, R.S.; BALDASSO, P.A., CAETANO, H.T.; PIRES, N.K.; MARANGONI, S.; NOVELLO, J.C. The untiring search for the most complete proteome representation: reviewing the methods. **Brief Funct Genomic Proteomic**, Jul;7(4):312-21. Epub 2008 May 29, 2008.

MATHIVANAN, S.; PANDEY, A. Human Proteinpedia as a resource for clinical proteomics. *Mol Cell Proteomics*. Oct;7(10):2038-47. Epub 2008 Jun 23. **Review**, 2008.

MEUNIER, B.; BOULEY, J.; PIEC, I.; BERNARD, C.; PICARD, B.; HOCQUETTE, J.F. Data analysis methods for detection of differential protein expression in two-dimensional gel electrophoresis. **Anal Biochem**. May 15;340(2):226-30, 2005.

MILLER, M. Current perspectives on the management of hypertriglyceridemia **Am Heart J**, 140(2):232-40, 2000.

MILLER, I.; CRAWFORD, J.; GIANAZZA, E. Protein stains for proteomic applications: which, when, why? **Proteomics**. Oct;6(20):5385-408, 2006.

NAKAMURA, K., AEBERSOLD, R., BAIROCH, A., DUNN, M., CELIS, J., HANASH, S., HOCHSTRASSER, D., HUMPHREY-SMITH, I., JAMES, P., KLOSE, J., LABAER, J., LANGEN, H., MANN, M., PAREKH, R., PATTERSON, S., PEARCE, C., POEPSTORFF, P., SIMPSON, R. J., TOMLINSON, I., TSUGITA, A., and YATES, J. From genome to proteome-aim of human proteomics. **Seikagaku** 76, 1271 –1274, 2004.

NICHOLLS, D.G., FERGUSON, S.J. Respiratory chain. In: Bioenergetics 3. London, Academic Press Inc., p. 89-134, 2002.

NICHOLSON, D.W. e THORNBERRY, N.A. Caspases: killer proteases. **Trends Biochem Sci.** 22:229-306, 1997.

OLIVEIRA, H. C.; MA, L.; MILNE, R.; MARCOVINA, S. M.; INAZU, A.; MABUCHI, H. et al. Cholesteryl ester transfer protein activity enhances plasma cholesteryl ester formation. Studies in CETP transgenic mice and human genetic CETP deficiency. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 17:1045-52, 1997.

PANDEY, A.; MANN, M. Proteomics to study genes and genomes. **Nature** 405, 837 –846, 2000.

PATTERSON, S.D.; AEBERSOLD, R.H. Proteomics: the first decade and beyond. **Nature Genetics**. Mar;33 Suppl:311-23. Review, 2003.

PATTON, W.F. Detection technologies in proteome analysis. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**. May 5;771(1-2):3-31, 2002.

POLAND, J.; RABILLOUD, T.; SINHA, P. in: Walker, J.M. (Ed.), The Proteomics Handbook, Humana Press, Totowa, 2005.

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

REAVEN, G.M.; MONDON, C. E.; CHEN, Y. D.; BRESLOW, J. L. Hypertriglyceridemic mice transgenic for the human apolipoprotein C-III gene are neither insulin resistant nor hyperinsulinemic. **J Lipid Res**, 35:820-4, 1994.

SCHNEIDER, W.C.; HOGEBOM, G.H. Intracellular distribution of enzymes. V. Further studies on the distribution of cytochrome C in rat liver homogenates. **J Biol Chem**, 183: 123-128, 1950.

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

SKULACHEV, V. P. Fatty acid circuit as a physiological mechanism of uncoupling of oxidative phosphorylation. **FEBS Lett**. 294:158-62, 1991.

SMITH, J.R.; MATUS, I.R.; BEARD, D.A.; GREENE, A.S. Differential expression of cardiac mitochondrial proteins. **Proteomics**. Feb;8(3):446-62, 2008.

STAELS, B.; DALLONGEVILLE, J.; AUWERX, J.; SCHOONJANS, K.; LEITERSDORF, E.; FRUCHART, J. C. Mechanism of action of fibrates on lipid and lipoprotein metabolism. **Circulation**, 98(19):2088-93, 1998.

STEEN, H.; MANN, M. The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. **Nat Rev Mol Cell Biol**. Sep;5(9):699-711. Review, 2004.

SUMMAR, M.L.; HALL, L.; CHRISTMAN, B.; BARR, F.; SMITH, H.; KALLIANPUR, A.; BROWN, N.; YADAV, M.; WILLIS, A.; EEDS, A.; CERMAK, E.; SUMMAR, S.; WILSON, A.; ARVIN, M.; PUTNAM, A.; WILLS, M.; CUNNINGHAM, G. Environmentally determined genetic expression: clinical correlates with molecular variants of carbamyl phosphate synthetase I. **Mol Genet Metab**. Apr;81 Suppl 1:S12-9, 2004.

TAGHIBIGLOU, C.; CARPENTIER, A.; VAN IDERSTINE, S.C.; CHEN, B.; RUDY, D.; AITON, A.; LEWIS, G.F.; ADELI, K. Mechanisms of hepatic very low density lipoprotein overproduction in insulin resistance. Evidence for enhanced lipoprotein assembly, reduced

intracellular ApoB degradation, and increased microsomal triglyceride transfer protein in a fructose-fed hamster model. **J Biol Chem**. Mar 24;275(12):8416-25, 2000.

TAYLOR, C.F.; HERMIAKOB, H.; JULIAN, R.K. Jr.; GARAVELLI, J.S.; AEBERSOLD, R.; APWEILER, R. The work of the Human Proteome Organization's Proteomics Standards Initiative (HUPO PSI). **OMICS**, Summer;10(2):145-51, 2006.

TAYLOR, R.C.; COORSSEN, J.R. Proteome resolution by two-dimensional gel electrophoresis varies with the commercial source of IPG strips. **J Proteome Res**, 5 (11): 2919-27, 2006.

TURKO, I.V.; MURAD, F. Quantitative Protein Profiling in Heart Mitochondria from Diabetic Rats. **J Biol Chem**, 278 (37): 35844-49, 2003.

VALLE, V. G. R.; FAGIAN, M. M.; PARENTONI, L. S.; MEININCKE, A. R.; VERGESI, A.E. The participation of reactive oxygen species and protein thiols in the mechanism of mitochondrial inner membrane permeabilization by calcium plus prooxidants. **Arch Biochem Biophys**, 307: 1-7, 1993.

VERGESI, A. E. The participation of NADP, the transmembrane potential and the energy-linked NAD(P) transhydrogenase in the process of Ca²⁺ efflux from rat liver mitochondria. **Arch Biochem Biophys**, 252: 171-8, 1987.

WESTERMEIER, R. Electrophoresis in Practice. VCH, Weinheim, Alemanha, 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – CVD Risk Management Package for Low- and Medium-Resource Settings. Geneva: **WHO**, 38p., 2003.

WIECKOWSKI MR, WOJTCZAK L. Fatty acid-induced uncoupling of oxidative phosphorylation is partly due to opening of the mitochondrial permeability transition pore. **FEBS Lett**, 423: 339-42, 1998.

WILSON J.D. Disorders of Lipid Metabolism. In: Williams, R.H. Textbook of endocrinology. 9a. ed. Philadelphia: Saunders, p.1099-155, 1998.

WITZTUM, J.L. Fármacos usados no tratamento das hiperlipoproteínas. In: HARDMAN, J.G. et al. Goodman & Gilman As Bases Farmacológicas da Terapêutica, 9a ed. Rio de Janeiro, Mc Graw Hill, p.643-60, 1996.

WYSOCKY, V.H.; RESING, K.A.; ZHANG, Q.; CHENG, G. Mass spectrometry of peptides and proteins. **Methods**. Mar;35(3):211-22. Epub 2005 Jan 20, 2005.

ZHANG, L.; PERDOMO, G.; KIM, D.H.; QU, S.; RINQUQUIST, S.; TRUCCO, M.; DONG, H.H. Proteomic analysis of fructose-induced fatty liver in hamsters. **Metabolism**. Aug;57(8):1115-24, 2008.

ZORATTI, M.; SZABÒ, I. The mitochondrial permeability transition. **Biochim Biophys Acta**, 1241: 139-176, 1995.

Endereços eletrônicos consultados:

<http://br.expasy.org/>

www.prospector.ucsf.edu/ucsfhtml4.0/msfit.htm

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

<http://www.matrixscience.co.uk/>

<http://expasy.org/tools/aldente/>

Anexo:

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação/tese de Mestrado/Doutorado intitulada **PROTEOMA COMPARATIVO DE MITOCÔNDRIA: UMA ANÁLISE DE CAMUNDONGO TRANSGÊNICO HIPERTRIGLICERIDÊMICO VERSUS CAMUNDONGO NORMO TRIGLICERIDÊMICO**

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

(X) está inserido no **Projeto CIBio/IB/UNICAMP** (Protocolo nº 2001/06), intitulado Bioenergética mitocondrial em camundongos transgênicos hiperlipidêmicos;

(X) tem autorização da **Comissão de Ética em Experimentação Animal/IB/UNICAMP** (Protocolo nº 1010-1);

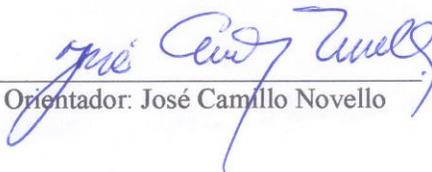
() tem autorização do **Comitê de Ética para Pesquisa com Seres Humanos/FCM/UNICAMP** (Protocolo nº _____);

() tem autorização de comissão de bioética ou biossegurança externa à UNICAMP.

Especificar: _____



Aluno: Hugo Takeda Caetano



Orientador: José Camillo Novello

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido



Nome:
Função:

Profa. Dra. ANA MARIA A. GUARALDO
Presidente
Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA/IB - UNICAMP



Profa. Dra. HELENA COUTINHO F. DE OLIVEIRA
Presidente
Comissão Interna de Biossegurança
CIBio/IB - UNICAMP



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
LABORATÓRIO DE PROTEOMICA

Campinas, 12 de fevereiro de 2009

À CEEA e Clbio

Prezados professores

Em relação ao trabalho desenvolvido com animais pelo aluno Hugo Takeda Caetano, do curso BFM informo que o material usado na sua Dissertação, o material é oriundo de outros grupos de pesquisa que já possuem os protocolos aprovados.: Prof. Aníbal Vercesi (CEEA) e da Profa. Helena C. F. Oliveira (CIBio).

Atenciosamente

Orientador

Ciente e aprovado *Profa. Maria Guardado*